

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

***Ceratonia siliqua* L. YAPRAK EKSTRESİNİN VE ÇEŞİTLİ
BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN İNSAN AKCİĞER
KANSERİ (A549) HÜCRE HATTINDA OTOFAJİ VE
APOPTOZ ÜZERİNDEN ANTİTÜMÖR
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Rukiye Nur ÜNSAL**

**Danışman
Prof.Dr. Nefise Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI**

Yüksek Lisans Tezi

**Eylül 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

***Ceratonia siliqua* L. YAPRAK EKSTRESİNİN VE ÇEŞİTLİ
BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN İNSAN AKCİĞER
KANSERİ (A549) HÜCRE HATTINDA OTOFAJİ VE
APOPTOZ ÜZERİNDEN ANTİTÜMÖR
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Rukiye Nur ÜNSAL**

**Danışman
Prof.Dr. Nefise Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2015-6201 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Eylül 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kurallar ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Rukiye Nur ÜNSAL

İmza: Rukiye Ünsal

YÖNERGEYE UYGUNLUK

“*Ceratonia siliqua* L. Yaprak Ekstresinin Ve Çeşitli Biyoaktif Bileşiklerinin İnsan Akciğer Kanseri (A549) Hücre Hattında Otofaji Ve Apoptoz Üzerinden Antitümör Aktivitelerinin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Rukiye Nur ÜNSAL

Rukiye N. Ünsal

Danışman
Prof. Dr. Nefise Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI

N. N. İmamoğlu Şirvanlı

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Hamiyet Altuntaş

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Nefise Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI danışmanlığında Rukiye Nur ÜNSAL tarafından hazırlanan “*Cerutonia Siliqua* L. Yaprak Ekstresinin Ve Çeşitli Biyoaktif Bileşiklerinin İnsan Akciğer Kanseri (A549) Hücre Hattında Otofaji Ve Apoptoz Üzerinden Antitümör Aktivitelerinin Araştırılması” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

20 /09 /2018

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Nefise Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI
(Erciyes Üniversitesi Eczacılık Temel Bilimleri AD)

Üye : Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ
(Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD)

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Emel Başak GENCER AKÇOK
(Abdullah Gül Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik AD)

Nefise Nalan
Hamiyet Altuntaş
Emel Başak Gencer Akçok

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 04. Eylül 2018 tarih ve 98 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

[Signature]
Prof. Dr. Deniz GENCER AKÇOK

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana danışmanlık yapan, çalışma şartlarımı oluşturan, çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren ve emeğini esirgemeyen Yüksek Lisans tez danışmanım olan Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nefise Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI'ya

Tez çalışmam boyunca yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Pınar Atalay DÜNDAR'a,

Bugünlere gelmemde büyük paya sahip olan, varlıklarından her zaman büyük gurur ve güven duyduğum değerli annem Zekiye ÜNSAL, kardeşlerim Fadime ÜNSAL ve Hikmet Miraç ÜNSAL'a manevi desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim

Rukiye Nur ÜNSAL

Kayseri, Eylül 2018

***Ceratonia siliqua* L. YAPRAK EKSTRESİNİN VE ÇEŞİTLİ BİYOAKTİF
BİLEŞİKLERİNİN İNSAN AKCİĞER KANSERİ (A549) HÜCRE HATTINDA
OTOFAJİ VE APOPTOZ ÜZERİNDEN ANTİTÜMÖR AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Rukiye Nur ÜNSAL

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Eylül 2018

Danışman: Prof.Dr. Nefise Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI

KISA ÖZET

Çalışmamızda A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında *Ceratonia siliqua* L (*C. siliqua*)’ dan elde edilen yaprak ekstreleri ve ekstrelerin içeriğinde bulunan gallik asit, epikateşin-3-gallat, epigallokateşin-3-gallat ve klorojenik asit bileşiklerinin apoptoz ve otofaji sinyal iletim yollarında antitümoral bir ajan olarak kullanabilme potansiyelleri ve moleküler mekanizmalarının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla *C. siliqua* yaprak ekstrelerinin fenolik içerikleri LC/MS/MS ile, çalışmada kullanılacak ekstre ve fenolik bileşiklerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri ise MTT analizi ile belirlendi. Apoptoz ve otofaji ile ilişkili genlerin mRNA transkripsiyon ve protein ekspresyon düzeyleri sırasıyla RT-qPCR (Bax, Bcl-2 ve kaspaz 3) ve western blot (Bax, Bcl-2, Beklin 1, Atg 5 ve LC3) analizleri ile belirlendi. Sonuç olarak, *C. siliqua* yaprak ekstrelerinin A549 hücrelerinin canlılıklarını doza ve süreye bağlı olarak azalttıkları, fenolik bileşiklerin ise A549 hücrelerinin canlılıkları üzerinde inhibe edici etkiye sahip olmadıkları belirlendi. RT-qPCR ve western blot analizlerinden elde edilen sonuçlar, *C. siliqua* yaprak ekstrelerinin proapoptotik Bax ve kaspaz 3 düzeyini artırarak, antiapoptotik Bcl-2 düzeyini ise azaltarak A549 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü uyardıklarını göstermiştir. Diğer taraftan, *C. siliqua* yaprak ekstrelerinin otofaji ile ilgili Beklin 1 ve Atg 5 düzeylerini azaltıp, buna karşın otofaji belirteci olan LC3-II düzeyini artırarak otofaji yolağını uyardığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, otofaji ile apoptoz arasındaki moleküler bağlantıları ortaya çıkarmak için otofaji ve genel kaspaz inhibitörleri kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, A549 hücrelerinde otofaji ve apoptoz arasındaki ilişkinin açığa çıkarılabilesinde yetersiz kalmıştır.

Anahtar kelimeler: A549; Akciğer kanseri, Apoptoz, *Ceratonia siliqua* L, Otofaji

**INVESTIGATION of ANTITUMOR ACTIVITIES of LEAF EXTRACT and
VARIOUS BIOACTIVE COMPOUNDS of *Ceratonia siliqua* L. THROUGH
AUTOPHAGY and APOPTOSIS in HUMAN CANCER CELL LINES**

Rukiye Nur ÜNSAL

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Medical Biology

Master Thesis, September 2018

Supervisor: Prof.Dr. Nefise Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI

ABSTRACT

In our study, the possible antitumoral agents and molecular mechanisms of *Ceratonia siliqua* L. leaf extracts and the components in these extracts which are gallic acid, epicatechin-3-gallate, epigallocatechin-3-gallate and chlorogenic acid were investigated in apoptosis and autophagy signal transduction pathways on A549 non small cell lung cancer cells. For this purpose, the phenolic contents of the leaf extracts of *C. siliqua* were determined by LC/MS/MS, and the effects on cell proliferation of extracts and phenolic compounds that will be used in the study were determined by MTT assay. mRNA transcription and protein expression levels of apoptosis- and autophagy-related genes were determined by RT-qPCR (Bax, Bcl-2 ve caspase 3) and western blot (Bax, Bcl-2, Beclin 1, Atg 5 ve LC3) analysis, respectively. As a result, it was determined that *C. siliqua* leaf extracts reduced the viability of A549 cells depending on the dose and duration, while the phenolic compounds had no inhibitory effect on the viability of A549 cells. Results from RT-qPCR and western analysis showed that *C. siliqua* leaf extracts stimulated apoptotic cell death in A549 cells by increasing proapoptotic Bax and caspase-levels and by decreasing antiapoptotic Bcl-2 levels. On the other hand, it was determined that *C. siliqua* leaf extracts reduced the levels of Beclin 1 and Atg 5 which are related to autophagy, but stimulated the autophagic pathway by increasing the level of an autophagic marker LC3-II. However, the data obtained from our studies using autophagy and general caspase inhibitors to elucidate the molecular link between autophagy and apoptosis are insufficient to elucidate the relationship between autophagy and apoptosis in A549 cells.

Keywords: A549; Apoptosis, Autophagy, *Ceratonia siliqua* L, Lung cancer

İÇİNDEKİLER

***Ceratonia Siliqua* L. YAPRAK EKSTRESİNİN VE ÇEŞİTLİ
BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN İNSAN AKCİĞER KANSERİ
(A549) HÜCRE HATTINDA OTOFAJİ VE APOPTOZ ÜZERİNDEN
ANTİTÜMÖR AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sayfa

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
KISA ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KANSERİN TANIMI	3
2.1.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	4
2.2. AKCİĞER KANSERİ.....	7
2.2.1. Akciğer Kanserin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi.....	8
2.2.2. Akciğer Kanserin Histolojik Sınıflandırılması.....	8
2.2.2.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)	8
2.2.2.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK).....	9
2.2.3. Akciğer Kanseri Kullanan Antikanser Ajanlar ve Yan Etkileri	9

2.3. APOPTOZ	11
2.3.1. Apoptotik Hücre Ölümü (Programlı Hücre Ölümü; Tip I hücre ölümü).....	11
2.3.2. Apoptotik Hücrelerin Morfolojik Özellikleri	12
2.3.3. Apoptotik Hücre Ölümünün Moleküler Mekanizması.....	13
2.3.3.1. İntrinsik Yolak	14
2.3.3.2. Ekstrinsik Yolak	15
2.4. OTOFAJİ.....	18
2.4.1. Otofajik Hücre Ölümü (Tip II hücre ölümü).....	18
2.4.2. Otofajik Hücrelerin Özellikleri.....	19
2.4.3. Otofajik Hücre Ölümünün Moleküler Mekanizması.....	20
2.5. APOPTOZ VE OTOFAJİ ARASINDAKİ İLİŞKİ.....	22
2.6. FLAVONOİDLER	24
2.6.1. Flavonoidlerin Genel Özellikleri ve Yapısı.....	24
2.6.2. Polifenollerin Sınıflandırılması	25
2.6.3. Flavonoidlerin Antikanser Aktiviteleri.....	27
2.7. KEÇİBOYNUZU (<i>Ceratonia siliqua</i> L.) BİTKİSİ VE ÖZELLİKLERİ	28
2.7.1. <i>C. siliqua</i> 'nın Anatomisi ve Taksonomisi	29
2.7.2. <i>C. siliqua</i> 'nın İçeriğinde Bulunan Aktif Bileşikler	30
2.7.3. <i>C. siliqua</i> 'nın Farmakolojik Aktiviteleri	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. GEREÇLER	33
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	33
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler..	34
3.2. YÖNTEM.....	37
3.2.1. <i>Ceratonia siliqua</i> (<i>C. siliqua</i>) Yaprak Ekstrelerinin Hazırlanması	37
3.2.2. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerindeki Toplam Fenol Miktar Tayini ..	37

3.2.3. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerindeki Toplam Flavonoid Miktar Tayini.....	38
3.2.4. LC/MS/MS Analizi ile <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerinin Fenolik Bileşik İçeriklerinin Belirlenmesi.....	38
3.2.5. A549 Hücre Kültürü	39
3.2.6. MTT (3(4,5-dimethyl thiazolyl-2)2,5-diphenyl tetrazolium bromide) Hücre Canlılığı Testi.....	39
3.2.7. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizi.....	41
3.2.8. Western Blot Analizi	42
3.2.9. İstatistiksel Analiz	44
4.BULGULAR.....	45
4.1 <i>C. siliqua</i> Yapraklarından Elde Edilen Ekstraksiyon Verimi	45
4.2 <i>C. siliqua</i> Yapraklarından Elde Edilen Ekstrelerin İçerdikleri Toplam Fenol ve Flavonoid Miktarları.....	45
4.3 <i>C. siliqua</i> Yapraklarından Elde Edilen Ekstrelerin Fenolik Bileşik İçerikleri	46
4.4 <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstreleri ve Saf Bileşiklerinin A549 Hücrelerinin Canlılıkları Üzerindeki Etkileri.....	51
4.4.1 GYE Ekstresinin A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi..	51
4.4.2 OYE Ekstresinin A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi..	52
4.4.3 Gallik Asit (GAc)'in A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....	54
4.4.4 Epigallokateşin-3-gallat (EGCG)'ın A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi	55
4.4.5 Epikateşin-3-gallat (ECG)'ın A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi	56
4.4.6 Klorojenik Asit (ClAc)'in A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....	57
4.5. A549 Hücrelerinde Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Taxol ve Resveratrol Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	58

4.6. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Apoptoz Yolağında Görev yapan genlerin mRNA Ekspresyonlarına Etkileri	61
4.6.1. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Proapoptotik Bax ve Antiapoptotik Bcl-2 genlerinin mRNA Ekspresyonuna Etkileri.	61
4.6.2. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Kaspaz 3 geninin mRNA Ekspresyonuna Etkileri	63
4.7. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Apoptoz Yolağında Görev yapan Proteinlerin Ekspresyonlarına Etkileri.....	64
4.7.1. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Hücrelerinde Proapoptotik Bax ve Antiapoptotik Bcl-2 Protein Ekspresyonlarına Etkileri	65
4.8. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Otofaji Yolağında Görev yapan Proteinlerin Ekspresyonlarına Etkileri	68
4.8.1. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Beklin 1 Protein Ekspresyonuna Etkileri	68
4.8.2. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Hücrelerinde Atg5 Protein Ekspresyonuna Etkileri	71
4.8.3. <i>C. siliqua</i> Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde LC3A/B Protein Ekspresyonuna Etkileri	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	77
6. KAYNAKLAR	85
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR VE SİMGELER

3-MA:	3-Metil Adenin
A549:	İnsan Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattı
Apaf-1:	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
ATCC:	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATG:	Otofaji ile İlişkili gen ve proteinler
Bax:	BCL-2 İlişkili X Proteini
Bcl-2:	B Hücre Lenfoma-2
ClAc:	Klorojenik Asit
DED:	Ölüm Efektör Bölgesi
DISC:	Ölüm Başlatan Sinyal Kompleksi
DMSO:	Dimetilsülfoksit
ECG:	Epikateşin-3-gallat
EGCG:	Epigallokateşin-3-gallat
EGFR:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FADD:	Fas İle İlişkili Ölüm Bölgesi
FasL:	Fas Ligandı
FBS:	Fetal Bovine Serum
GAc:	Gallik Asit
GYE:	Genç ağaç Yaprak Etanol
GYM:	Genç ağaç Yaprak Metanol
HeLa:	İnsan Servikal Adenokarsinoma Hücre Hattı
HRP:	Horse Radish Peroksidaz
IAP:	Apoptoz İnhibitör Proteinleri
IARC:	Uluslararası Kansere Ajanları

IC₅₀:	%50 İnhibisyona Neden Olan Konsantrasyon
KHAK:	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK:	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
LC3:	Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3A/B
MDA-MB-231:	Meme Kanseri Hücre Hattı
MTT :	(3(4,5-dimethyl thiazolyl-2)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
MYC:	Miyelositomatozis
OYE:	Olgun ağaç Yaprak Etanol
OYM:	Olgun ağaç Yaprak Metanol
PI3K:	Fosfotidilinositol 3-kinaz
PVDF:	Poliviniliden Florid
RT-qPCR:	Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Olgun ve genç <i>C. siliqua</i> ağaçlarına ait yapraklardan hazırlanan %70'lik metanol ve %70'lik etanol ekstrelerinden elde edilen ekstraksiyon verimi.	45
Tablo 4.2. Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol ve flavonoid miktarları	46
Tablo 4.3. LC/MS/MS analiz sonuçları.....	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özelliği	4
Şekil 2. 2. Apoptotik hücredeki değişiklikler	13
Şekil 2.3. Mitokondri boyunca apoptotik iç yolak mekanizması	15
Şekil 2.4. Programlanmış hücre ölümüne yol açan ekstrinsik ve intrinsik yolakların genel görünümü	16
Şekil 2. 5. Otofajik vezikül oluşumu ve yıkım aşamalarını gösteren genel şema	22
Şekil 2.6. Programlı hücre ölümü apoptoz/otofaji arasındaki ilişki.	23
Şekil 2.7. Flavonoidlerin genel yapısı	26
Şekil 2.8. Epikateşin-3-gallat epikateşin-3-gallat (ECG) ve epigallokateşin-3- gallat (EGCG) kimyasal yapısı	26
Şekil 2. 9. Gallik asitin kimyasal yapısı.	27
Şekil 2.10. Resveratrol'ün kimyasal yapısı	27
Şekil 2.11. Flavonoidlerin antitümöral aktiviteleri	28
Şekil 2.12. <i>Ceratonia siliqua</i> L. ağacının yaprakları	29
Şekil 2.13. Klorojenik asitin kimyasal yapısı	31
Şekil 3.1. A549 hücrelerinin görünümü	39
Şekil 4.1. Standartlara ait toplam iyon kromatogramı.....	47
Şekil 4.2. EGC'ye ait toplam iyon kromatogramı.	47
Şekil 4.3. GYE ekstresine ait toplam iyon kromatogramı.....	48
Şekil 4.4. GYM ekstresine ait toplam iyon kromatogramı	48
Şekil 4.5. OYE ekstresine ait toplam iyon kromatogramı.....	49
Şekil 4.6. OYM Ekstresine ait toplam iyon kromatogramı	49
Şekil 4.7. Artan konsantrasyonlarda GYE ekstresinin A549 hücreleri ile 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafîği.	52
Şekil 4.8. Artan konsantrasyonlarda OYE ekstresinin A549 hücreleri ile 6, 12, 24 ve 48 inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafîği.	53

Şekil 4.9. A549 hücrelerinin GAc'nin artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	54
Şekil 4.10. A549 hücrelerinin EGCG'nin artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	55
Şekil 4.11. A549 hücrelerinin ECG'nin artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	56
Şekil 4.12. A549 hücrelerinin ClAc'nin artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	57
Şekil 4.13. A549 hücrelerinin Taxol'ün artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	59
Şekil 4.14. A549 hücrelerinin Resveratrol'ün artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	60
Şekil 4.15. A549 hücrelerinde proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2'nin mRNA ekspresyonlarına GYE ve OYE ekstralarının etkileri.....	62
Şekil 4.16. A549 hücrelerinde Kaspaz 3'ün mRNA ekspresyonuna GYE ve OYE ekstralarının etkileri.....	63
Şekil 4.17. GYE ve OYE ekstraları, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve Resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarındaki Bax protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.	65
Şekil 4.18. GYE ve OYE ekstraları, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve Resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarındaki Bcl-2 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.....	65
Şekil 4.19. GYE ve OYE ekstraları, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarındaki Bax/Bcl-2 oranını gösteren grafik.....	66
Şekil 4.20. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraları ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Bax protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.....	67
Şekil 4.21. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraları ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Bcl-2 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.....	67

- Şekil 4.22.** Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA(746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen A549 hücre guplarında Bax/Bcl-2 oranını gösteren grafik.....67
- Şekil 4.23.** GYE ve OYE ekstreleri, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve Resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Beklin 1 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.....68
- Şekil 4.24.** GYE ve OYE ekstreleri, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL) , QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında beclin 1 protein ekspresyon düzeylerini gösteren grafik.....69
- Şekil 4.25.** Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen A549 hücre guplarında beclin 1 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.....70
- Şekil 4.26.** Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında beclin 1 protein ekspresyon düzeylerini gösteren grafik.....70
- Şekil 4.27.** GYE ve OYE ekstreleri, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3µg/mL) ve resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Atg 5 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.71
- Şekil 4.28.** GYE ve OYE ekstreleri, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3µg/mL) ve resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Atg 5 protein ekspresyon düzeylerini gösteren grafik.....72
- Şekil 4.29.** Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL)ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen A549 hücre guplarında Atg 5 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.....73
- Şekil 4.30.** Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Atg 5 protein ekspresyon düzeylerini gösteren grafik.....73

- Şekil 4.31.** GYE ve OYE ekstreleri, taxol (1.7µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve resveratrol (µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında LC3-II protein düzeyini gösteren western blot görüntüsü.74
- Şekil 4.32.** GYE ve OYE ekstreleri, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında LC3-II protein düzeyini gösteren grafik.75
- Şekil 4.33.** Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen A549 hücre guplarında LC3-II protein düzeyini gösteren western blot görüntüsü.76
- Şekil 4.34.** Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında LC3-II protein düzeyini gösteren grafik.76

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, günümüzde giderek artış gösteren insan sağlığını ve yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. Dünya çapında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedeni olarak ikinci sırada yer almaktadır. Dünyada her yıl kansere bağlı olarak altı milyondan fazla kişinin ölümüne neden olmaktadır (1).

Akciğer kanseri, son yıllarda dünyada en sık görülen kanser türlerinden biridir. Amerikan Kanser Topluluğu'nun 2013 tahminlerine göre ABD'deki kansere bağlı ölümlerin % 27'sini oluşturmaktadır. Hastalığın tekrarlama olasılığı da çok yüksektir. Bioworld Asia'nın tahminlerine göre Çin'de her yıl 500.000'den fazla yeni akciğer kanseri tanısı konulmaktadır. Diğer Asya ülkelerinde bu sayı Japonya'da 86.000 ve Tayvan'da ise 9.000 vaka olarak tahmin edilmektedir. Türkiye Kanser İstatistikleri 2017 raporunda yer alan bilgilere göre Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerinde ülkemizde erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseri iken kadınlarda ise meme kanserinin ilk sırada yer aldığı tespit edilmiştir (2, 3).

Akciğer kanseri gibi birçok kanser türlerinin tedavisinde karşılaşılan en büyük sorun tümörlerin sitotoksik ilaçlara karşı yüksek düzeyde direnç göstermesidir (4, 5). Tedavide geleneksel olarak kullanılan kemoterapi ilaçları ise kanser hücrelerini öldürmesinin yanı sıra normal hücreler üzerinde toksik yan etkiler göstermekte ve bu durum da hastalığın kontrol altına alınmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, bu etkileri en az düzeye indirmek için yeni ve daha güçlü ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmakta ve doğal anti kanserojenik ilaçların keşfedilmesi hedeflenmektedir (6).

Günümüzde klinik araştırmalara göre birçok bitkinin antitümör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (6). Bitkilerin antikarsinojen, antioksidan ve antiinflamatuvar gibi sağlık açısından faydalı değişik aktiviteler gösterebilen çeşitli biyoaktif bileşenlere sahip olması, bu bileşenleri ve/veya ekstraktları içeren yeni birtakım nutrasötiklerin, bitkisel

kaynaklı tedavi edici ajanların veya fonksiyonel gıda ürünlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların sayısını son yıllarda oldukça arttırmıştır.

Ülkemizde keçiboynuzu olarak da bilinen ve Fabaceae familyasına ait olan *Ceratonia siliqua* L. (*C. siliqua*) ağacı Akdeniz bölgelerine özgü bir bitki olup, Türkiye’de yaygın olarak Batı ve Güney Anadolu bölgelerinde doğal olarak yetişmektedir (7). *C. siliqua* bitkisinin meyve ve yaprakları, çeşitli biyoaktif kimyasal bileşenlerden meydana gelen önemli bir fenolik bileşik kaynağıdır ve yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir (8-11). Literatürde, *C. siliqua* meyve ve/veya yaprak ekstrelerinin; anksiyolitik-sedatif, antidepresan, hepatoprotektif, kemopreventif, antimutajenik, antiproliferatif, antikarsinojenik, antioksidan, antidiyare, antiöstrojenik ve kolesterol düşürücü etkilere sahip oldukları gösterilmiştir (8, 9, 11-16). Bununla birlikte, *C. siliqua* yaprak ekstresinin akciğer kanserinde apoptoz ve otofaji sinyal yolları üzerindeki etkileri ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu nedenle, tez çalışması kapsamında *C. siliqua* yaprak ekstresinin ve içeriğinde bulunan gallik asit (GAc), epikateşin-3-gallat (ECG), epigallocateşin-3-gallat (EGCG) ve klorojenik asit (ClAc) bileşiklerinin insan akciğer adenokarsinoma (A549) hücre hattında antitümör etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışması ile, *C. siliqua* yaprak ekstresinin A549 hücrelerinde apoptoz ve otofaji sinyal yolları üzerindeki etkileri ilk kez moleküler düzeyde araştırılmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarla, *C. siliqua* yaprak ekstrelerinin A549 hücrelerinin canlılıklarını doza ve süreye bağlı olarak azalttıkları belirlenmiştir. Çalışmalar sonucunda, *C. siliqua* yaprak ekstrelerinin A549 hücrelerinin canlılığı üzerindeki inhibe edici etkisini proapoptotik Bax düzeyini artırarak, antiapoptotik bcl-2 düzeyini azaltarak ve en sonunda da kaspaz 3 düzeyini artırarak apoptotik hücre ölümünü uyarak göstermiştir. Diğer taraftan, *C. siliqua* yaprak ekstrelerinin otofaji ile ilgili beclin 1 ve Atg 5 düzeylerini azaltıp, buna karşın otofaji belirteci olan LC3-II düzeyini artırarak otofaji yolağını uyardığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, otofaji ile apoptoz arasındaki moleküler bağlantıları ortaya çıkarmak için otofaji inhibitörü 3-metiladenin (3-MA) ve genel kaspaz inhibitörü QVD-OPh kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, A549 hücrelerinde otofaji ve apoptoz arasındaki ilişkinin açığa çıkarılabilmesinde yetersiz kalmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSERİN TANIMI

Günümüzde kanser, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde büyük bir sağlık sorunudur ve halen alternatif tedavilerin geliştirilebilmesi için çeşitli yollar araştırılmaktadır (1, 17). Kanser aynı zamanda dünya çapında ölümlerin en önemli nedenlerinden biridir. (18, 19). Kanser, vücutta bulunan hücrelerin iç ve dış etkiler sonucunda kontrolden çıkıp bulundukları yerden diğer bölgelere kan veya lenf damarlarıyla taşınarak kontrolsüz ve zamansız bir şekilde büyümeye başladığı, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir (20, 21). Karsinogenez normal bir hücrenin kanser hücresine aşamalı olarak dönüşümüdür. Bu dönüşüm farklı sinyal iletim yollarını aktive ederek genetik değişiklikler tarafından tetiklenen çoklu basamakları içermektedir. Karsinogenez de bulunan sinyal iletim yolları genellikle birbirleri ile etkileşim içindedir. Kötü huylu (malign) bir fenotip oluşumunda onkojenik sinyaller artmaktadır. Normal hücreler büyüme ve hayatta kalma gibi eksojen uyarılara karşı duyarlıdır. Kanser hücreleri ise eksojen sinyallerin yokluğunda büyüyebilmektedir. Bununla birlikte büyüme ve hayatta kalma sinyallerinin negatif düzenleyicilerine karşı da tepkisizdirler (21). Kanser oluşumunda bir veya birden fazla gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda hücreler uyarılmaktadır. Normal hücrelerdeki mutasyonlar hücrelerdeki çoğalma ve ölüm oranını bozmaktadır. Bunun sonucunda hücre döngüsü kontrol altına alınamadığından dolayı hücrelerin hızlı çoğalmasıyla birlikte iyi huylu (benign) veya malign tümör oluşumu başlamaktadır (22).

Diyetle alınan besinlerin ve çevresel faktörlerin (radyasyon, güneş ışığı, hormonlar, virüsler, bakteriler ve kimyasallar) tümör hücrelerinde apoptoza neden olduğu ve bununla birlikte anjiogenez ve metastaz oluşumunu pozitif veya negatif yönde etkilediği konusunda genel bir kanı mevcuttur. Bu durumda, doğal ürünlerin türevleri veya doğal ürün modeline dayalı sentetik farmasötik maddeler doğal kökenli ürünler olarak tanımlanmaktadır (1). Kanser modern toplumumuzda en önemli sağlık sorunlarından

biri haline gelmesinden dolayı olası alternatif tedavi yolları araştırılmaktadır. Bu hastalıkta tedaviye katkı sağlayan ve ileri götürmeyi hedefleyen araştırma alanlarından biri etnofarmakolojidir. Geleneksel olarak antiproliferatif preparatlar olarak kullanılan doğal ürünler bilimsel çalışmalarda fitokimyasal tedaviye uygun ve klinik açıdan da anlamlı aktif bir araştırma alanı olarak devam etmektedir (17).

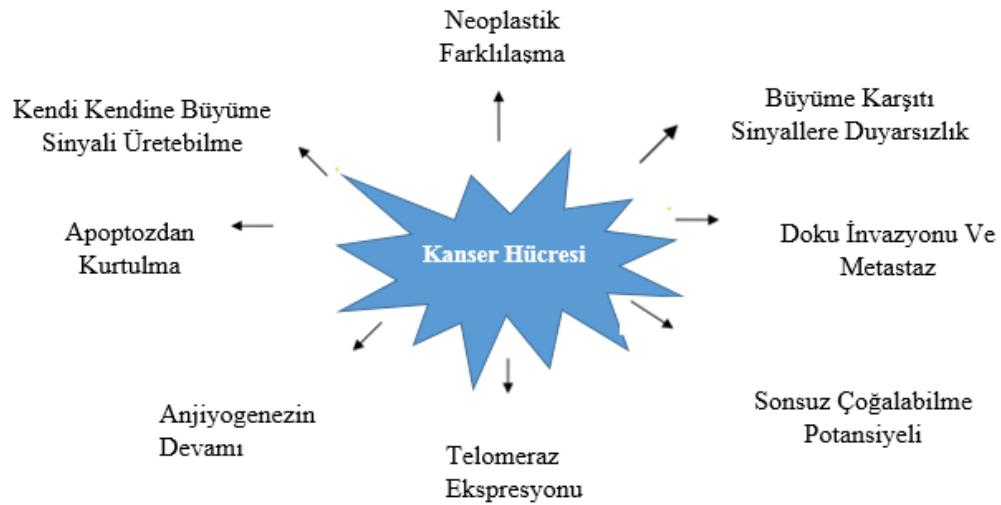
Bitki özleri ve türevleri klinikte ve tüm dünyada çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan etkili bir anti kanser ajanı olarak kabul edilmektedir (1). Terapötik bileşikler ve yeni tedavi stratejileri kanserle mücadelede metastazı yönetmek ve önlemek için önemli bir gelişme olarak görülmektedir (23).

2.1.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Kanserin pek çok farklı türleri olmasına rağmen kendi içinde ortak birçok özellik barındırmaktadır. Bu özellikler herhangi bir kanser türünün ilerlemesi sırasında çeşitli aşamalarda belirgin hale gelebilmektedir (24).

Kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri; hücre proliferasyonunda artış, apoptozdan kaçış, hücre ve dokuda değişim, metabolizmada değişim, genomik instabilite, sonsuz çoğalabilme potansiyeli, diğer dokuların işgali, lenf düğümlerine ve uzak dokulara taşınma (metastaz), anjiyogenez ve telomeraz ekspresyonudur (Şekil 2. 1) (24, 25).



Şekil 2. 1. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özelliği (25)

Hücre Proliferasyonunda Artış: Tümör hücrelerinin normal boyutlarının dışında büyümeleri onların en belirgin özelliği olarak kabul edilmektedir. Bazı kanser türleri büyüme uyarıcı sinyallerine karşı aşırı duyarlıyken bazıları ise büyük ölçüde bu sinyallere duyarsızdır. DNA sentezi sonucu ve mitozun artması aktif hücre döngüsünü meydana getirmektedir. Bunun sonucunda 'proliferatif fraksiyon' miktarı da artmaktadır. Farklılaşma sonucunda hücre ölümünün yetersiz bir şekilde gerçekleşmesi proliferasyon oranındaki artışı gösteren temel sebeplerden biri olarak kabul edilmektedir (24).

Apoptozdan Kaçış: Kanser hücrelerinin hayatta kalmalarının önemli sebeplerinden biride apoptoz olarak bilinen programlanmış hücre ölüm sinyallerinden kaçabilme yetenekleridir (26). Tümör hücrelerinin bir hücre popülasyonu oluşturabilmesi sadece hızlı çoğalmasıyla değil aynı zamanda ölen hücre sayısı ile de alakalıdır. Bu ölümün kaynağını apoptoz oluşturmaktadır. (27). Bir hücre popülasyonunda homeostazinin sağlanabilmesi için, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında denge sağlanması gerekmektedir. Bu denge bozulursa çoğalan normal dokular tümörleşmeye başlamaktadır. Kanser hücrelerinin apoptoz geçirme yetenekleri kaybolduğundan bu süreçte dokuya özgü uyaranlara karşı yanıt veremediği bildirilmiştir (28).

Hücre ve Dokuda Değişme: Kanser hücrelerindeki oluşan bazı fenotipik değişiklikler 'metaplazi' olarak adlandırılmaktadır. Bir dokunun farklılaşmış başka bir dokuya dönüşümü olarak tanımlanmaktadır. Bu oluşum kanserin belirteci olarak görülmektedir. Herhangi bir kanser hücrelerinin farklılaşması başarısız olursa hücre bölünmesi ve ölümü arasındaki dengenin bozulduğu belirtilmektedir (24).

Metabolizmada Değişim: Kanser hücrelerinde hücre çoğalmasının devam edebilmesi için metabolizmada gerek duyulan enerji kaynaklarının ve biyomalzemelerin üretilmesi ve tüketilmesi gerekmektedir (29). DNA sentezi için deoksinekleotidler, nükleotid sentezi için de enzim ve pek çok hücre bileşenleri gerekmektedir. Bu şekilde hücre çoğalması indüklenebilmektedir. Hücre büyümesi için gerekli etmenlerden biri de protein sentezindeki artıştır. Transkripsiyon başlama faktörlerinin ekspresyonunda ve ribozomal proteinleri fosforilasyonundaki artış kanser hücrelerinde açık bir şekilde görülmektedir. Protein sentezindeki bu artış invazyon ve metastaz sırasında da gerekli olmaktadır (24).

Genomik İstabilite: Genomik instabilitenin, DNA tamir mekanizması ve hücre döngüsündeki kontrol yollarıyla ilgili karmaşık bir mekanizmaya bağlı olduğu

bilinmektedir. Anormal bir karyotip ile kendini göstererek metastaz ve tümör gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (30, 31). Tümör supresör proteini olan p53 DNA hasarından sorumlu olan mekanizmada görev yapmaktadır. DNA’ da bir hasar mevcutsa ya tamir mekanizmasını devreye sokarak hücre döngüsünü durdurmakta ya da hasarlı hücreyi apoptoza yönlendirmektedir (24). Mutant p53, tümöröenez ve metastazda onkojenik bir role sahiptir (32). Kanseri hücreleri p53 proteininde oluşan fonksiyon kaybı ile DNA hasarı sonucu oluşan sinyallere cevap veremez. Dahası DNA hasarını algılama ve tamire katılan genlerin sayısındaki artışı sağlama, mitoz sırasında doğru kromozom ayrımının yapılması gibi mekanizmaların olmayışı hemen hemen tüm kanser türlerinde görülmektedir (24).

Sonsuz Çoğalabilme Potansiyeli: Çoğu kanser hücresi immortalite yani teorik olarak sonsuz sayıda bölünme yeteneğine sahip olduğu düşünülmektedir. İnsan hücrelerinin bölünmeleri sınırlı sayıdadır. Kök hücre ve germ hücreleri bu kısıtlamadan muaf tutulmaktadır. Bu teorik bilgilere rağmen insan kanser hücrelerinin ölümsüz olduğuna dair verilerin doğruluğu tam olarak netleştirilememiştir (24).

Doku İstilas ve Metastaz: Metastaz kolorektal adenokarsinomlarda ölümcül etkinin en önemli nedenlerinden biridir (33). Metastaz oluşumu genellikle kanserleşme sürecinin ileri bir aşaması olarak görülmekte kötü prognozu ve düşük sağkalım oranını işaret etmektedir (34). Kanseri türlerinin gelişimi sırasında ilk oluşan tümör kitleleri yakınındaki dokuyu istila etmektedir. Bu dokudan uzaktaki bölgelere taşınabilmektedirler. İnvazyon ve metastaz benign tümör ile malign tümör arasındaki farkı net bir şekilde açıklamaktadır. İnvazyon esnasında kanser hücreleri asıl bulunduğu bölgeden ayrılıp aynı dokunun başka bir parçasına geçiş yapmaktadır. Bazı kanser hücreleri tek tek ya da yapışık hücre kümeleri halinde komşu dokulara doğru göç ederler. Tümör kitlesi içinde lenfosit, granülositler ve makrofajlar bulunurlar. Bu sebeple invazyona genellikle inflamasyonun da eşlik ettiği belirtilmektedir. Metastaz sırasında ise primer tümör hücresinden ayrılan kanser hücreleri, farklı doku veya organlara kan veya lenf yoluyla taşınmaktadır. (24).

Anjiyogenez: Anjiyogenez, tümörün sürekli büyümesi için hücreye oksijen ve besin maddeleri sağlayarak önceden var olan kan damarından yeni kan damarı oluşturma sürecine dayanmaktadır (35). Malign büyümenin en önemli bileşenlerinden biri anjiyogenezdir. Tümör büyümesini desteklemek için var olan kan damarlarından elde

edilen besin ve oksijen yeterli değildir. Bu nedenle, bazı benign tümörlerde dahil kanser hücreleri yeni kılcal damarların büyümesini ve mevcut kan damarlarının yeniden yapılandırılması için anjiyogenez oluşumunu başlatmaktadır (24). Yeni kan damarı oluşumu gerçekleşmediği takdirde tümör çapı 2-3 mm ötesine geçememektedir. Hemen hemen tüm tümörlerde en önemli anjiyojenik faktör vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF)'dir. Tümör anjiyogenezlerin gelişimi VEGF'e bağlı olduğundan bevacizumab gibi ilaçları geliştirebilmek için bu yol hedef alınmaktadır (36).

Telomeraz Ekspresyonu: Telomeraz, kromozom uçlarındaki DNA dizilerini koruyan bir enzimdir (37). Telomerlerle ilişkili proteinler ile birlikte RNA bileşeni ve katalitik alt biriminden oluşan özel bir revers transkriptazdır. Telomeraz kendi RNA'sını kalıp olarak kullanarak tekrarlanan TTAGGG heksamerini ekleyerek telomer uzunluğu ve işlevini korumaktadır. Hücre yaşlanması ve ölümüyle ilişkili olan telomerler normal hücrelerde her hücre döngüsü sırasında kısalmaktadır. Ancak, kanser hücrelerinin %85'inden daha fazlasında ölümsüzlüğe neden olan telomeraz indüklenerek telomer uzamasına neden olur. Bu durumun doğal sonucu olarak telomer kısalması önlenmektedir. Telomeraz inhibitörlerinin keşfi kanser teşhisi ve tedavisi için evrensel bir belirteç olarak kullanılmaktadır (38).

2.2. AKCİĞER KANSERİ

Akciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir ve her yıl yaklaşık 1.4 milyon kişi bu sebepten hayatını kaybetmektedir (39-41). Bu hastalık, tanısı konulan kanser vakalarının yaklaşık % 20'sini oluşturmaktadır (22). Ayrıca 2012 yılında 1.82 milyon vaka ile en sık teşhis edilen kanser türü arasında yer almaktadır (42) .

Günümüze kadar, akciğer kanseri patogenezi anlamak için pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda çevresel kanserojen ve duyarlılığı belirlenen gen lokusları arasında ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Hastalığın ortaya çıkış sebebi ve bu süreçte meydana gelen hücresel, moleküler ve genetik değişiklikler son 25 yıl içinde daha iyi anlaşılmıştır. Günümüzde ise, akciğer kanserinde hedefe yönelik tedavi stratejilerini tasarlamak için önemli sinyal iletim yolları araştırılmaya başlanmıştır (43).

2.2.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Akciğer kanserinin birçok nedeni bulunmaktadır. Mesleki maruziyette dahil olmak üzere radon gazı, asbest, nikel, krom, radyasyon, arsenik gibi ajanlara maruz kalmak hastalığı tetiklemektedir. Aktif sigara kullanımı, sigara dumanına maruz kalma, kötü beslenme, fiziksel aktivite yetersizliği bunların yanı sıra sosyoekonomik durum, genetik yatkınlık, HIV virüsü gibi patolojik kaynaklı enfeksiyonlar da hastalığın ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Akciğer kanserinde bireysel yatkınlık ve çevresel ajanlara maruz kalma arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Risk faktörleri arasında bu sinerjik etkileşimler akciğer kanseri riskini artırarak önemli sonuçlar doğurabilmektedir (44).

Yüz yıl öncesinde akciğer kanserinin mesleki bir nedenden kaynaklanabileceği düşünülüyordu. Almanya'da madenlerde çalışan işçilerde akciğer kanseri görülmesinden sonra akciğer kanseri ve mesleki maruziyet arasındaki bağlantı 1879 yılında Harting ve Hesse tarafından kurulmuştur. Daha sonra madenlerde radon gazı yüksek seviyelerde bulunmuş ve yirminci yüzyılın başlarında radyoaktif gaz maruziyeti ile akciğer karsinogenezi arasındaki etiyolojik bağlantı yapılmıştır (43).

Araştırmalara göre Asya'da özellikle hiç sigara içmeyen kadınlarda akciğer kanseri vakalarının sayısının arttığı belirlenmiştir. Bu durum göz önüne alınarak akciğer kanserinde yeni etiyolojilerin ortaya çıkıp çıkmadığını belirlemek için hem standart hem de moleküler çalışmalar yapılması gerektiği belirtilmektedir (43).

2.2.2. Akciğer Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması

Akciğer kanserinin patolojik sınıflandırılması yapılırken immünohistokimyasal ve moleküler analizlerin zorunlu olduğu belirtilmiştir (42). Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırmasında küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanser (KHDAK) tipleri prognoz ve tedavi seçiminin değerlendirilmesinde standart olmuştur (40, 45).

2.2.2.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)

KHAK tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık % 13-15 'ini oluşturmaktadır (46). KHAK hastalarının % 95'inden fazlasında sigara kullanımı ile hastalık riski arasında bir ilişki görülmektedir (47). Düşük bir insidansa sahip olmasına rağmen dünya çapında kansere bağlı ölümlerde 6. sırada yer aldığı belirtilmektedir. Vücutta hızlı bir şekilde çoğalarak

erken metastaz oluşturma riskine sahiptir. Bu tümörlerlere sahip hastaların %1-5'nin 5 yıllık sağkalım oranına sahip olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, en yaygın görülen genetik değişiklikler; tümör baskılayıcı genler TP53 ve RB1 (Retinoblastoma 1) 'in fonksiyonel olarak inaktivasyonu, MYC aile üyelerindeki kopya sayısının artması, NOTCH aile üyelerinin ve reseptör tirozin kinazların sürekli ve kontrolsüz aktive olmasıdır (42). Tedavisinde platin ve etoposid kombinasyon sonucunda % 60-70'e varan yanıt alınabildiği belirtilmektedir (46).

2.2.2.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

KHDAK tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık % 85'ini oluşturmaktadır (48). Son on yıl içinde KHDAK skuamöz hücreli ve non-skuamöz hücreli alt türleri klinik uygulamaya girmiştir. Bu değişimler sonucunda KHDAK bazı alt tiplerinde etkin toksik özelliğe sahip spesifik anti-kanser ilaçlarının gerekli olduğu gösterilmiştir (42).

İleri evre KHDAK hastalarında platin bazlı kemoterapi ile tedavisi sonucunda ortalama 8 aylık hayatta kalma süresi olduğu görülmüştür (39).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonunun varlığı KHDAK' ni diğer akciğer kanserin alt türlerinden ayırt etmektedir. Tirozin kinaz inhibitörleri arasında yer alan gefitinib, erlotinib ve afatinib EGFR mutant KHDAK hastaları üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda tedavide etkili olduğu ve bu üç ilaç platin bazlı çiftli kemoterapi ile karşılaştırıldığında daha olumlu sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (49).

Ayrıca son zamanlarda, ileri evre skuamöz hücreli KHDAK hastalarında kemoterapi tedavisi sonrası uygulanan erlotinibe kıyasla afatinibin, tedavide hayatta kalma süresini artırdığı görülmüştür (42) .

Çoğu KHDAK hastası başlangıçta kemoterapiye cevap vermektedir. Ancak nihai olarak ilaç direnci ortaya çıkmakta ve kötü prognozla birlikte kanser oluşumu yeniden gözlenmektedir. Kemoterapötik ajanlara karşı direnç, kanserli hücrelerde bulunan çeşitli proteinlerin ifadesi sonucu gelişir ve pek çok hastada bu hastalık tekrarlanmaktadır. Bu nedenle, KHDAK hastaları için yeni ve etkili antikanser ajanları veya tedavi stratejileri gerekmektedir (48).

2.2.3. Akciğer Kanseri Kullanılan Antikanser Ajanlar ve Yan Etkileri

İlaç seçimi kanser tedavisini geliştiren bir yaklaşım olarak görülmektedir. Bu anlamda farklı bir hücre ölüm mekanizması yoluyla sitotoksiteyi artırarak tümör hücrelerinin

baskılanması beklenmektedir. Mevcut kemoterapötik ilaçlar esas olarak, tümörü baskılamak için hücre döngüsü mekanizmasının bozulmasına neden olarak hücreyi apoptoza götürmektedir (50). Kemoterapi, kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek veya hücre proliferasyonunu inhibe ederek klinikte yaygın olarak kullanılan kanser terapisi (22). Alkilleyici ajanlar, sisplatin ve karboplatin gibi kemoterapötik ilaçlar DNA adüktleri oluşturarak DNA sentezini durdurmaktadır. Taksanlar gibi bitki alkaloidleri, tübülini stabilize ederek tümör hücresindeki mitozu durdurmaktadır (51, 52).

Bununla birlikte, kemoterapötik ajanların etkili dozları, farklı kanser türlerinde, hastalarda sıklıkla ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, yan etkilerin en aza indirilmesi için kullanılan tedavi dozunun azaltılmasına yönelik güçlü kemoterapötik ajanların araştırılması gerekmektedir (22).

Paklitaksel (Taxol) *Taxus brevifolia* porsuk ağacı bitkisinden izole edilmiş olup günümüzde antikanser ilacı olarak kullanılmaktadır. Meme kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri ve bazı baş ve boyun kanseri tedavisinde kullanılmak üzere en çok tercih edilen doğal bir ilaçtır. (51, 52) Mitoz sırasında mikrotübüller ile etkileşime girerek kanser hücrelerinin çoğalmasını önlemektedir. Tübülün polimerizasyonunu teşvik etmekte ve mikrotübüllerin depolimerizasyonu önleyerek stabil halde kalmasını sağlamaktadır. Sonuçta mikrotübüllerin esnekliği bozulmaktadır (51). Bununla birlikte, ciddi yan etkilere sahip olduğu belirtilmektedir. Uzun infüzyon süresi, zayıf biyoyararlanıma sahip olması ve çoklu ilaç direncinin gelişmesi paklitaksel kullanımını sınırlandırmaktadır (52-55).

Resveratrol (3,4',5-trans-trihidroksistilben) antineoplastik, antitümör, antiinflamatuvar, antioksidatif, antiplatelet, antifungal ve östrojenik olmak üzere geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir. Doğal olarak oluşan, stilben yapısına sahip non flavanoid polifenolik bir bileşiktir (51, 56, 57). Resveratrolün farmakolojik etkileri arasında en dikkat çeken özelliklerinden biri anti kanserojenik etkisidir (51, 58). Potansiyel bir anti kanser ajan olarak bilinen resveratrol, tümörün oluşumu ve artışı esnasında gelişim sürecini inhibe etmektedir. Resveratrolün bu anti kanser etkisi bilinmesine rağmen düşük bir biyoyararlanıma sahip olması ve dolaşımdan hızlı bir şekilde atılması sebebiyle klinikte sınırlı kullanıma sahip olduğu bildirilmiştir. Resveratrolün stilben motifinde yapısal

değişikliklerle çeşitli sentetik analoglarının oluşturulması umut verici olarak görülmektedir (56).

2.3. APOPTOZ

Apoptoz terimi ilk olarak Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında çok hücreli organizmalardaki fizyolojik nedenlerden kaynaklanan programlanmış hücre ölüm süreci olarak tanımlanmıştır (59, 60).

Apoptoz Yunanca'da apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinden oluşarak yaprağın ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak ayrılması anlamında kullanılmaktadır. Görev aldığı mekanizmalar arasında normal hücrelerin embriyonik gelişimi sürecinde hücre ölümü ve çoğalma arasındaki homeostatik dengenin sağlanabilmesi, hasarlı veya enfekte hücrelerin yok edilmesi ve yetişkin organizmalardaki dokuların farklılaşması yer almaktadır (61-63).

2.3.1. Apoptotik Hücre Ölümü (Programlı Hücre Ölümü; Tip I hücre ölümü)

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü sağlıklı hücrelerde hücre dışı veya genetik faktörlerle gerçekleşen ana ölüm mekanizması olarak kabul edilmektedir (63-65).

DNA hasarı veya kontrolsüz çoğalma dahil olmak üzere apoptotik yolun aktive olmasına yol açan çok çeşitli koşullar mevcuttur. Apoptotik yol hem hücre içi hem de hücre dışı sinyaller vasıtasıyla uyarılmaktadır. Apoptoza sebep olan iki farklı yolak mevcuttur. Bunlar sinyal tipleriyle ilişkili olarak intrinsik veya ekstrinsik yollardır. Bunlara mitokondriyal aracılı yolak ve ölüm reseptör yollağı da denilmektedir (66).

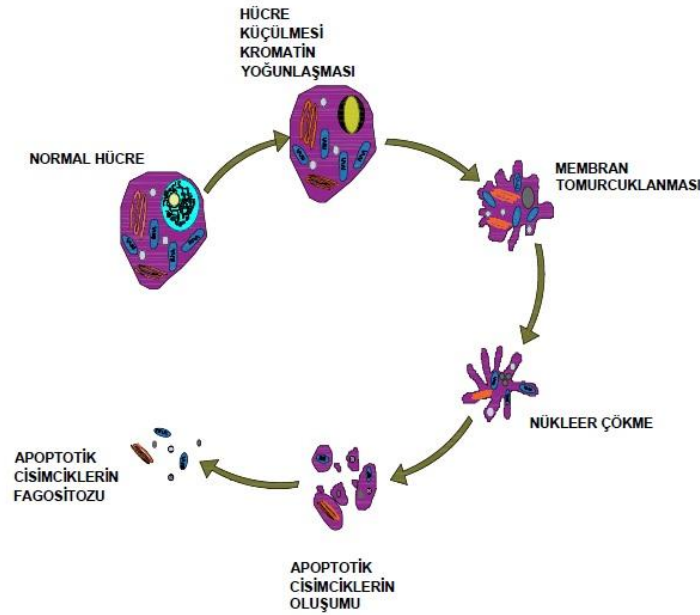
Kaspaz ailesinin proteazlarının, programlanmış hücre ölümü sırasında birçok bağlantıyı başlatmak ve düzenlemek için önemli bir görev üstlendiği belirtilmektedir (67). Apoptoz, hedef proteinleri parçalayan bir sistein protein sınıfı olan kaspazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Kaspaz proteaz aktivitesi, yüzlerce proteini kestiğinden dolayı başarılı bir apoptoz için gereklidir. Dört başlatıcı kaspaz (kaspaz 2, 8, 9, 10) ve üç sonlandırıcı kaspaz (kaspaz 3, 6, 7) bulunmaktadır. Sonlandırıcı kaspazların görevi hücreyi ölüme götürecek olan hedef proteinleri parçalamaktır. Hücreye ölüm sinyali geldiğinde apoptoz oluşumu başlamaktadır. Apoptotik hücreler küçülmeye başlamakta ve sinyaller sonucunda plazma membranı değişikliğe uğramaktadır. Özellikle intrinsik yolak B hücre lenfoma-2 (Bcl-2) protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. Proapoptotik moleküllerden oluşan grup içinde BH3 only proteinleri olarak

isimlendirilen bir alt grup bulunmaktadır. Bu proteinler proapoptotik moleküllerin aktivitesini indüklemekte ya da antiapoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanarak inhibe etmektedirler. Antiapoptotik Bcl-2 proteinleri, proapoptotik Bcl-2 proteinini, Bcl-2 ilişkili X proteinini (Bax) ve Bcl-2 homolog antagonist killer (Bak)'ın inhibisyonuna neden olarak apoptozu önlemektedir. Apoptozda meydana gelen düzensizlikler sonucunda çeşitli hastalıkların semptomları ortaya çıkmaktadır. Hızlandırılmış apoptozda infertilite, immün yetmezlik, akut ve kronik dejeneratif hastalıklar gözlenirken gecikmiş veya inhibe olmuş apoptoz sonucunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülmektedir (66).

Kaspaz fonksiyonunun apoptotik hücre ölümü için gerekli olduğu bilinmektedir. QVD-OPh, geniş spektrumlu bir kaspaz inhibitörüdür (68, 69). Kaspaz inhibitörlerinin temelini oluşturan bazı peptidler florometilketon (fmk) veya diflorofenoksimetil (OPh) kaspazların aktif bölgesine kovalent olarak geri dönüşümsüz bağlanarak inhibitör-enzim kompleksi oluşturmaktadırlar. QVD-OPh'nin kaspaz ailesini inhibe etme yeteneği diğer inhibitörlerle karşılaştırıldığında daha spesifik ve daha az sitotoksik olduğu belirtilmiştir (67).

2.3.2. Apoptotik Hücrelerin Morfolojik Özellikleri

Hücrelere apoptoz sırasında ışık ve elektron mikroskobu ile bakıldığında çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler geçirdiği gözlenmiştir. Sitoplazmanın küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimciklerin ayrışması ve oluşan hücre kalıntılarının komşu hücreler tarafından fagosite edilmesi bu değişikliklerin bir göstergesidir (61, 70). Apoptozun erken evresi boyunca, hücre büzülmesi ışık mikroskobu ile görülebilmektedir. Hücrenin büzülmesiyle birlikte hücrelerin boyutu daha da küçülmekte sitoplazma ve organeller yoğun ve sıkı bir şekilde paketlenmektedir. Hematoksilen ve eozin boyaması ile yapılan histolojik incelemede apoptoz, tek hücreli veya küçük hücre kümeleri olarak görülmektedir. Plazma zar yapısının bozulmasının ardından "tomurcuklanma" adı verilen bir süreç boyunca apoptotik cisimciklerin içerisinde hücre parçalarının ayrışması gözlenmektedir. Apoptotik cisimcikler, organellerin sıkı bir şekilde paketlenmiş olarak bulunmasıdır. Organeller sağlam bir plazma membranı ile birlikte muhafaza edilmektedir. Bu cisimler fagolizozomlar içinde bozularak makrofajlar tarafından fagosite edilmektedir (64). Apoptotik hücredeki değişiklikler aşağıda gösterilmektedir (Şekil 2. 2) (71).



Şekil 2. 2. Apoptotik hücredeki değişiklikler (71)

2.3.3. Apoptotik Hücre Ölümünün Moleküler Mekanizması

Kanser hücrelerinin özellikleri, tipi ne olursa olsun kontrolsüz büyüme, anjiyojenez ve apoptozdan kaçma tüm kanser hücrelerinde ortaktır. Tipik olarak, kanserde hedeflenen yolak intrinsiktir ancak apoptozu engellemek için farklı yollar bulunmaktadır. Apoptoz mekanizmasının kontrolden çıkması, kanser hücrelerinin daha uzun süre hayatta kalmasına ve sonuçta mutasyonların artmasına sebep olmaktadır. Tümör gelişimi sırasında invaziv oluşum artabilir, anjiyogenez uyarılabilir, hücre proliferasyonu ve farklılaşma gerçekleşebilmektedir. Apoptozdan kaçınmak için kanser hücrelerinin çeşitli yolları vardır. Bunlar kaspazların işlevlerini engellemek veya apoptoz için tetikleyici ajanları devre dışı bırakmaktadır. En belirgin kaçınma yöntemi antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin ifadeleri sonucunda Bax ve/veya Bak'ta ifade kaybı olduğu bilinmektedir (66).

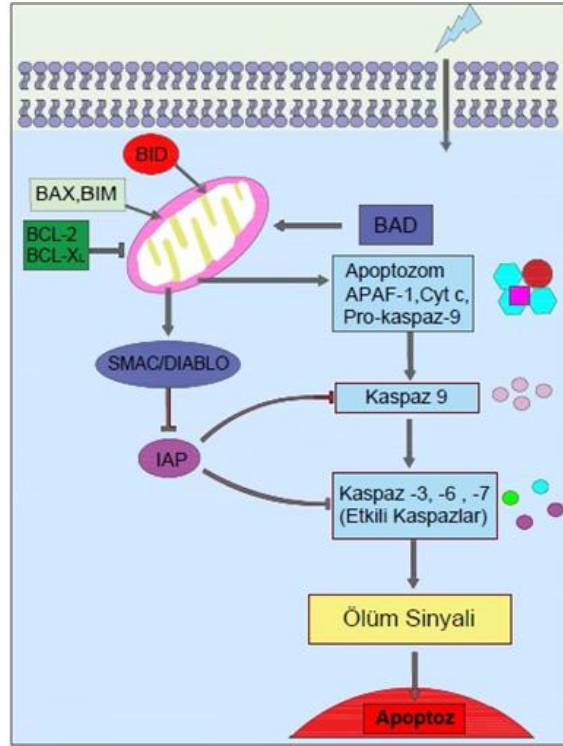
Kanser tedavisindeki ana amaç kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini kontrol altına almak veya hücreyi ölüme götürmektir. Bu ölümün gerçekleşebilmesi için hücrenin kendi ölüm mekanizmasını kullanması son derece etkili bir yöntemdir. Apoptozdan kaçınmak kanserin belirticidir. Bu yüzden apoptozun hedeflenmesi kanserin nedeni veya türü için nonspesifik olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla tüm kanser türlerinde etkili bir yol olarak bilinmektedir. Hem intrinsik hemde ekstrinsik yolların çeşitli

aşamalarını hedef alan birçok anti kanser ilacı mevcuttur. Proapoptotik moleküllerin uyarılması ve antiapoptotik moleküllerin inhibisyonu terapötik hedeflerin araştırılması için iki ortak stratejidir. Hücre ölüm mekanizmalarındaki yolların herhangi bir aşaması tedavi için hedeflenebilmektedir. Ancak bu hedeflerden hangisinin en etkili yol olduğuna dair bir belirteç bulunmamaktadır. Bunun için apoptozu uyaran daha fazla antikanser ilaçları tasarlandığında, en etkili hedefin hangisi olduğu belirlenebilecektir (66).

Kaspaz aracılı apoptoz, intrinsik veya ekstrinsik yollar vasıtasıyla biyokimyasal olarak düzenlenen çoklu adımlar vasıtasıyla gerçekleşmektedir (59).

2.3.3.1. İntrinsik Yolak

İntrinsik yolak mekanizması mitokondri aracılı olarak ve mitokondriyal proteinleri kullanarak gerçekleşmektedir. Hücrelerde büyüme faktörü yoksunluğu, hasar görmüş DNA ya da aşırı regüle edilmiş onkojenlerin varlığı, DNA'ya zarar veren moleküllerin varlığı ve mikrotübül oluşumunu hedefleyen ilaçlar tarafından bu yol uyarılabilmektedir. Genel olarak bu yolak Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. Çeşitli apoptotik uyaranlar BH3 only proteinlerinin aşırı regülasyonuna neden olur ve bu proteinler hem Bax hem de Bak'ı aktive etmektedir. Bax, p53 geni tarafından düzenlenir ve bir tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. Bax ve Bak oligomerize durumdadır ve aktive olduklarında mitokondri dış membran permeabilizasyonuna neden olmaktadır. Mitokondrial dış membran geçirgenliği apoptozun geri dönüşümsüz olarak intrinsik yolağını tanımlayan bir durumdur. Permeabilizasyon, sitokrom c gibi zarlar arası proteinlerin salınmasına olanak tanımaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 sitokrom c'nin sitozole geçişini engellerken proapoptotik Bax, sitokrom c'nin sitozole geçişine neden olmaktadır. Sitokrom c, APAF-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) ve prokaspaz 9 aktifleştirici kompleksi yani apoptozomu oluştururlar. Apoptozom içinde, prokaspaz 9 kaspaz 9'a dönüşmekte ve bu yolağın başlangıç kaspazı olarak görev yapmaktadır. Daha sonra kaspaz 9 kaspaz 3 ve kaspaz 7'yi aktive etmektedir. SMAC/DIABLO ise apoptoz inhibitörü proteinlere (IAP) bağlanarak kaspaz 9'un aktive olmasını engellemektedir. Sonuç olarak sonlandırıcı kaspazlar hücrelerin ölümüne yol açacak proteinleri hızlı bir şekilde parçalamaktadırlar (65, 66). Mitokondri boyunca apoptotik iç yolak mekanizması Şekil 2. 3'te gösterilmektedir (72).



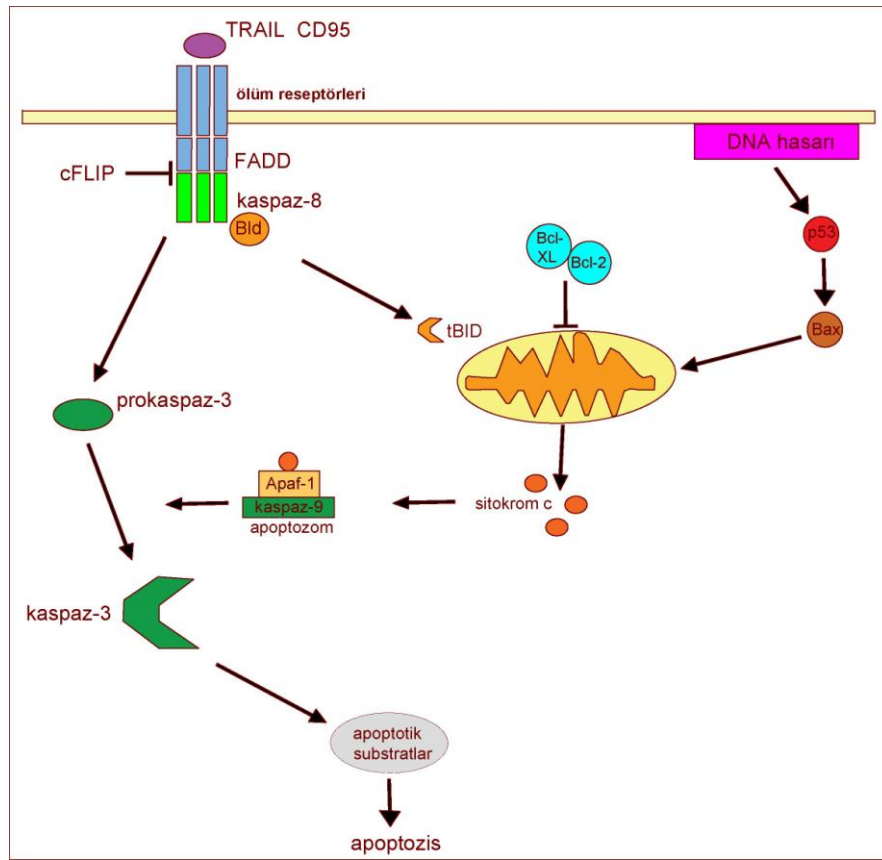
Şekil 2.3. Mitokondri boyunca apoptotik iç yolak mekanizması (72).

2.3.3.2. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik yol aynı kökenden gelen DR4/DR5 ve CD95/FAS reseptörlerince bağlanan Apo2L/TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptör (TRAIL) ve CD95L/Fas ligandı (Fas-L), gibi proapoptotik ligandlar tarafından tetiklenir, tümör nekroz faktör (TNF) ailesi reseptörleri TNF ligandları tarafından aktive edilmektedir (59).

Ekstrinsik yol apoptozu uyarmak için hücre dışı sinyalleri kullanmaktadır. Ölüm ligandları olarak da bilinen hücre ölümü sinyalleri, TNF ailesi ölüm reseptörlerine bağlanmaktadır. Ölüm reseptörlerine bağlı bir adaptör proteinleri bulunmaktadır. Adaptör proteinler arasında Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (FADD) ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm bölgesi (TRADD) bulunmaktadır. Başlatıcı prokaspazlar 8 ve 10 adaptör proteine bağlanır ve ölüm başlatan sinyal kompleksini (DISC) oluşturmaktadır. Prokaspazlar, adaptör proteine bağlanan ölüm efektör bölgesi (DED)'e sahiptir. Prokaspaz 8 ve 10'un DISC tarafından aktive edildiği düşünülmektedir. Sonlandırıcı kaspazlar 3, 6 ve 7 aktive olduktan sonra hücre ölümüne yol açan proteinlerin ve hücre iskeletinin parçalanmasını başlatmaktadır (68). DISC kaspaz 8'e homolog olan ancak kaspaz etkinliğine sahip olmayan c-FLIP inhibitörü tarafından düzenlenmektedir.

Ekstrinsik yolda kaspaz 8'in aktivasyonu bir BH3 only proteini olan BID'in aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktif haldeki kaspaz 8 BID proteinini ikiye böler ve bölünen BID kesilmiş tBID olarak adlandırılır. BID daha sonra Bax ve BAK'ın oligomerizasyonuna neden olmaktadır. Ekstrinsik yolun aşamalı olarak ilerlemesi apoptozun meydana gelmesiyle sonuçlanmaktadır (66, 73, 74). Programlanmış hücre ölümüne yol açan ekstrinsik ve intrinsik yolların genel görünümü Şekil 2. 4'de gösterilmektedir (75).



Şekil 2.4. Programlanmış hücre ölümüne yol açan ekstrinsik ve intrinsik yolların genel görünümü (75).

Kanser hücreleri çeşitli mekanizmalar yoluyla apoptozdan kaçmaktadır. Normal sinyal yollarından sapma hücrelerin hayatta kalmasını düzenlemekte ya da proapoptotik bir regülasyona sebep olabilmektedir. Kanser hücrelerinin hayatta kalmasına neden olan genler potansiyel olarak onkojeniktir ve bu durum genellikle mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Yine benzer şekilde proapoptotik genler de tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadırlar. Tüm inhibitörler ve aktivatörler kanser hücre hatlarında normal

düzeyinin dışında bulunmaktadır. Örneğin, tüm insan kanserlerinin neredeyse yarısından çoğunda Bcl-2 ifadesi yüksektir. Çoğunlukla kullanılan anti kanser ilaçlarının büyük kısmı kanser hücrelerini öldürmek üzere Bcl-2/Bax-bağımlı mekanizmaları kullanmaktadır. Eğer bu mekanizma bozulursa veya başka bir değişikliğe uğrarsa kemoterapi ilaçlarının başarısız olmasına yol açmaktadır. Buna ek olarak kanser hücreleri apoptozdan kaçındığından dolayı kullanılan ilaçların dozları artmakta ve bu da terapilere karşı direnç kazanılmasına neden olmaktadır. Apoptotik sinyal yollarındaki değişiklikler bağışıklık sistemi üzerindeki direnci de arttırmaktadır (66).

Kanser hücreleri tipik olarak apoptozdan kaçmasına rağmen apoptozu hızlandıran birçok sinyal bulunmaktadır. Kanser hücreleri 'ölüm için başlangıç' anlamı taşımaktadır. Normal hücrelere göre apoptotik yolun tetiklenmesine daha yatkın oldukları belirtilmiştir. Bu hücreler artan apoptotik sinyallere duyarlıdır. Bu başlangıç proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ifadesindeki artıştan kaynaklanarak bu hücrelerin daha hızlı ve kolay bir şekilde apoptoza uğramasına sebep olmaktadır. Antiapoptotik proteinlerin ifadesindeki bu artış durursa veya bozulursa, proapoptotik proteinler apoptozu tetikleyebilmektedir. Antiapoptotik proteinlerin bir inhibitör ile hedeflenmesi apoptoz ve tümör hücresinin ölümü ile sonuçlanmaktadır. Genel olarak tümör hücreleri ekstrinsik yola intrinsik yoldan daha fazla duyarlıdır ki bu da ekstrinsik yolun kanser tedavisi için hedeflenmesi gerektiğini göstermektedir. Tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 ailesinden proapoptotik proteinlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir. Tümör baskılayıcı gende meydana gelen bir mutasyon apoptotik kaçınmaya sebep olmaktadır. Bunun sonucunda ise apoptotik yolun başka bir şekilde aktive edilmesi gerekmektedir (66).

Tümörlerde aşırı ifade edilen apoptotik yolların pek çok inhibitörleri vardır. Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin ifadelerindeki artış ve Bax gibi proapoptotik proteinlerin ifadelerindeki azalış hücrelerin apoptoza direnç göstermesinin belirteçleri olarak görülmektedir. Apoptozdaki kusurlar tümör hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapi gibi kullanılan terapilere direnç göstermesine yol açmaktadır (66).

Apoptotik yol boyunca hücre sağkalımında görev yapan proteinler arasında Bcl-2, Bcl-xl, BCL-w, mcl-1, A1, NR-13, BHRF1, LMW5-HL, ORF16, KS-BCL-2 ve E1b-19K bulunmaktadır. Bu proteinlerin birçoğu kanserde aşırı bir şekilde ifade edilmektedir.

Antiapoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu, hipoksi, büyüme faktörü yoksunluğu ve oksidatif stres gibi çeşitli etkenlerden dolayı apoptoz inhibe olmaktadır. Bu durum sonucunda sağ kalımda görev yapan proteinler aşırı ifade edilirken, proapoptotik proteinler ise yetersiz veya inhibe durumda bulunurlar. Kaspazlar, özellikle de sonlandırıcı kaspazlar, tümör hücrelerinde yetersiz şekilde eksprese edilmektedir. Kaspaz genlerindeki delesyonlar veya mutasyonlar çeşitli kanserlerde gözlenmiştir (66).

2.4. OTOFAJİ

Apoptoz tip I programlanmış hücre ölümü olarak sınıflandırılırken, otofaji ise tip II programlanmış hücre ölümü olarak sınıflandırılmaktadır (64). Hücre patojenik ve açlık gibi çevresel baskılayıcılarla karşılaştığında otofaji koruyucu bir rol oynamaktadır (76). Uzun ömürlü proteinlerin, mitokondri gibi hasar görmüş organel ve hücre bileşenlerinin yıkılmasından sorumlu genetik olarak programlanmış fizyolojik bir durumdur (77-79). Otofaji, karsinogenezde iki zıt role sahiptir. Bazı durumlarda tümör baskılayıcı olarak işlev görürken kimi durumlarda ise tümör hücrelerinin hayatta kalmasını destekler niteliktedir. Bu çelişkili işlevden dolayı otofajinin fonksiyonel rolünü daha iyi anlamak için daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir (77).

2.4.1. Otofajik Hücre Ölümü (Tip II hücre ölümü)

Otofaji açlık, hipoksi ve enfeksiyon gibi stres durumlarında uyarılan, olumsuz koşullara adaptif bir yanıt olarak gerçekleşen, lizozomlar vasıtasıyla kontrol altında olan kendini yeme (self-eating) sürecine dayanmaktadır (80, 81).

Otofaji metabolizmanın düzenlenmesi, hücre farklılaşması, yaşlanma, bağışıklık gibi bir takım temel biyolojik süreçlerle ilişkilendirilmiştir. Otofaji, hücrel geri dönüşümde açlık süresince sağ kalımı devam ettirmek için endojen bir mekanizma sağlamaktadır. Bu durum açlık sırasında otofaji aktivasyonunun koruyucu bir rolü olduğunu öne sürmektedir. Örneğin, genetik olarak Atg5'in delesyona uğradığı yani zayıf otofajik aktiviteye sahip farelerin açlık sonrasında kardiyolojik fonksiyon bozukluğuna daha yatkın olduğu görülmüştür. Bu çalışmalar, özellikle açlık döneminde hücre sağkalım süresinin uzatılması için otofajinin bir araç olarak kullanıldığını desteklemektedir (82).

Otofajinin patojenik durumlardaki işlevsel önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Homeostatik rolü ise toksik bir etki sonucunda hastalığın erken aşamalarında hücre fonksiyonunun devamı için koruyucu bir mekanizma sağlayabilmektedir. Hastalığın

ileri evrelerinde otofajinin ortaya çıkması ya hücrel strese karşı adaptif yanıt vermeye devam edebilme ya da patojenik bir duruma karşı yetersiz bir savunmayı temsil etmektedir. Öte yandan otofaji bazı hastalık durumlarında patojenik mekanizmaya katkıda bulunabilmektedir (82).

Otofajik yolaktaki gen ifadesinin baskılanması sonucunda apoptoz sırasında oluşan moleküler değişiklikleri incelemek için otofaji inhibitörleri kullanılmaktadır (76). Otofajiyi baskılamak için kullanılan birçok kimyasal mevcuttur. Birçok farklı çalışmada 3-metiladenin (3-MA), wortmannin, bafilomisin A, klorokin ve LY294002'nin otofaji inhibitörleri olarak kullanıldığı belirtilmiştir (83). 3-MA, otofajik yolağı baskılamakta yaygın olarak kullanılan bir inhibitördür. PI3K'nın aktivitesini inhibe ederek otofagozom ve otofajik kesecik oluşumunu önlemektedir. (76)

2.4.2.Otofajik Hücrelerin Özellikleri

Otofaji, apoptotik hücre ölümünden çeşitli şekillerde farklılık gösterir. Otofaji kaspazdan bağımsız hücre ölümünün bir formu olup, DNA merdivenleri olmaksızın tipik olarak sitoplazmik vaküollerin oluşumu ile karakterizedir (64).

Otofaji, tüm ökaryotik hücrelerde görülen evrimsel olarak korunmuş bir süreçtir (76, 84). Otofaji; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere genel olarak üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (34, 84). Bu üç tip otofajiden şaperon aracılı otofaji, KFERQ motifli proteinlerin lizozom zarına taşınmasını sağlayarak açlığa karşı ikincil bir cevap oluşturmaktadır. Mikrotofaji, lizozom membranının içe doğru çökmesiyle birlikte sitoplazmanın lizozom tarafından sindirilmesidir (84, 85). Otofagozom ve otolizozomlar tarafından hücre içi bileşenlerin parçalanmasına yol açan süreç makrotofaji olarak adlandırılmaktadır. Protein parçalarının ve hasar görmüş organellerin parçalanmasında önemli bir rol üstlenmektedir (84, 85).

Otofajinin gerçekleştiğini gösteren en önemli morfolojik özelliğin, otofagozom olarak isimlendirilen çift membranlı bir vezikülün *de novo* oluşumunun olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, otofagozom yapısının otofajinin ilk oluşan temel fonksiyonel birimi olmadığı ve taşınma işleminin son ürünü olduğu bildirilmektedir. Fagofor, otofagozom öncüsü olup, hasarlı organeller ve istilacı patojenler gibi kargoların ayrılmasından sorumlu dinamik bir zar yapısıdır. Neredeyse tüm hücre içi organellerin fagofor kaynağı olabildiği ileri sürülmektedir. Fagoforun, zar ilavesi ile genişlediği, tamamlandıktan sonra fagoforun kapandığı ve tamamlanmış bir otofagozom

haline geldiği bildirilmektedir. Mayalarda otofagozomun vakuol ile birleştiği, memelilerde ise, otofagozomun doğrudan bir lizozom ile veya bir ara amfizom oluşturmak üzere önce bir geç endozom ile kaynaşabildiği belirtilmektedir. Otofagozom dış zarının lizozom ile birleşmesi sonucunda otolizozom yapısının oluştuğu ve böylece kargoların degradatif lizozomal enzimlere maruz bırakıldığı bildirilmektedir. Degradasyon yani parçalanma ürünleri, özellikle de aminoasitler, ise enerji üretiminde yada biyosentetik reaksiyonlarda substrat olarak kullanılmak üzere sitozole geri verilirler (78).

2.4.3. Otofajik Hücre Ölümünün Moleküler Mekanizması

Tüm hücrelerde bazal seviyelerde gerçekleşen otofaji mekanizması, otofagozomlar olarak adlandırılan sitozolik çiftli membran vasıtasıyla uzun ömürlü proteinleri, hasar görmüş organelleri ile istilacı patojenleri içine almaktadırlar. Bu otofagozomlar daha sonra lizozomlarla kaynaşarak otofagolizozomları oluşturmaktadır (86, 87). Yutulan bileşenlerin parçalanması sonucu makromoleküllerin öncüsü olan besinler oluşmaktadır (86) .

Otofajik regülasyonun moleküler mekanizması, mayada kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve ardından memelilerde otofaji mekanizmasında görevli homolog sistemlerin tanımlanması yapılmıştır. Mayadaki öncü çalışmalar sonucunda otofajiyle ilişkili yolağın indüksiyonu ve ilerlemesinde çoklu adımları görev alan bir dizi (Autophagy-related; Atg) genleri tespit edilmiştir. Otofajiyle ilişkili 35'den fazla genin bulunduğu belirtilmektedir (78, 81, 82, 86, 88, 89).

Otofaji onkogeneizde pro-otofajik genleri aktive edip anti-otofajik genleri ise bloke ederek tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (88). Atg8, otofajinin ilk aşaması için gerekli olan 117 amino asitlik bir proteindir. Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 A/B (LC3), Atg8'in memelilerdeki homologudur ve memeli hücrelerinde otofajinin önemli bir belirteci olarak kabul edilmektedir. Otofagozomlarda sitoplazmik bir vezikül oluşturmak üzere uzayarak açlık ve benzeri durumlarda çift membranlı bir yapının oluşumu başlatmaktadır. LC3 (Atg8) otofagozom zarına bağlanarak otofaji sürecinde çok önemli bir rol oynamaktadır (64). LC3I sitozolik, serbest formu temsil ederken LC3II lipitlenmiş otofagozom zarına bağlı formunu göstermektedir. Memelilerde LC3'ün LC3-I'den (serbest formdan) LC3-II'ye (fosfatidiletanolamin konjuge formu) dönüştürülmesi genel olarak makrotofajinin göstergesi olarak

bilinmektedir. Ayrıca otofagozom oluşumunda görevlidir (82, 86, 90, 91). Otofagozomlar lizozomlarla kaynaşarak tek membranlı otofagolizozomları oluşturmaktadır. Bunun sonucunda ise içeriklerin parçalanmasına neden olmaktadır. PI3K hücre büyümesi ve sağ kalımında önemli bir oynamaktadır. Bu sebeple ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında önemli bir yolak olarak görülmektedir. Atg5 memelilerde gerçekleşen makro otofaji için gerekli bir gendir. (64, 77, 86, 90, 91) Memelilerde bulunan beclin-1 proteini (mayalardaki homologu Atg6) ise otofajinin indüklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (26, 88).

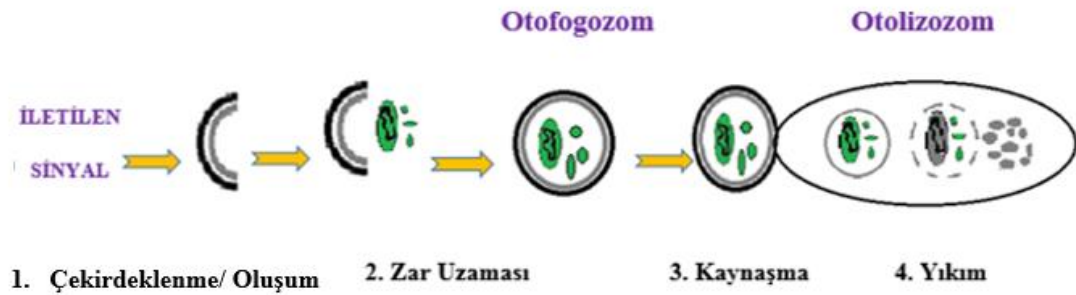
Otofajik yol 4 farklı adımdan oluşmaktadır. İlk aşama, izolasyon membranının yani otofajik keseciğin oluşumudur. Bu aşamaya “çekirdeklenme” adı verilir. Bu aşamada otofagozomal zar (fagofor) oluşumu için proteinler ve lipitler, PAS (pre-otofagozomal yapının toplandığı kısım) adı verilen bölgeye gelirler (Şekil 2.5). Bu bölgenin endoplazmik retikulumdan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Memeli hücrelerinde sınıf III PI3K/beclin-1 bileşenleri olan hVPS34, beclin-1 ve p150 etkinleşerek çekirdeklenmeyi başlatmaktadır (78, 82, 92-94).

İkinci aşama, izolasyon membranının uzamasıdır. Bu aşamaya ise “uzama” adı verilir. Otofagozom zarının uzaması ve kesecik halini alması aşamasında iki ubikutin benzeri sistem görev almaktadır. Birinci yolakta ATG12’nin ATG5 proteinine kovalent olarak bağlanması yer almaktadır. Atg12 ilk olarak Atg7 tarafından aktive edilir, daha sonra Atg12, Atg10’a bağlanır ve Atg7 serbest kalır. Atg12’nin C ucundaki glisin amino asidi, Atg5’in lizin amino asidi ile bağlanır ve Atg10 serbest kalır. Bu sistemde Atg16L, Atg5 ile birleşerek zarın dış kısmına bağlanırlar. İkinci yolakta ise LC3 ve fosfotidiletanolamin (PE)’nin kovalent olarak bağlanması yer almaktadır. LC3’ün C ucundaki arginin amino asidi Atg4 tarafından kesilir ve LC3-I tipi oluşturulur. LC3-I, PE’ye bağlanarak LC3-II’yi oluşturur. Bu bileşenler PAS üzerinde membranın uzamasını sağlamaktadır (78, 82, 92-94).

Üçüncü aşama, otofagozom oluşması ve taşınması yani “olgunlaşma” aşamasıdır. Atg11, Atg13 ve Atg17 ile kompleks oluşturarak otofagozom oluşumunu başlatmaktadır. Otofagozomun oluşumundan sonra HOPS kompleksi, otofagozom ve lizozomların birleşmesi için bağlanma faktörünü oluşturur. HOPS kompleksi, VPS11, VPS16, VPS18, VPS33A, VPS39 ve VPS41 protein alt birimlerinden oluşur ve otofagozom lizozom birleşmesi için bütün HOPS alt birimleri gereklidir. Lizozomal

veziküllerin otofagozom ile kaynaşmasında RAB7 proteini de görev almaktadır (78, 82, 92-94).

Otofagozomun lizozom'a kaynaşması (füzyon) ve lizozomal içeriklerin sindirimi sonucu parçalanma fazı (bozulma) gerçekleşmektedir. Otofagozomun dış zarı lizozom zarı ile kaynaşır ve otolizozom oluşur. Otofagozomun içeriğinin yıkılmasında lizozomal sistein proteazları katepsin B, D, L görev almaktadır. Sonrasında otofaji ile gelen içerik lizozom enzimleri tarafından yıkılarak geri dönüşüm gerçekleşmektedir (78, 82, 92-94). Şekil 2.5'de otofajik vezikül oluşumu ve yıkım aşamalarını gösteren genel şema görülmektedir (95).



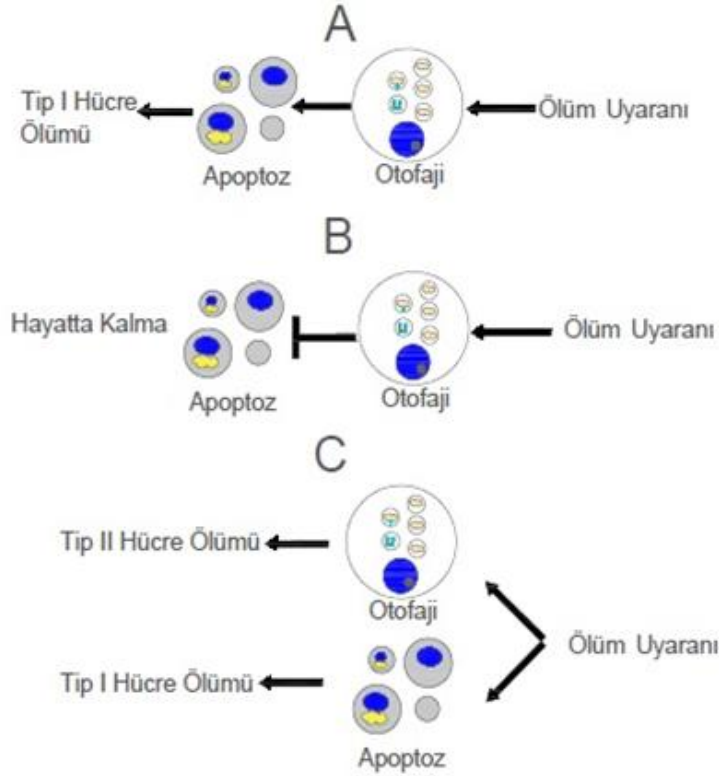
Şekil 2. 5. Otofajik vezikül oluşumu ve yıkım aşamalarını gösteren genel şema (95)

2.5. APOPTOZ VE OTOFAJİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Otofaji, çeşitli durumlarda apoptozdan ayrılan hücre ölüm mekanizmasıdır. Son yıllarda kanser de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik alanlarda otofajinin önemi vurgulanmaktadır. Otofaji mitokondri ve golgi aygıtı gibi sitoplazmik bileşenleri geri dönüştüren evrimsel olarak korunmuş bir yoldur. Bu yüzden açlık, otofajiyi indükleyebilecek tipik bir tetikleyicidir. Bazı çalışmalar, kanser hücrelerinin normal hücrelere göre daha az otofaji gösterdiğini belirtmiştir. Bu da indüksiyonunun anti-kanser terapisi için ilgi çekici bir yöntem olduğunu göstermektedir. Otofaji, tamoksifen, γ ışınları ve rapamisin gibi çeşitli ajanlar tarafından indüklenebilir, ancak çok az sayıdaki çalışmada otofajinin doğal maddeler tarafından indüklendiği araştırılmıştır (64).

Otofaji ve apoptoz arasında en az üç farklı bağlantı gözlenmiştir. Otofaji; apoptoza paralel olarak hücre ölümüne yol açabileceği gibi, apoptozu baskılayarak hücrenin

hayatta kalmasını sağlayabilir ya da apoptoz için bir ön koşul olabilmektedir (96). Apoptoz ve otofaji arasındaki ilişki Şekil 2.6’da gösterilmektedir (95).



Şekil 2.6. Programlı hücre ölümü apoptoz/otofaji arasındaki ilişki. (a) Otofaji apoptozun oluşması için gerekli olabilir (b) Otofaji apoptozu baskılayarak hücre ölüm mekanizmasına karşı ters etki oluşturabilir (c) Apoptoz ve otofaji birbirinden bağımsız olarak hücre ölümüne yol açabilir (95).

Otofajik hücre ölümünü (tip II programlı hücre ölümü) apoptozdan ayıran özellik, artmış otofajik vakuol birikiminin olması ve kaspaz aktivasyonunun olmamasıdır. Apoptozda, sitoskelette çökme ve nükleer yoğunlaşma meydana gelirken otofajik hücre ölümünde ise kromatin ve hücre iskeleti korunarak organel kaybı oluşmaktadır. Otofajiyi ve apoptozu düzenleyen temel mekanizmalar arasında çapraz bir bağlantı olduğu açıkça görülmektedir. Örneğin, Atg5, DISC’in bir bileşeni olan FADD proapoptotik protein ile etkileşime girebilmektedir. Bu da apoptozdaki ekstrinsik yolun düzenlenmesinde Atg5’in rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca Beklin 1 anti apoptotik Bcl-2 ile kompleks oluşturmaktadır. Beklin1’in Bcl-2’e bağlanmasıyla otofajiyi baskıladığı belirtilmiştir. Farklı birçok araştırma sonucunda otofaji, spesifik uyarılara, çevre şartlarına ve hücre türüne bağlı olarak ya hücre sağkalımını ya da hücre ölümünü

teşvik etmektedir. Otofajinin hastalık patogenezindeki önemi hastalığın derecesine, zararlı uyarıların yapısına, süresine bağlı olarak değişebilmektedir (82, 94).

2.6. FLAVONOİDLER

Polifenoller bitkilerde bol miktarda bulunup insan sağlığı için yararlı pek çok etkilere sahiptir (21, 97). Szent-Györgyi 1936 yılında iki flavanon karışımının insanlarda kılcal geçirgenliği azalttığını belirtmiş ve sonuçta flavonoidleri vitamin P olarak adlandırmıştır. Bununla birlikte, flavonoidler vitamin tanımına uymadığından dolayı P vitamini terimi terk edilmiştir (98).

Flavonoidler, 10.000'den fazla yapıyı kapsayan geniş bir bileşik grubu olup bitkilerden elde edilen ikincil metabolitlerdir. Bitkisel gıdalar ve içeceklerde (meyve, sebze, tahıl, baharat, baklagil, fındık, zeytin, çikolata, çay, kahve ve şarap) bol miktarda bulunmaktadır (21, 99). Flavonoidlerin damarlı bitkilerin tümünde, mantarlarda nadiren alg veya bakterilerde ise olmadığı belirtilmiştir (100). Diyetle birlikte alınan polifenoller bol miktarda antioksidan içeriğine sahiptir. Ultraviyole radyasyon ve patojenlere karşı koruyucu bir etki göstermektedirler. Epidemiyolojik araştırmalar, ortaya çıkan çeşitli hastalıkların polifenollerden zengin bir diyet sayesinde önlenebileceğini göstermiştir (21). Antioksidan özelliklerinin yanında anti inflamatuvar, antimikrobiyal, anti alerjik, antiviral, anti kanser, immün düzenleyici ve anti trombosit agregasyonu olarak bilinen insan sağlığı üzerinde avantajlı pek çok etkileri mevcuttur (21, 101). Bu nedenle polifenoller, kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etmek için kullanılabilir. Polifenoller, insan vücudunda zayıf emilme etkisinin yanında hızlı bir şekilde atılma (yüksek metabolizma hızına) sahiptir. Kanser hücrelerine verilen dozun etkili olması gerekmektedir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için tedavide tek bir polifenol yerine diğer anti kanser ilaçlarıyla veya farklı polifenoller ile kombinasyon oluşturularak kullanılması önerilmektedir (21).

2.6.1. Flavonoidlerin Genel Özellikleri ve Yapısı

Flavonoidler, hidroksil, metil, galloil, glukozil, açıl gibi kısımlar içeren polifenolik flavan iskeletine dayanan bir bileşik grubudur. Flavonoidler, metal iyonları, çeşitli moleküller ve pek çok flavonoidler ile kompleks oluşturabilir. Flavonoidler ayrıca çeşitli biyolojik ve kimyasal koşullar altında polimerler ve oligomerler oluşturabilirler (100). Son zamanlarda, bitkilerden elde edilen doğal ürünler, kemoterapötik potansiyelleri nedeniyle dikkat çekmiştir. Flavonoidler antikanser, antifungal, antiviral,

antioksidan, antiinflamatuvar, immün artırıcı etkileri ile çeşitli biyolojik özellikler sergileyen bitkisel sekonder metabolitlerdir (102).

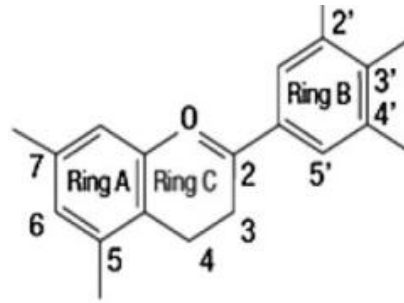
Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve fenolik alkoller gibi bir fenol halkasına sahip çok çeşitli moleküller içermektedirler. Polifenoller fenol halkalarının sayısına göre bir a  sınfa ayrılır (103).

Flavonoidler ortak bir C6-C3-C6 (benzo- -pyrone) karbon iskeletine sahip yapısal olarak çok çeşitli, geniş heterojen gruplar içeren polifenollerdir. Hidroksilasyon, metoksilasyon, glikozilasyon veya glukuronizasyonun gibi kısımları bulundurmalarına bağlı olarak meydana gelmektedirler. Bu oluşum sonucunda polifenol ailesi diğer bitki grupları içerisinde en büyük grubu oluşurmaktadır. Polifenollerin çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahip olması bakımından günümüze kadar tanımlanmış 6000'den fazla flavonoid olduğu bilinmektedir (104).

2.6.2. Polifenollerin Sınıflandırılması

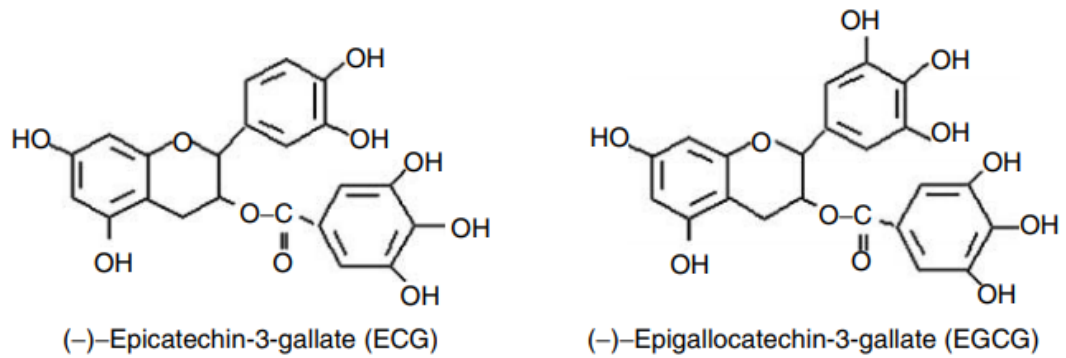
Polifenoller çok çeşitli bileşiklerden oluşmaktadır. Bu bileşikler bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan en az bir aromatik halkaya sahiptirler. Polifenoller bir halkayı diğerine bağlayan yapısal elementlere ve içerdikleri fenol halkalarının sayısına göre sınıflandırılmaktadır. Polifenollerin ana sınıfları; flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ve lignanlardır (21, 105).

Flavonoidler: Flavonoidlerde şikimik asit ve asilpolimalonat yolunun biyosentezinde fenilalaninden oluşmaktadır. C6-C3-C6 konfigürasyonunda düzenlenen on beş karbon atomundan oluşan düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Flavonoidler, 3-karbon köprüsü ile bağlanmış 2 aromatik halkaya (A ve B halkaları) sahiptirler. Ayrıca flavonoidler B ve C halkaları arasında çeşitli bağ yapısından ve C halkasında farklı fonksiyonel grupların bulunmsından dolayı farklı alt sınıflara ayrılabilir (şekil 2.7) (103).



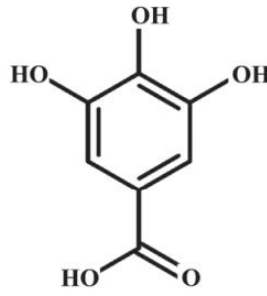
Şekil 2.7. Flavonoidlerin genel yapısı (103).

Flavonoidlerin en önemli alt sınıfları, flavonoller, flavonlar, flavan-3-ols, antosiyaninler, flavanonlar ve izoflavonlardır (21, 101). Epikateşin-3-gallat (ECG) ve epigallokateşin-3-gallat (EGCG) flavonoidler sınıfına aittir. ECG ve EGCG'nin kimyasal yapısı Şekil 2. 8' de gösterilmiştir (106).



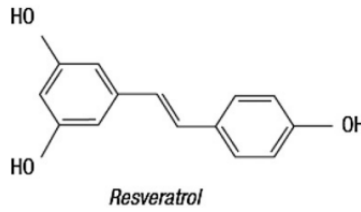
Şekil 2.8. Epikateşin-3-gallat epikateşin-3-gallat (ECG) ve epigallokateşin-3-gallat (EGCG) kimyasal yapısı (106).

Fenolik Asitler: Fenolik asitler, sinamik asit ve benzoik asitlerin türevleridir. Hidroksibenzoik asitler C6-C1 yapısına sahiptirler, birkaç yenilebilir bitkide bulunurlar ve yüksek besin değeri taşımazlar. Fenolik asitlerden en yaygın olanı protokateşik asit ve gallik asittir (Şekil 2.9). Üzüm, şarap, mango, siyah ve yeşil çayda bulunmaktadır. Gallik asit kompleks şeker esterleri olarak oluşan hidrolize olabilen tanenlerin (gallotannin ve elagitannin) biyosentetik öncülüdür. Gallotanninler mangoda bulunurken elagitanninler çilek, ahududu ve böğürtlen gibi kırmızı meyvelerde bulunmaktadır (21). Gallik asitin kimyasal yapısı Şekil 2.9' da gösterilmiştir (107).



Şekil 2. 9. Gallik asitin kimyasal yapısı. (107)

Stilbenler: Stilbenler, patojenlere, hastalıklara, hasarlara ve stres koşullarına karşı savunma olarak bitkiler tarafından üretilen (C6-C2-C6) fitoaleksinlerdir. Ana üyesi resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) olup, diyet ile sınırlı miktarda alınır. Resveratrol, cis ve trans izomerlerinin yanı sıra konjuge türevleri de (trans resveratrol-3-O-glukosid) bulunmaktadır. Üzüm, çilek, erik, yer fıstığı ve çam fıstığında bulunan resveratrol antioksidan, anti inflamatuvar, antikanser ve yaşlanma karşıtı gibi değerli biyolojik özelliklere sahiptir (21). Resveratrol'ün kimyasal yapısı Şekil 2.10' da gösterilmiştir (103).



Şekil 2.10. Resveratrol'ün kimyasal yapısı (103)

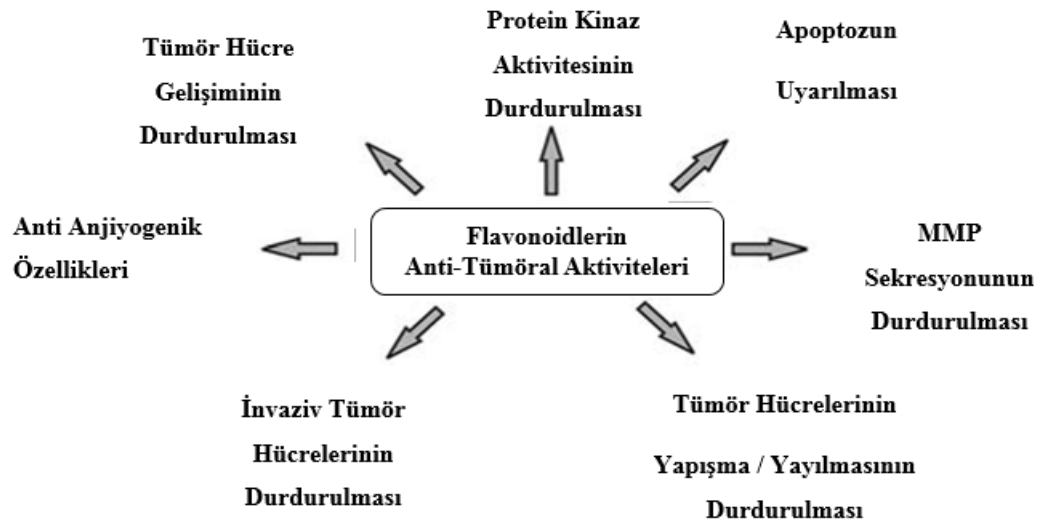
Lignanlar: Lignanlar, fitoöstrojenler olarak östrojenlerle yapısal benzerlikleri olan, bitki kökenli bileşikler olup izoflavonlara benzer şekilde sınıflandırılmaktadırlar. Bu grup 2 fenilpropan biriminin oksidasyonu ile oluşmakta ve yaygın olarak doğada serbest formda bulunmaktadır. Lignanlar keten tohumunda yüksek miktarda; bakliyat hububat, sebze ve meyvelerde ise düşük konsantrasyonda bulunmaktadır (21).

2.6.3. Flavonoidlerin Antikanser Aktiviteleri

Yapılan çeşitli çalışmalarda meyve, sebze ve tüm tahılların biyoaktif fitokimyasal içeriğe sahip olmalarının yanı sıra antiproliferatif ve antineoplastik özelliklere sahip oldukları da gösterilmiştir. Bu biyoaktif fitokimyasal maddelerin kronik hastalıkların riskini azaltabilmesinin yanında, hücresel sistemlerin oksidatif hasardan korunmasını da

sağladığı belirtilmektedir. Yapılan *in vivo* bir çalışmada kersetin ve diğer flavonoidlerin kemirgenlerde tümör oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (108).

Flavonoidlerin kansere karşı koruyucu etkisini kanıtlamak için çok sayıda epidemiyolojik çalışma yapılmıştır (109). Epidemiyolojik verilere göre, diyetle birlikte fazla miktarda alınan flavonoidlerin kanser riskini azalttığı belirtilmektedir (110). Metillenmiş flavonoidlerin, lösemi ve hepatokarsinomlar gibi tümör hücrelerindeki sitotoksiteyi artırabildiği gözlenmiştir (22). Flavonoidlerin antitümöral aktiviteleri Şekil 2.11’ de gösterilmiştir (111).



Şekil 2.11. Flavonoidlerin antitümöral aktiviteleri (111).

2.7. KEÇİBOYNUZU (*Ceratonia siliqua* L.) BİTKİSİ VE ÖZELLİKLERİ

Ceratonia siliqua L. (*C. siliqua*) birçok Akdeniz ülkesinde şekerleme ve içecek hazırlamada kullanılan doğal terapötik bir bitkidir. Gıda endüstrisinde ise tohumlarından elde edilen reçine kullanılmaktadır (8, 112). Şekil 2.12’ de *C. siliqua* ağacının yaprakları gösterilmektedir (113).



Şekil 2.12. *Ceratonia siliqua* L. ağacının yaprakları (113)

C. siliqua ülkemizde keçiboynuzu ağacı ya da harnup ağacı olarak da bilinmektedir. Keçiboynuzunun yaprakları ve pulpaları fenolik bileşikler bakımından zengin olup servikal adenokarsinoma, prostat, meme, kolon gibi çeşitli kanser hücre hatlarında antioksidan, antiproliferatif, antimikrobiyal, antidepresan ve antikanser etkiye sahip olduğu bilinmektedir (114, 115). Bu gıdaların tüketilmesinin belli kanser türlerinde ve kalp hastalıklarında mortalite riskini azaltabildiği belirtilmektedir. Oral yolla alınan polifenollerin karsinogeneze karşı koruma sağladığı bildirilmektedir (8, 13).

Keçiboynuzuna ait meyve kabuğunda (tohum zarflarında) protein, yağ, karbonhidrat, polifenol ve taninler bulunmaktadır. Ağacın yaprakları, ülkemizde geleneksel olarak ishal kesici ve idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır (9, 114). Yine yaprakları yüksek antioksidan özelliğine sahiptir. Meyvelerinin ise öksürüğe karşı iyi geldiği bilinmektedir. Sakızı dondurma, tatlılar ve çorbalar gibi çeşitli ürünlerde doğal gıda katkı maddesi olarak kullanılan bir galaktomannandır. Meyvelerinde şeker içeriği yüksek olduğundan dolayı tatlılar, bisküviler ve işlenmiş içeceklerde uzun süredir kullanılmaktadır (112). Ayrıca mikroorganizmalar için büyüme ortamı ve gıda stabilizötörü olarak kullanılırken tekstil, kozmetik, ilaç endüstrisi gibi pek çok kullanım alanına da sahiptirler (9).

2.7.1. *C. siliqua*'nın Anatomisi ve Taksonomisi

C. siliqua Akdeniz bölgesinde yaygın olarak yetişen sürekli yeşil çalı ya da ağaç formunda olan Fabaceae ailesine ait baklagillerin bir alt ailesinden Caesalpinaceae'ye aittir (112).

C. siliqua, Akdeniz bölgesine araplar tarafından getirilip bu bölgede yayılış göstermiştir. Boyu 6-12 m arasında yüksekliğe ulaşır ve dalları yer seviyesine uzanmaktadır. Meyvesi kahverenkli olup boyutu bazı durumlarda 25 cm'i bulmaktadır. Keçiboynuzu meyvesinin iki temel bileşeni mevcuttur. Bunlar kabuk (tohum zarfı) ve çekirdekleridir. Meyvenin ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturan çekirdekler esas olarak galaktomannanlardan oluşmaktadır (9).

2.7.2. *C. siliqua*'nın İçeriğinde Bulunan Aktif Bileşikler

C. siliqua'nın meyve kabuğu ve yapraklarında kersetin, gallik asit, kateşin, EGCG ve ECG gibi antioksidan özelliğe sahip fenolik bileşikler tespit edilmiştir. (8, 116)

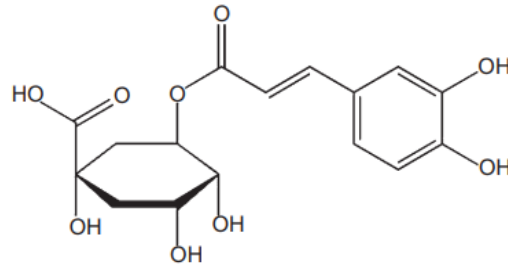
Kanser tedavisinin yüksek maliyetli olmasından dolayı son zamanlarda özellikle doğal olarak bulunan ürünlerin koruyucu özelliği vurgulanmaktadır. Epidemiyolojik ve klinik öncesi araştırmalar, yeşil çaydan elde edilen polifenollerin kemopreventif ve antitümör etkilere sahip olduğunu göstermiş ve fenolik bileşiklerin bu özelliklerinden yararlanılarak kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması gerektiğini belirtilmiştir (117).

Gallik asit (GAc) (3, 4, 5- trihidroksibenzoik asit), diyetle yaygın olarak bulunan bitkisel bir fenolik bileşiktir (118). Çeşitli doğal ürünlerde ve yeşil çay, üzüm, çilek, muz gibi pek çok farklı meyvede bulunmaktadır. Serbest radikalleri yok edici olmasının yanında lösemi, akciğer kanseri ve kolon adenokarsinoma hücre hatlarında apoptoz indükleyici ajan olarak işlev gördüğü belirtilmektedir (119). Kanser ve depresyon gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan bir fenolik bileşik olduğu belirtilmektedir. Bunun yanı sıra anti mikrobiyal, antimutagenik, antianjiyogenik ve antiinflamatuvar ajanlar olarak da bilinmektedir (120). GAc'nin kanser gelişiminin önlenmesinde önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (119).

Yeşil çay polifenollerinde arasında, EGCG ve ECG' nin tümör hücreleri üzerinde güçlü antiproliferatif etki gösterdiği belirtilmektedir. HCT-116 ve SW-480 insan kolorektal kanser hücrelerinde G1 fazında hücre döngüsünü durdurduğu ve hücrelerde apoptozu uyardığı belirtilmiştir. ECG'nin prostat, pankreas, kolon, karaciğer, akciğer, meme ve melanoma dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarında hücre büyümesini inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca ECG' nin malign melanoma B16F10 hücrelerinde metastatik tümör yayılma sürecinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (121).

EGCG akciğer kanserinde terapötik bir ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bir fincan yeşil çayda 100-150 mg EGCG polifenolü bulunmaktadır. Bu oran çayda bulunan tüm polifenollerin % 50'sinden fazlasını oluşturmaktadır (122). EGCG'nin transmembran reseptör kinazlar ve diğer anahtar proteinlerle ilgili moleküler hedeflerde rol alabileceği belirtilmektedir (123). Anjiyogenez, telomeraz aktivitesi, apoptoz, hücre döngüsü ve karsinogenezle ilgili sinyal iletim yollarında rol oynadığı gösterilmiştir. EGCG'nin potansiyel bir antitümöral ajan olarak apoptozun uyarılmasından sorumlu olabileceği ve kardiyovasküler hastalıkları önlemede etkili bir ajan olduğu belirtilmektedir (32, 117, 122).

Klorojenik asitin, kafeik asit ve kuinik asitin esterleşmesiyle oluştuğu bilinmektedir. Diyetle fazla miktarda bulunan polifenolik bir bileşik olup kanser hücreleri üzerinde antioksidan ve antikanserojenik etki gösterdiği belirtilmiştir (124). Klorojenik asitin kimyasal yapısı Şekil 2.13' te gösterilmektedir (124).



Şekil 2.13. Klorojenik asitin kimyasal yapısı (124).

2.7.3. *C. siliqua*'nın Farmakolojik Aktiviteleri

C. siliqua ağacı, antidiyare, antibakteriyel, antiülser, antioksidan, antiinflamatuvar, antidepresan, antitümöral, anksiyolitik sedatif, antikonstipasyon (kabızlık), kemopreventif ve kolesterol düşürücü olarak birçok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere farklı farmakolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Diyetle alınan keçiboynuzunun gastrointestinal sistem üzerinde rahatlatıcı bir etkiye sahip olduğu ve yüksek antioksidan içeriği nedeniyle birçok hastalığın önlenmesinde doğal bir takviye olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (125).

Keçiboynuzu yaprağında bulunan polifenollerin kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda yararlı olabileceği görülmüştür. Keçiboynuzu ağacının meyvesinden elde

edilen metanol ekstraktının meme kanseri (MDA-MB-231) ve insan servikal adenokarsinoma hücre hattında (HeLa) hücre canlılığını güçlü bir şekilde azalttığı yine keçi boynuzu yaprağının metanol ekstresinin ise, HeLa hücreleri üzerinde anti proliferatif ve anti kanser etkilere yol açtığı gözlenmiştir (126).

Ceratonia siliqua ekstraktlarının genotoksitesinin, murin lösemi (L1210) hücrelerinde çekirdek DNA'sının yıkımı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. *C. siliqua*'nın sulu ekstrelerinin güçlü antioksidan ve genoprotektif aktivite sergilediği görülmüştür (115). Yine *C. siliqua*'nın meyve kabuğu ve yapraklarından elde edilen sulu ekstre ile sıçan hepatosellüler karsinoma hücrelerinde (T1) kaspaz 3 yolunu aktive ederek apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (8, 13).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- LC/MS/MS Cihazı(Shimadzu, LC/MS-8040)
- Multifonksiyonel Mikroplate Okuyucu (BioTek, Synergy HT)
- Real Time-PCR (Roche, Light Cycler480)
- Hücre Sayım Cihazı (Roche-Innovatis, Cedex XS)
- Thermal Cycler (Biorad, T100)
- Nanodrop (Denovix, DS-11)
- Western Blot Dikey Elektroforez Sistemi (BioRad, Mini-Protean Tetra System)
- Güç Kaynağı (BioRad, PowerPac™ Basic)
- CO₂'li inkübatör (New Brunswick Galaxy, 170R)
- Laminar Akım Kabini (Safe Fast Elite, 212S)
- Jel Görüntüleme Sistemi (BioRad, ChemiDoc MP Sistem)
- Invert Mikroskop (Nikon, TS100)
- Soğutmalı Santrifüjler (Hettich Universal 320R ve Micro 200R)
- Multispin cihazı (Gilson, GmClab)
- Vorteks (Wise Mix VM-10)

- Hassas terazi (Ohaus, PA214C)
- Terazi(Ohaus, PA4102C)
- Dijital ısıtıcı/soğutucu kuru blok (Bioer, CHB-202)
- Etüv (EcoCell)
- Otoklav (Hirayama, HMC HV 50)
- Isıtıcı ve Manyetik karıştırıcı (Heidolph, MR Hei-Standard)
- pH metre (Mettler Toledo, SC S210U)
- Su banyosu (Memmert, WNB 29)
- Çalkalayıcı (IKA KS130 Basic)
- Multipipet ve Mikropipet Seti (Eppendorf, Gilson)
- -80°C dondurucu (New Brunswick Scientific U570-86)
- -20°C Derin dondurucu (Vestel)
- Buzdolabı (Arçelik)

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Besiyeri (Sigma, D5546)
- Fenol Redsiz Besiyeri (Capricorn Scientific, DMEM-HXRXA)
- Fetal bovine serum (Thermo Fisher, 10500056)
- Dimetil Sulfoksit (DMSO) (Sigma, 41640)
- L-Glutamin (Biological Industries, 03-020-1B)
- Penisilin-Streptomisin (Biological Industries, 03-031-1C)
- Tripsin-EDTA (Sigma, T4049)
- Etanol (Merck, K21078586)
- Metanol (Merck, 502K5275408)
- TC Flask T75 (Sarstedt, 83.3911.002-100)
- Hücre Kültürü Petri Kabı 100x20 mm (Sarstedt, 83.1802-100)
- TC 96 Kuyucuklu Mikroplate (Sorfa,SCP-11-096)

- Cedex Smart Slides (Roche, 05650801001)
- Steril Tek Kullanımlık Plastik Pipetler 5ml'lik (Orange Scientific, PN5E1)
- Steril Tek Kullanımlık Plastik Pipetler 10ml'lik (Orange Scientific, PN10E1)
- Steril Tek Kullanımlık Plastik Pipetler 25ml'lik (Sarstedt, 86.1685.020)
- Falcon Tüp Steril 15ml'lik (Isolab, 078.02.007)
- Falcon Tüp Steril 50ml'lik (Isolab,078.02.008)
- Bisinkoninik asit (BCA) protein analiz kiti (Thermo Fisher, 23225)
- Trizol kit (Roche, 11 667 157 001)
- Proteaz/Fosfataz İnhibitör Kokteyl (Boster, 1182-1)
- RIPA Lysis Buffer (Santa Cruz, SC-24948)
- PCR Tüpü 0.2 ml'lik (BIOLOGIX, 60-0082)
- Light Cycler 480 Prob Master Kiti (Roche, 04707494001)
- Light Cycler 480 96 Kuyucuklu Plate (Roche, 04729692001)
- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, 05091284001)
- Bax geni (Roche, RealTime ready Katalog Assays 102861)
- Bcl-2 geni (Roche, RealTime ready Katalog Assays 100083)
- Kaspaz 3 geni (Roche, RealTime ready Katalog Assays 148589)
- GAPDH geni (Roche, RealTime ready Katalog Assays 141139)
- 1-Butanol (Fluka, 437603)
- 2-Merkapta etanol (Sigma, M3148)
- 2- Propanol (Riedel-de Haen, 24137)
- Bisakrilamid (AppliChem, A3636)
- Kloroform(Sigma,)
- Gliserol (Merck, 1040922511)
- Glisin (Merk, 1042011000)
- N,N,N,N-Tetrametil-etilenediamin (Sigma,T9281)

- N,N -Metilen-bisakrilamid (Sigma, M7256)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma, 71725)
- Süt Tozu (Fluka, 70166)
- 4x Laemmli Sample Buffer (Bio Rad, 161-0747)
- Tris Hidroklorid (Amresco, 0234)
- Trizma Baz (Sigma, T1503)
- Tween 20 (Sigma, P5927)
- Kemilüminesans Tesbit Etme Ayırıcı (ECL) (Bio Rad, 1705061)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma, M5655)
- B-Actin (D6A8) Monoklonal Antibadi (Cell Signaling, 8457)
- Bax Poliklonal Antibody (Cell Signaling, 2774)
- Bcl-2 Poliklonal Antibadi (Cell Signaling, 2872)
- Kaspaz-3 Poliklonal Antibadi (Cell Signaling, 9662)
- LC3A/B Poliklonal Antibadi (Cell Signaling, 4108)
- Atg5 Poliklonal Antibadi (Cell Signaling, 2630)
- Beklin-1 Poliklonal Antibadi (Cell Signaling, 3738)
- 3-Metiladenin (Sigma, M9281)
- QVD-OPh hidrat (Sigma, SML0063)
- Resveratrol (Santa Cruz, SC-200808)
- Taxol (Santa Cruz, SC-201439)
- Epikateşin Gallat (ECG) (Sigma, E3893)
- Epigallokateşin Gallat (EGCG) (Sigma, E4143)
- Gallik Asit (GAc) (Fluka, 91215)
- Klorojenik Asit (Sigma, C3878)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. *Ceratonia siliqua* (*C. siliqua*) Yaprak Ekstrelerinin Hazırlanması

Çalışma kapsamında daha önceki çalışmalarımız için *C. siliqua* yapraklarından hazırlanmış olan %70'lik metanol ve %70'lik etanol ekstreleri kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında, olgun (yıllardır meyve veren) ve genç (henüz hiç meyve vermemiş) ağaç olmak üzere iki farklı *C. siliqua* ağacına ait yapraklardan hazırlanmış olan %70'lik metanol ve %70'lik etanol ekstreleri fenolik bileşik içerikleri bakımından birbirleri ile karşılaştırıldılar. Böylece, olgun ve genç *C. siliqua* ağaçlarına ait yapraklar arasında fenolik bileşik içeriği bakımından bir farklılık bulunup bulunmadığının belirlenmesi ve çalışmaya en yüksek fenolik içeriğe sahip ekstre ile devam edilmesi amaçlandı (127, 128).

%70'lik Metanol Ekstrelerinin Hazırlanması; Genç ve olgun iki farklı *C. siliqua* ağacına ait olan yapraklar mekanik bir milde ayrı ayrı öğütülerek toz haline getirildi. Elde edilen *C. siliqua* yaprak tozlarından 100'er gram alınarak, %70'lik metanol (3x0.5 L) içinde 37°C'de 3 gün ekstre edildi. Daha sonra elde edilen sıvı ekstreler birleştirilerek ekstrelerden metanol vakum altında uzaklaştırıldı ve ardından ekstreler liyofilize edildi. Böylece Genç ağaç Yaprak Metanol (GYM) ve Olgun ağaç Yaprak Metanol (OYM) ekstre örnekleri elde edildi. Liyofilize edilen örnekler, analiz anına kadar -20°C'de saklandı (129).

%70'lik Etanol Ekstrelerinin Hazırlanması; Genç ve olgun iki farklı *C. siliqua* ağacına ait olan yapraklar mekanik bir milde ayrı ayrı öğütülerek toz haline getirildi. Elde edilen *C. siliqua* yaprak tozlarından 100'er gram alınarak, %70'lik etanol (3x0.5 L) içinde 37°C'de 3 gün ekstre edildi. Daha sonra elde edilen sıvı ekstrelerden etanol vakum altında uzaklaştırıldı ve ardından ekstreler liyofilize edildi. Böylece Genç ağaç Yaprak Etanol (GYE) ve Olgun ağaç Yaprak Etanol (OYE) ekstre örnekleri elde edildi. Liyofilize edilen örnekler, çalışmada kullanılmak üzere -20°C'de saklandı (128, 130).

3.2.2. *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerindeki Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı. 6 mL distile su içeren 10 mL'lik kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi. 1 dakika sonra 1.5 mL %20'lik sulu Na₂CO₃ ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlandı. Kontrol olarak ekstre

içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 25 °C’de 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm’de absorbansı ölçüldü ve toplam fenolik madde miktarları gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar gallik asite eşdeğer (GAE) olarak mg GAE/g_{ekstre} olarak verildi (Tablo 4.2). Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve sonuçlar ortalama değerler olarak verildi (128).

3.2.3. *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerindeki Toplam Flavonoid Miktar Tayini

1 ml ekstre t=0. dakikada 0.3 ml %5’lik NaNO₂ çözeltisi ile karıştırıldı, t=5. dakika’ da 0.3 ml %10’luk AlCl₃.6H₂O çözeltisi ilavesinden sonra, t=6. dakika’da 2 ml 1 M NaOH çözeltisi eklendi ve 2.4 ml su ilave edilerek karıştırıldı. 510 nm’de köre karşı absorbans ölçüldü ve Kateşinin kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı. Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoid miktarları kateşine eşdeğer olarak (CE) mg CE/g_{ekstre} olarak verildi (Tablo 4.2). Bütün ölçümler 3 paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler alındı (131).

3.2.4. LC/MS/MS Analizi ile *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerinin Fenolik Bileşik İçeriklerinin Belirlenmesi

C. siliqua yapraklarından hazırlanan ekstrelerdeki gallik asit (GAc), epikateşin-3-gallat (ECG), epigallokateşin-3-gallat (EGCG), kateşin (C), epikateşin (EC), epigallokateşin (EGC), elajik asit (EAc), teofilin (T), kafein (CA) ve klorojenik asit (ClAc) içerikleri LC/MS/MS cihazı kullanılarak analiz edildi. LC/MS/MS analizinde, ekstrelerdeki bileşiklerin içerikleri kütle/yük (m/z) oranları karşılaştırılarak kesin olarak teşhis edildi ve ppb düzeyinde miktarları standartlara karşı tayin edildi. Bütün standart ve örnek çözeltiler üçer kere analiz edilerek ortalama değerler verildi.

LC/MS/MS Analiz Şartları;

Cihaz : Shimadzu LC/MS 8040

İyonlaşma Modu : Elektro Sprey İyonizasyon (ESI), negatif iyonlaşma

Kolon : Restek C18 (3.0 x 70 mm, 3 µm partikül çapı)

Kolon Sıcaklığı : 40 °C

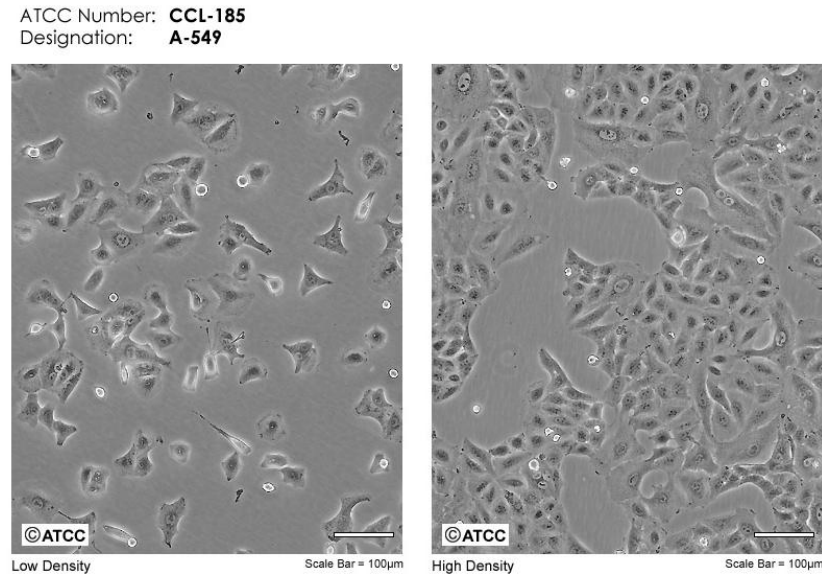
Akış hızı : 0.4 mL/dk

Hareketli Faz : A) %1 asetik asitli su; B) %1 asetik asitli metanol

Akış Programı : %30 B ile başlanıp ilk 3 dk'da %60 B'ye çıkıp, sonraki 10 dk'da %60 B'ye çıkar

3.2.5. A549 Hücre Kültürü

Çalışmada Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilen insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı, A549 hücreleri (ATCC®, CCL185™) kullanıldı. A549 hücreleri, 75 cm²'lik flaskta, %10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco Modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM) besiyerinde 37°C'de ve % 5 CO₂'li ortamda %80-90 yoğunluğa ulaşmaya kadar kültüre edildiler. Hücrelerin besiyerleri iki günde bir değiştirilerek canlılıkları, çoğalma hızları ve morfolojik yapıları invert mikroskop ile takip edildi. Gerekli yoğunluğa ulaşan hücreler, % 0.25 Trypsin-EDTA kullanılarak kültür kabı tabanından uzaklaştırıldılar. Kültür kaplarından toplanan hücrelerin bir kısmı -80 derecede donduruldu, bir kısmı da başka bir flaska pasajlanarak kültüre devam edildi. Şekil.3.1'de A549 hücrelerinin görünümü gösterilmektedir (132).



Şekil 3. 1 A549 hücrelerinin görünümü (132).

3.2.6. MTT (3(4,5-dimethyl thiazolyl-2)2,5-diphenyl tetrazolium bromide) Hücre Canlılığı Testi

MTT deneyi, sarı renkli tetrazolyum tuzunun (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından indirgenerek mor renkli formazan kristaline dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır (133). Bu sebeple, MTT analizi canlı

hücrelerin mitokondrial aktivitesi üzerinden hücre canlılığının saptanmasında kullanılmaktadır (134).

Çalışma kapsamında etkisi araştırılan test maddelerinin [*C. siliqua* yaprak ekstreleri (GYE ve OYE ekstreleri) ile ekstrelerin içeriğinde bulunan saf bileşiklerin (GAc, ECG, EGCG ve ClAc)] A549 hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkileri MTT testi kullanılarak doza ve zamana bağlı olarak analiz edildi. Çalışma kapsamında etkisi araştırılan GYE ve OYE ekstreleri DMSO içinde, saf bileşikler ise çözünürlüklerine göre deiyonize su yada PBS tamponu içinde çözündüler.

MTT analizinde, A549 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kabına her bir kuyucukta 12.500 hücre olacak şekilde 100 µl fenol kırmızısı içermeyen DMEM besiyeri içerisinde ekildiler. Hücreler, kültür kabı tabanına tutunmaları için 37°C’de ve % 5 CO₂’li etüvde 24 saat inkübe edildiler. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler *C. siliqua* yaprak ekstrelerinin farklı konsantrasyonları ile 6, 12, 24 ve 48 saat, ekstrelerin içeriğinde bulunan saf bileşiklerin farklı konsantrasyonları ile de 24 saat inkübe edildiler. Hücre canlılığına etkisi araştırılan ekstreler için giderek artış gösteren 100-400 µg/mL arasındaki konsantrasyonlar (100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 µg/mL), saf bileşikler için de yine giderek artış gösteren 20-200 µM arasındaki (20, 40, 80, 120, 160, 180 ve 200 µM) konsantrasyonlar kullanıldı ve tüm saf bileşik konsantrasyonları µg/mL cinsinden hesaplandı. Buna göre GAc için 3.4-34 µg/mL arasındaki (3.4, 6.8, 13.6, 20.4, 27.2, 30.6, 34 µg/mL), EGCG için 9.1-91.6 µg/mL arasındaki (9.1, 18.3, 36.6, 55, 73.3, 82.5, 91.6 µg/mL), ECG için 8.8-88.4 µg/mL arasındaki (8.8, 17.6, 35.3, 53.1, 70.7, 79.6, 88.4 µg/mL) ve ClAc için 7.0-70.8 µg/mL arasındaki (7.0, 14.1, 28.3, 42.5, 56.6, 63.7, 70.8 µg/mL) konsantrasyonlar kullanıldı. Her bir test maddesinin her bir konsantrasyonu için 3 kuyucuk kullanıldı ve hücelere her bir konsantrasyondan 100 µL ilave edildi. İçerisinde hücre bulunan fakat test maddesi içermeyen 3 kuyucuğa sadece besiyeri eklendi bu kuyucuklar çalışmada kontrol grubu olarak kullanıldı. İçerisinde hücre ve test maddesi içermeyen 3 kuyucuğa da sadece besiyeri eklendi ve bu kuyucuklar da çalışmada negatif kontrol olarak kullanıldı. Çalışılan ekstreler DMSO içinde çözünmekle birlikte, DMSO’nun kültür ortamındaki final konsantrasyonu % 1’den daha düşüktü. Bununla birlikte, içerisinde hücre bulunan fakat test maddesi içermeyen 3 kuyucuğa da ekstrelerin en yüksek konsantrasyonunda bulunan DMSO

miktarını içeren besiyeri eklendi ve bu kuyucuklar da çalışmada DMSO kontrol grubu olarak kullanıldı. Belirtilen inkübasyon süreleri sonunda tüm kuyucuklardaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücrelere 100 µl besiyeri içerisinde 10 µl MTT reaktifi eklendi. Ardından hücreler 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her bir kuyucuğa çözücü solusyon olarak 100 µl DMSO eklenerek oluşan mor renkli formazan ürününün çözünmesi sağlandı. Her bir kuyucuktaki formazanın absorbans değeri 570 nm dalga boyunda mikropate okuyucuda ölçüldü ve ölçülen absorbans değerlerinden yüzde hücre canlılığı hesaplandı.

3.2.7. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizi

Bax, Bcl-2, kaspaz-3 ve kontrol genlerinin mRNA transkript düzeyleri gerçek zamanlı-PCR kullanılarak kantitatif olarak belirlendi. Bunun için öncelikle A549 hücrelerinden total RNA’lar izole edildi. Total RNA izolasyonu için, ticari olarak satın alınan Trizol kit kullanıldı ve kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokol uygulandı. Total RNA izolasyonu için A549 hücreleri her bir kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde 100x20 mm’lik kültür kabına 5 mL DMEM besiyeri içerisinde ekildiler ve kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat CO₂’li steril etüvde 37°C’de inkübe edildiler. 24 saat sonunda kültür kaplarındaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücrelerin bir grubu GYE ve OYE ekstrelerinin MTT analizi ile belirlenen IC₅₀ (hücrelerin %50 inhibisyonuna neden olan konsantrasyonu) ve IC₅₀’nin bir alt konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edildiler. Hücrelerin bir grubu ise, apoptoz ve otofajinin inhibe edilmesi için sırasıyla apoptoz inhibitörü QVD-OPh (20 µM’a karşılık gelen 10.3 µg/mL’lik konsantrasyonu) ve otofaji inhibitörü 3-MA (5 Mm’a karşılık gelen 746 µg/mL’lik konsantrasyonu) ile 1 saat inkübe edildiler. Bir diğer hücre grubu ise, inhibitörlerle 1 saatlik ön inkübasyonun ardından ekstrelerin IC₅₀ ve IC₅₀’nin bir alt dozları ile yeniden 24 saat inkübe edildiler. Bir başka hücre grubu da, apoptoz ve otofajinin indüklenmesini sağlayan ve çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan taxol (2 µM’a karşılık gelen 1.7 µg/mL’lik konsantrasyonu) ve resveratrol (100 µM’a karşılık gelen 22.8 µg/mL’lik konsantrasyonu) ile 24 saat inkübe edildiler. Belirtilen inkübasyon süreleri sonunda hücre gruplarındaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile bir kez yıkandı. Bu aşamadan sonra tüm çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Daha sonra hücrelerin üzerine 1 mL soğuk PBS eklendi ve hücre kazıyıcısı ile hücreler kültür

kabı tabanından kazınarak steril tüp içinde toplandılar. Soğuk PBS ile kazıma işlemi 3 kez tekrarlandı ve tüp içinde toplanan hücre süspansiyonları 4°C’de 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti üzerine 500 µL trizol eklendi ve izolasyon protokolü takip edilerek total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA’ların saflığı ve miktarı spektrofotometrik olarak 260 ve 280 nm dalga boylarında optik dansite ölçümü ile hesaplandı.

A549 hücrelerinden izole edilen total RNA örnekleri ters transkripsiyon (reverse transcription) yöntemi ile cDNA ya dönüştürüldü. Total RNA’lardan cDNA sentezi gerçekleştirmek için, ticari olarak satın alınan cDNA sentez kiti kullanıldı ve kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokole uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için her bir örneğe ait total RNA ve kit karışımları, ayrı ayrı uygun sıcaklıklarda belirli sürelerde inkübe edildi ve böylece RNA’ların cDNA’ya ters transkripsiyonları sağlandı.

Elde edilen her bir örneğe ait cDNA ile, incelenecek genlere spesifik primer-problar kullanılarak, kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokole uygun şekilde LightCycler 480 cihazında gerçek zamanlı-PCR gerçekleştirildi. Böylece incelenen genlerin mRNA transkript düzeyleri kantitatif olarak belirlendi. Sonuçlar, her dokuda ifade edildiği bilinen β -Aktin kontrol geninin ifade seviyesi ile normalize edildi. Böylece, incelenen her bir genin A549 hücrelerinde ifade edilip edilmediği veya ifade seviyesindeki değişiklikler tesbit edildi. Tüm analizler dublike çalışıldı.

3.2.8. Western Blot Analizi

Etkileri araştırılan test maddelerinin A549 hücrelerindeki Bax, Bcl-2, LC3A/B, Atg5, Beklin-1 ve GAPDH proteinlerinin ekspresyon düzeylerine olan etkileri Western Blot analizi ile belirlendi. Bax, Bcl-2, LC3A/B, Atg5, Beklin-1 ve GAPDH proteinleri için total hücre lizatı kullanıldı. Bunun için öncelikle A549 hücreleri 1×10^6 hücre 100×20 mm’lik hücre kültürü petri kaplarına 6 mL DMEM besiyeri içerisinde ekildiler ve kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat CO₂’li steril etüvde 37°C’de inkübe edildiler. 24 saat sonunda petri kaplarındaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı ve ardından hücrelere *C. siliqua* yaprak ekstraktları, inhibitörler ve pozitif kontrol olarak kullanılan ilaç grupları RT-qPCR yönteminde belirtilen aynı dozda ve inkübasyon sürelerinde uygulanarak farklı hücre grupları oluşturuldu. Belirtilen inkübasyon süreleri sonunda hücre gruplarındaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile bir kez

yıkandı. Bu aşamadan sonra tüm çalışmalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Daha sonra hücrelerin üzerine 1 mL soğuk PBS eklendi ve hücre kazıyıcısı ile hücreler kültür kabı tabanından kazınarak steril tüp içinde toplandılar. Soğuk PBS ile kazıma işlemi 3 kez tekrarlandı. Tüp içinde toplanan hücre süspansiyonları 4°C’de 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelletleri elde edildi. Elde edilen hücre pelletlerinden de çalışılacak proteine göre total hücre lizatı hazırlandı.

Total Hücre Lizatının Hazırlanması: A549 hücrelerinden total hücre lizatlarının hazırlanması için proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli içeren RIPA (radio immunoprecipitation assay) lizis tamponu kullanıldı. Hücre pelletinin büyüklüğüne RIPA (50mM Tris-HCl; pH 7.4, 150 mM NaCl, %0.1 SDS, %0.5 sodyum deoksikolat, %1 Triton X-100, 200 mM PMSF, 100 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4) ve proteaz inhibitör kokteyl) çözeltisinden 40-100 μL kullanıldı.

Total hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonları, Pierce™ BCA (Bisinkoninik asit) protein analiz kiti kullanılarak kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokole uygun şekilde ölçüldü.

Her bir protein örneğiden jel kuyucuklarına 40 μg protein yüklendi ve proteinler araştırılan proteinin büyüklüğüne göre % 8–15’lik SDS-PAGE’de elektroforez edildiler. Ardından proteinler, ıslak transfer yöntemi ile PVDF membran üzerine transfer edildi. Daha sonra membrana, spesifik olmayan bağlanmalardan kaçınmak için % 5 yağsız süt tozu içeren TBS-T tamponu (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl ve % 0.1 Tween 20) ile 3 saat boyunca kapatma (blocking) işlemi uygulandı. Kapatma işleminin ardından membran TBS-T tamponu ile 10’ar dakika 3 kez yıkanarak süt tozu ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra membran TBS-T içinde hazırlanan uygun dilüsyondaki spesifik bir primer antikorla (Bax, Bcl-2, LC3A/B, Atg5 veya beclin-1) ile 4°C de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran TBS-T tamponu ile 3 kez yıkanarak spesifik olmayan bağlanmalar ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra membran TBS-T içinde hazırlanan uygun dilüsyondaki horseradish peroksidaz (HRP) bağlı sekonder antikor ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda membran tekrar TBS-T tamponu ile 10’ar dakika 3 kez yıkandı ve yıkama işleminin ardından araştırılan hedef protein kemilüminesans tesbit etme ayıraçları (ECL) kullanılarak belirlendi. Oluşan kemilüminesans sinyaller uygun bir yazılıma sahip olan bilgisayara bağlı jel görüntüleme sisteminde görüntülendi. Aynı membranlarda daha

sonra, GAPDH kontrol proteini de antikorlar kullanılarak görüntüledi. Jel görüntüleme sisteminde elde edilen bantların görüntüleri Image J programı kullanılarak analiz edildi ve araştırılan hedef proteinin ifade seviyesi, aynı membranda görüntülenen kontrol proteininin ifade seviyesi ile normalize edildi. Sarf malzeme yetersizliği nedeni ile, western blot ile ilgili tüm analizler bir kez yapıldı.

3.2.9. İstatistiksel Analiz

In vitro deneylerdeki her bir grubun verileri, ortalama $\pm$ Standart Sapma (SS) olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizler SPSS ver. 15.0 bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirildi. A549 hücrelerinde, *C. siliqua* yaprak ekstresi ve saf bileşiklerinin antitümoral aktivitesini belirlemek üzere, deney gruplarının ortalamaları arasındaki farklılıklar One-way ANOVA post hoc Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak analiz edildi. Farklılıklar, $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ de istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1 *C. siliqua* Yapraklarından Elde Edilen Ekstraksiyon Verimi

Olgun ve genç *Ceratonia siliqua* ağaçlarına ait yapraklardan %70'lik metanol ve %70'lik etanol ekstraktları hazırlandı. Bunun sonucunda Olgun ağaç Yaprak Metanol (OYM), Genç ağaç Yaprak Metanol (GYM), Olgun ağaç Yaprak Etanol (OYE) ve Genç ağaç Yaprak Etanol (GYE) ekstrakt örnekleri elde edildi. Başlangıçta 100 g toz yapraklardan hazırlanan ekstraktlardan elde edilen ekstraksiyon verimi Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Olgun ve genç *C. siliqua* ağaçlarına ait yapraklardan hazırlanan %70'lik metanol ve %70'lik etanol ekstraktlarından elde edilen ekstraksiyon verimi.

Ekstreler	Verim (%)
GYE	20.68
GYM	19.15
OYE	26.97
OYM	23.21

Ekstraksiyon verimi bakımından ekstraktlar birbirleri ile karşılaştırıldığında, %70'lik etanol ekstraktlarının %70'lik metanol ekstraktlarından daha yüksek verime sahip olduğu görüldü.

4.2 *C. siliqua* Yapraklarından Elde Edilen Ekstrelerin İçerdikleri Toplam Fenol ve Flavonoid Miktarları

C. siliqua yapraklarından elde edilen GYE, GYM, OYE ve OYM ekstraktlarının içerdikleri toplam fenol ve flavonoid miktarları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Ekstrelerin içerdikleri toplam fenol ve flavonoid miktarları (*ortalama $\pm$ SD)

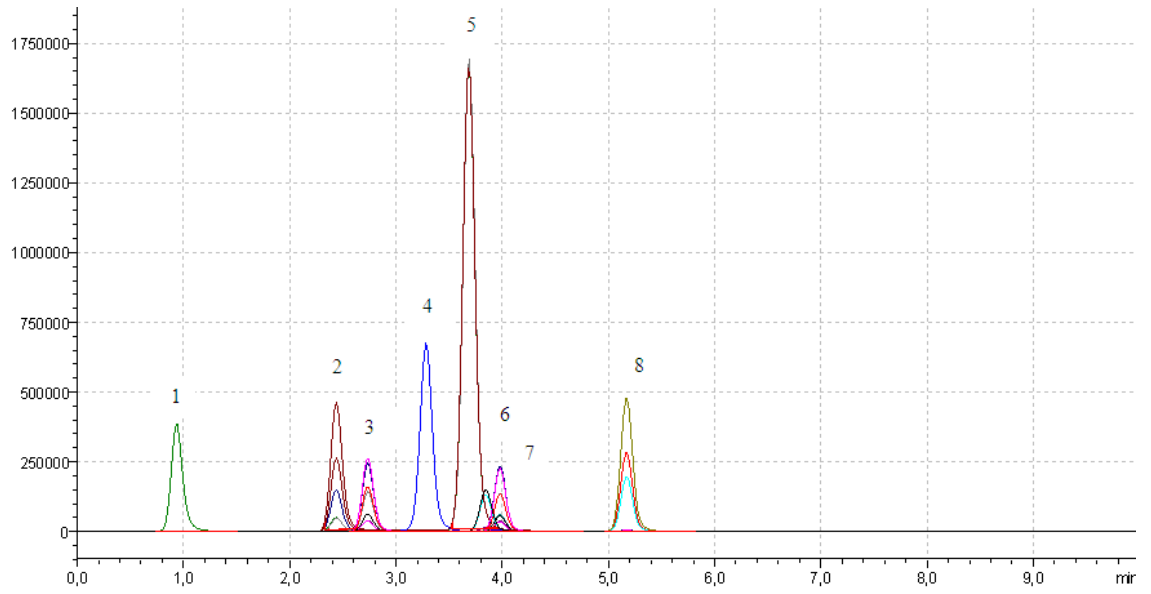
Ekstreler	Toplam fenol miktarı (mg GAE/g _{ekstre})	Toplam flavonoid miktarı
GYE	1.23 $\pm$ 0.08*	2.59 $\pm$ 0.01
GYM	0.98 $\pm$ 0.02	1.63 $\pm$ 0.05
OYE	1.08 $\pm$ 0.05	2.36 $\pm$ 0.07
OYM	0.93 $\pm$ 0.02	1.07 $\pm$ 0.03

*: ortalama $\pm$ SD

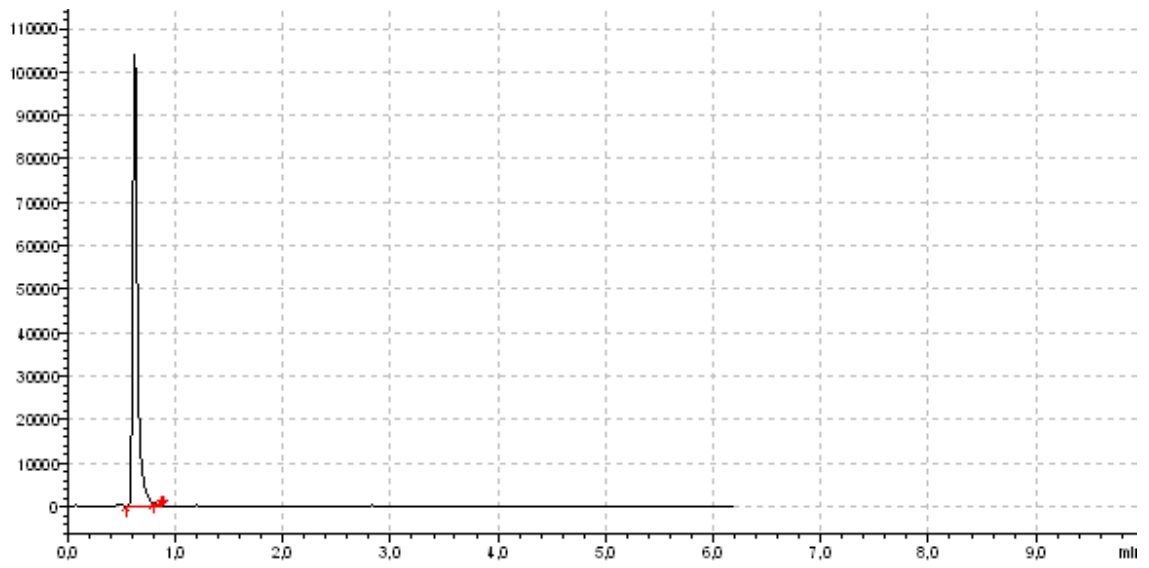
Ekstreler en düşükten en yükseğe doğru içerdikleri toplam fenol miktarı bakımından karşılaştırıldığında OYM<GYM<OYE<GYE şeklinde, toplam flavonoid miktarı bakımından da OYM<GYM<OYE<GYE şeklinde sıralandıkları bulundu. Böylece %70'lik etanol ekstrelerinin %70'lik metanol ekstrelerinden daha fazla fenol ve flavonoid miktarına sahip oldukları belirlendi. GYE ekstresinin de en fazla fenol ve flavonoid miktarına sahip olduğu görüldü.

4.3 C. siliqua Yapraklarından Elde Edilen Ekstrelerin Fenolik Bileşik İçerikleri

C. siliqua yaprak ekstrelerinin fenolik bileşimi LC/MS/MS analizi ile belirlendi. LC/MS/MS analizinde standart olarak; gallik asit (GAc), epikateşin-3-gallat (ECG), epigallokateşin-3- gallat (EGCG), kateşin (C), epikateşin (EC), epigallokateşin (EGC), elajik asit (EAc), teofilin (T) ve klorojenik asit (ClAc) kullanıldı ve ekstrelerin bileşik içerikleri bu standartlara karşı belirlendi. LC/MS/MS cihazında yapılan analiz sonucunda elde edilen ve standart olarak kullanılan saf bileşiklere ait kromatogramlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Standart olarak kullanılan saf bileşiklerden EGC'nin temininin geç sağlanması nedeniyle analizi tek olarak sonradan yapılmış olup, EGC'ye ait kromatogram Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

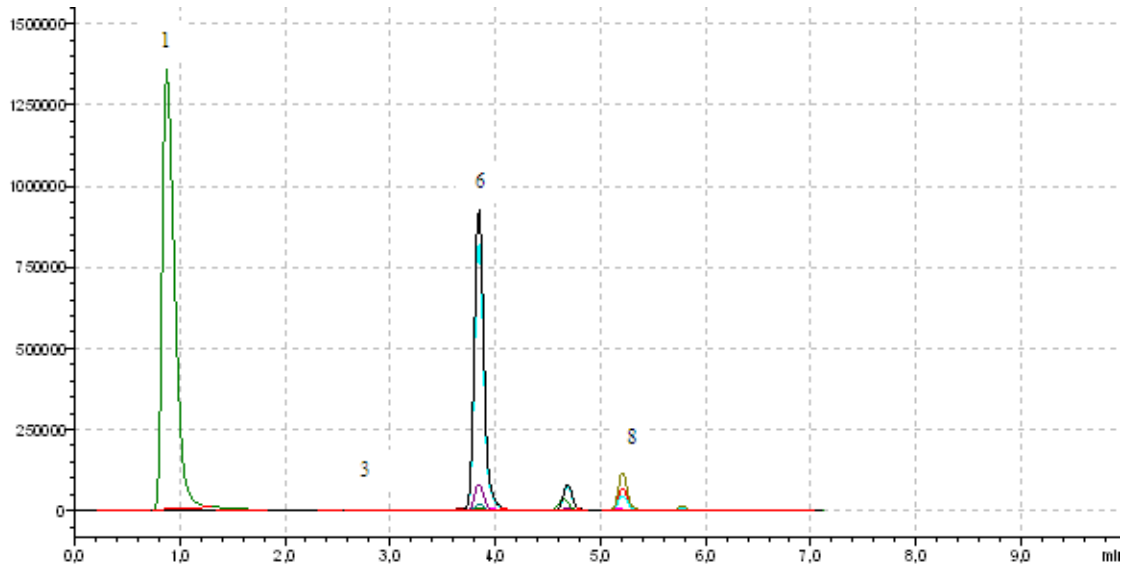


Şekil 4.1. Standartlara ait toplam iyon kromatogramı (1, GAc; 2, EC; 3, ClAc; 4, T; 5, CA; 6, EGCG; 7, C; 8, ECG)

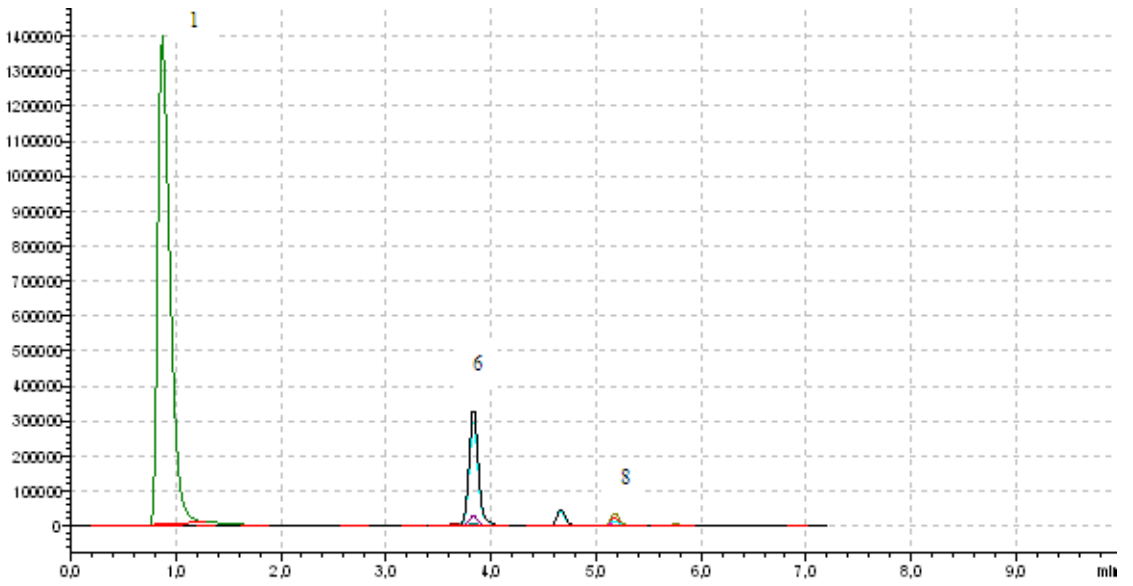


Şekil 4.2. EGC'ye ait toplam iyon kromatogramı.

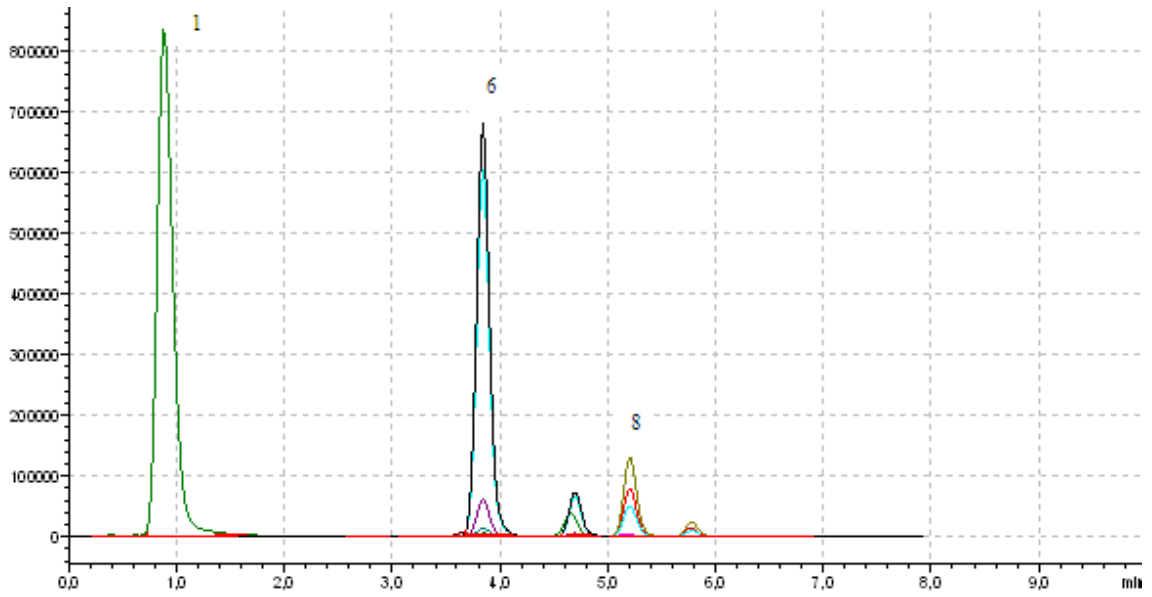
LC/MS/MS cihazında yapılan analiz sonucunda elde edilen ve 4 farklı ekstreye ait olan kromatogramlar Şekil 4.3-4.6'da gösterilmiştir.



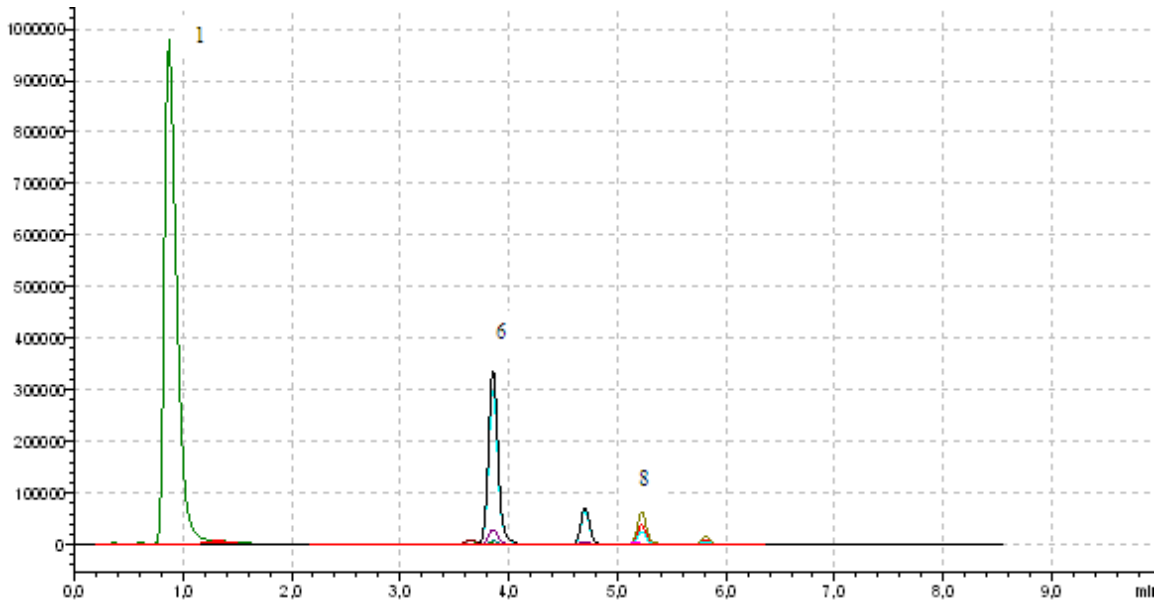
Şekil 4.3. GYE ekstresine ait toplam iyon kromatogramı (1, GAc; 3, ClAc; 6, EGCG; 8, ECG)



Şekil 4.4. GYM ekstresine ait toplam iyon kromatogramı (1, GAc; 6, EGCG; 8, ECG)



Şekil 4.5. OYE ekstresine ait toplam iyon kromatogramı (1, GAc; 6, EGCG; 8, ECG)



Şekil 4.6. OYM Ekstresine ait toplam iyon kromatogramı (1, GAc; 6, EGCG; 8, ECG)

LC/MS/MS kullanılarak yapılan analizde, ekstrelerdeki bileşiklerin içerikleri kütle/yük (m/z) oranları karşılaştırılarak kesin olarak teşhis edildi ve miktarları ppb düzeyinde standartlara karşı tayin edildi. LC/MS/MS cihazında yapılan analiz sonucunda elde edilen ekstrelerin sahip oldukları bileşik içerikleri ve miktarları Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. LC/MS/MS analiz sonuçları.

Madde	Rt (dk)	Ekstreler			
		GYE (ppb)	GYM (ppb)	OYE (ppb)	OYM (ppb)
GAc	1.00	53.62±0.34*	55.18±0.74	41.01±0.89	38.98±0.28
EC	2.70				
ClAc	3.30	0.50±0.26			
T	3.68				
CA	3.70				
EGCG	3.80	115.73±3.39	21.77±0.72	123.75±1.09	35.80±2.47
C	4.00				
ECG	5.18	3.76±0.04	1.68±0.13	5.83±0.19	2.73±0.07
EGC	0.70				

*ort ± SD; Rt, tutunma zamanı

LC/MS/MS analizi sonucunda, GYE ekstresinde; GAc, ClAc, EGCG ve ECG bileşiklerinin bulunduğu, GYM, OYE ve OYM ekstrlerinde ise; GAc, EGCG ve ECG bileşiklerinin bulunduğu belirlendi. Yapılan analizde aynı zamanda, GYE ve OYE ekstrlerinin en fazla total bileşik miktarına sahip oldukları görüldü. Ekstreler içerdikleri toplam bileşik miktarı açısından birbirleri ile karşılaştırıldıklarında; OYM<GYM<OYE<GYE şeklinde sıralandıkları bulundu. Elde edilen bu sonucun, ekstrlerde ölçümü yapılan ekstrlerin içerdği toplam fenol ve flavonoid miktarları ile de uyumlu olduğu görüldü.

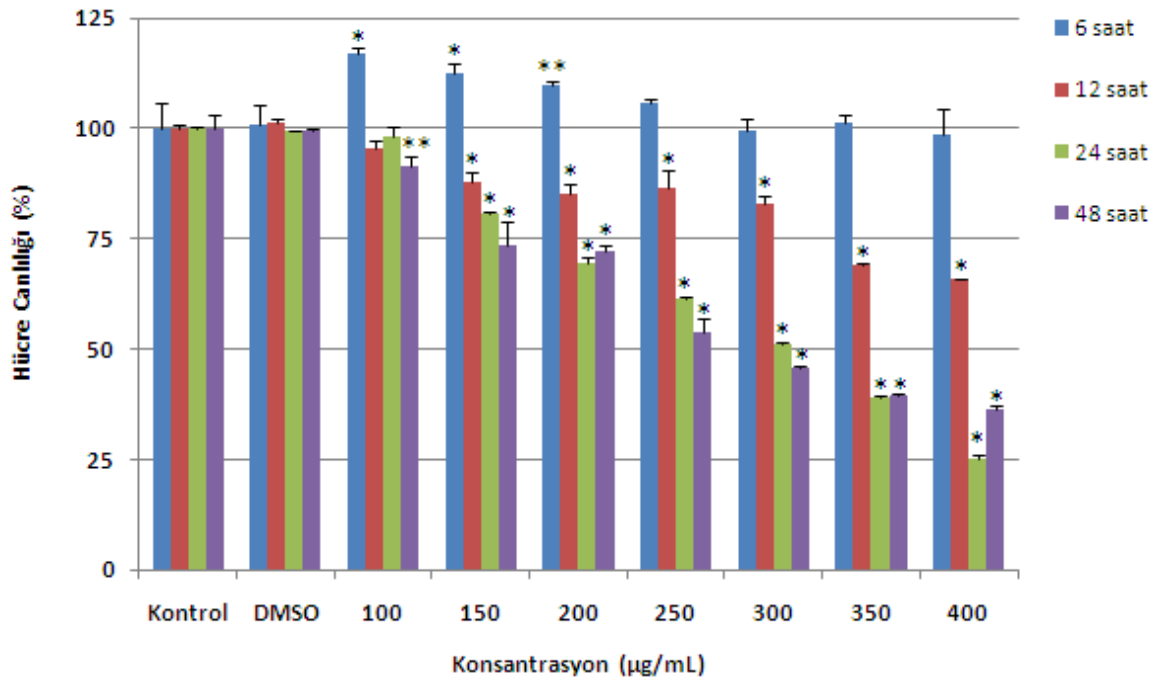
Ekstrelerin içerik analizlerinden elde edilen veriler sonucunda, çalışmaya saf bileşik içerikleri birbirinden farklılık gösteren ve en fazla bileşik içeriğine sahip olan GYE ve OYE ekstrleri ile bu ekstrlerde bulunan GAc, ClAc, EGCG ve ECG bileşikleri ile devam edilmesine karar verildi. Böylece, çalışma kapsamında A549 hücrelerinde *C. siliqua* yapraklarının antitümoral etkilerini belirlemeye yönelik gerçekleştirilecek olan MTT, kantitatif Real time-PCR ve Western Blot analizlerinde kullanılacak ekstrler ve saf bileşikleri kesin olarak belirlenmiş oldu.

4.4 *C. siliqua* Yaprak Ekstreleri ve Saf Bileşiklerinin A549 Hücrelerinin Canlılıkları Üzerindeki Etkileri

Çalışma kapsamında etkisi araştırılan *C. siliqua* yaprak ekstreleri (GYE ve OYE ekstreleri) ile ekstrelerin içeriğinde bulunduğu tespit edilen; GAc, EGCG, ECG ve ClAc bileşiklerinin A549 hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkileri MTT testi kullanılarak doza ve zamana bağlı olarak analiz edildi. Bunun için, A549 hücreleri GYE ve OYE ekstrelerinin farklı konsantrasyonları ile 6, 12, 24 ve 48 saat inkübe edildiler. A549 hücrelerinin canlılıklarına etkilerini araştırmak için *C. siliqua* yaprak ekstrelerinin giderek artış gösteren 100-400 µg/mL arasındaki konsantrasyonları (100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 µg/mL) ile saf bileşiklerin yine giderek artış gösteren 20-200 µM arasındaki (20, 40, 80, 120, 160, 180 ve 200 µM) konsantrasyonlara karşılık gelen µg/mL'lik konsantrasyonları kullanıldı. Böylece, yapılan MTT analizi ile ekstre ve saf bileşiklerin A549 hücreleri için en uygun inkübasyon süreleri ile çalışmalar süresince kullanılacak olan ve hücrelerin %50 inhibisyonuna neden olan konsantrasyonları (IC₅₀ dozları) belirlenmiş oldu. MTT analizi sonucunda, tez çalışmasının sonraki aşamalarında ekstrelerin IC₅₀ dozu ile IC₅₀'nin bir alt dozu olmak üzere iki farklı konsantrasyonları kullanıldı.

4.4.1 GYE Ekstresinin A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

MTT hücre canlılık testi kullanılarak elde edilen GYE ekstresine ait doza ve zamana bağlı % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.7'de gösterilmiştir. MTT analizi sonucunda, GYE ekstresinin A549 hücrelerinin canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azalttığı görülmüştür.



Şekil 4.7. Artan konsantrasyonlarda GYE ekstresinin A549 hücreleri ile 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p<0.001$, ** $p<0.01$, kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

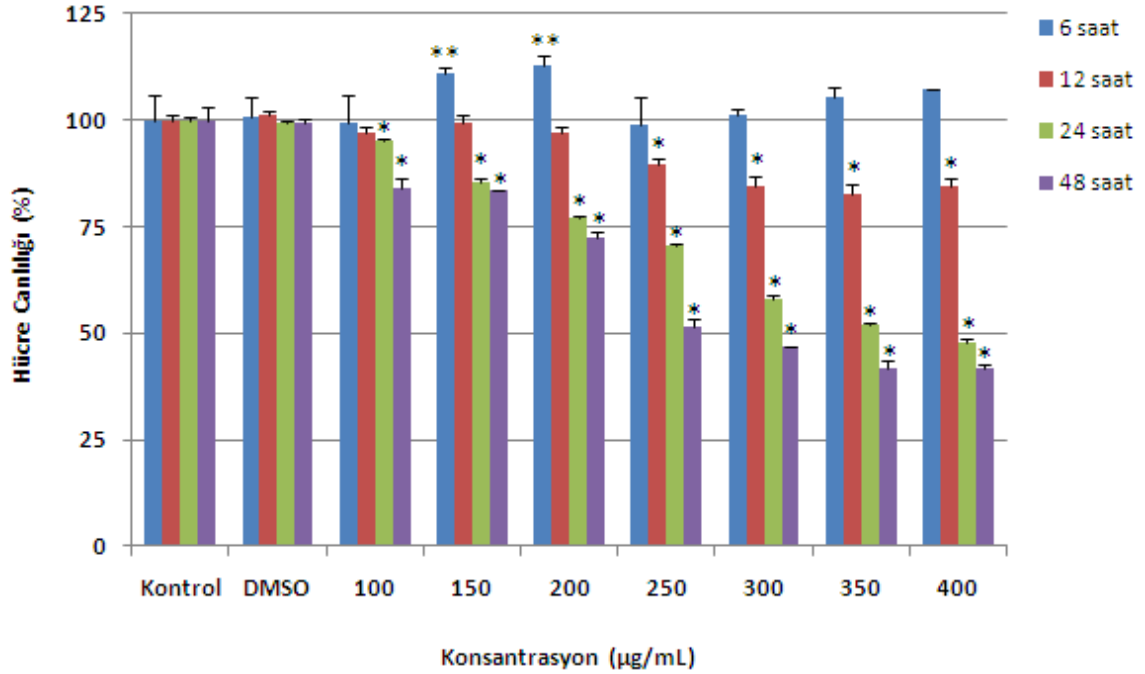
Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, GYE ekstresinin artan konsantrasyonları ile 6 saatlik inkübasyon sonucunda; kullanılan hiçbir ekstre konsantrasyonunun A549 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltmadığı, 12 ve 24 saatlik inkübasyonlarda; 150 µg/mL ve daha yüksek konsantrasyonlardaki GYE ekstresinin hücre canlılığını doza bağımlı olarak anlamlı şekilde azalttığı ($p<0.001$), 48 saatlik inkübasyonda ise; 100 µg/mL ($p<0.01$) ve daha yüksek konsantrasyonlardaki ($p<0.001$) GYE ekstresinin hücre canlılığını kontrol grubuna göre doza bağımlı olarak anlamlı şekilde azalttığı tespit edildi.

Böylece, tez çalışmasının sonraki aşamalarında (RT-qPCR ve western blot analizlerinde) kullanılacak olan GYE ekstresinin A549 hücreleri için en uygun inkübasyon süresi; 24 saatlik inkübasyon, IC_{50} dozu; 300 µg/mL ve IC_{50} 'nin bir alt dozu; 250 µg/mL olarak belirlenmiş oldu (Şekil 4.7).

4.4.2 OYE Ekstresinin A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

MTT hücre canlılık testi kullanılarak elde edilen OYE ekstresine ait doza ve zamana bağlı % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Yapılan MTT analizi

sonucunda, OYE ekstresinin A549 hücrelerinin canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azalttığı görülmüştür.



Şekil 4.8. Artan konsantrasyonlarda OYE ekstresinin A549 hücreleri ile 6, 12, 24 ve 48 inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, OYE ekstresinin artan konsantrasyonları ile 6 saatlik inkübasyon sonucunda; kullanılan hiçbir ekstre konsantrasyonunun A549 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltmadığı, 12 saatlik inkübasyonda; 250 µg/mL ve daha yüksek konsantrasyonların, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda; kullanılan tüm OYE ekstresi konsantrasyonlarının hücre canlılığını doza bağımlı olarak kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalttıkları ($p < 0.001$) tespit edildi.

Böylece, tez çalışmasının sonraki aşamalarında (RT-qPCR ve western blot analizlerinde) kullanılacak olan OYE ekstresinin A549 hücreleri için en uygun inkübasyon süresi; 24 saat, IC_{50} dozu; 350 µg/mL ve IC_{50} 'nin bir alt dozu; 300 µg/mL olarak belirlenmiş oldu (Şekil 4.8).

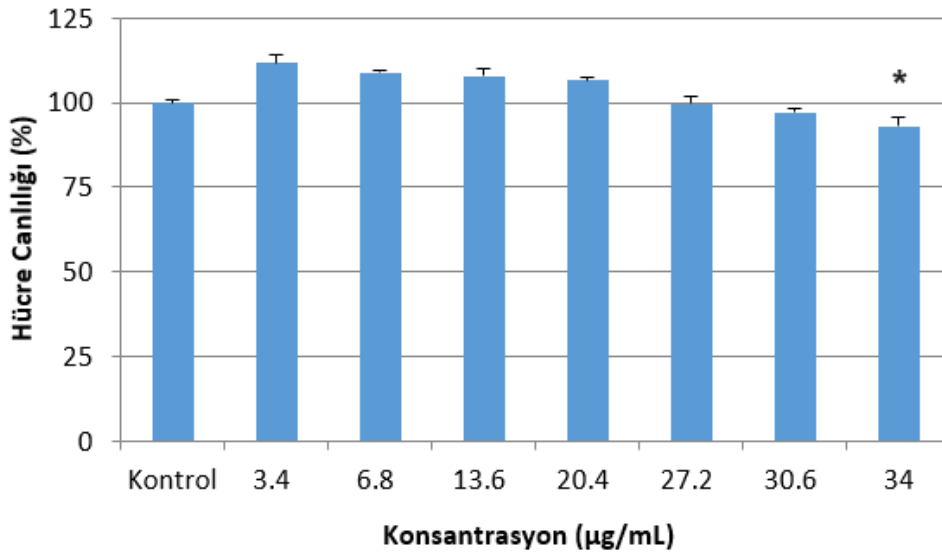
Çalışma kapsamında etkisi araştırılan GYE ve OYE ekstraktları DMSO içinde çözüldüler. Bununla birlikte, DMSO'nun kültür ortamındaki final konsantrasyonu % 1'den daha düşüktü. Yapılan MTT analizinde DMSO'nun kültür ortamındaki final

konsantrasyonunun A549 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı ve kontrol grubuna göre A549 hücrelerinin canlılıklarını anlamlı olarak azaltmadığı görüldü ($p>0.05$) (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).

4.4.3 Gallik Asit (GAc)'in A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

A549 hücreleri için GYE ve OYE eksteleri ile 24 saatlik inkübasyon en uygun inkübasyon süresi olarak belirlendiği için, ekstelerin içeriğinde bulunan saf bileşikler (GAc, EGCG, ECG ve ClAc) için de en uygun inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlendi. Bu sebeple, ekstelerin içeriğinde bulunan her bir saf bileşiğin A549 hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkileri, MTT testi kullanılarak 24 saatlik inkübasyonları sonucunda doza bağlı olarak analiz edildi.

MTT hücre canlılık testi kullanılarak elde edilen GAc'ye ait doza bağlı % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Yapılan MTT analizi sonucunda, GAc'nin 3.4-30.6 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında A549 hücrelerinin canlılığını anlamlı olarak azaltmadığı görülmüştür.

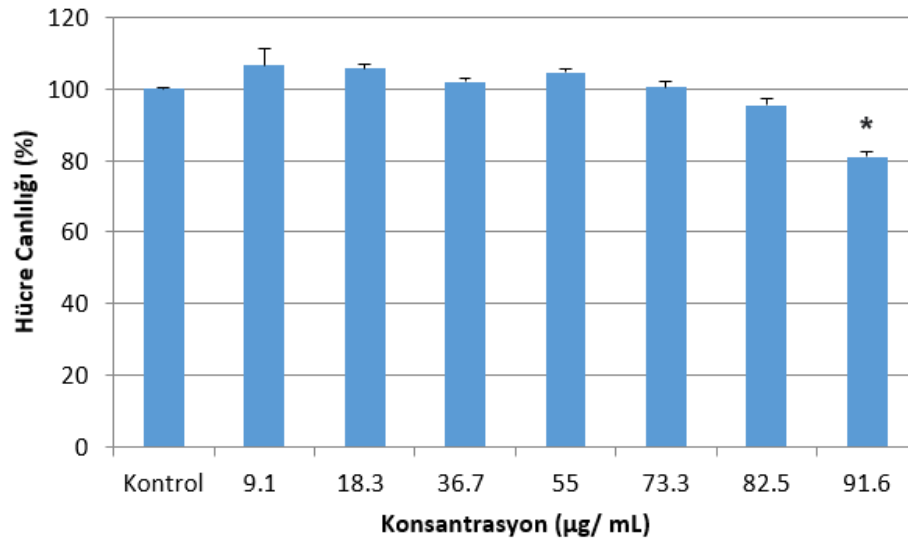


Şekil 4.9. A549 hücrelerinin GAc'nin artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p<0.001$, kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan istatistiksel değerlendirmede, GAc'nin giderek artış gösteren konsantrasyonları ile A549 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda; GAc'nin 30.6 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonuna kadar A549 hücrelerinin canlılığında anlamlı bir azalma olmadığı ($p>0.05$), 34 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda ise hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$) tespit edildi. Bununla birlikte, GAc'nin en yüksek konsantrasyonu olan 34 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda bile hücre canlılığının %90'nın üzerinde (%93.01) olduğu görüldü (Şekil 4.9). Böylece 3.4-34 $\mu\text{g/mL}$ arasındaki GAc konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyon süresinde A549 hücrelerinin canlılıklarını güçlü şekilde azaltmadıkları belirlendi. Bu nedenle, GAc'nin belirlenen konsantrasyon aralığında A549 hücreleri üzerindeki IC_{50} dozu elde edilemedi. Sonuç olarak, GAc'nin tez çalışmasının RT-qPCR ve western blot aşamalarından çıkarılmasına karar verildi.

4.4.4 Epigallocateşin-3-gallat (EGCG)'ın A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

MTT hücre canlılık testi kullanılarak elde edilen EGCG'ye ait doza bağlı % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.10'da gösterilmiştir. MTT analizi sonucunda, EGCG'nin 24 saatlik inkübasyon sonucunda 9.1-82.5 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında A549 hücrelerinin canlılığını anlamlı olarak azaltmadığı görülmüştür.

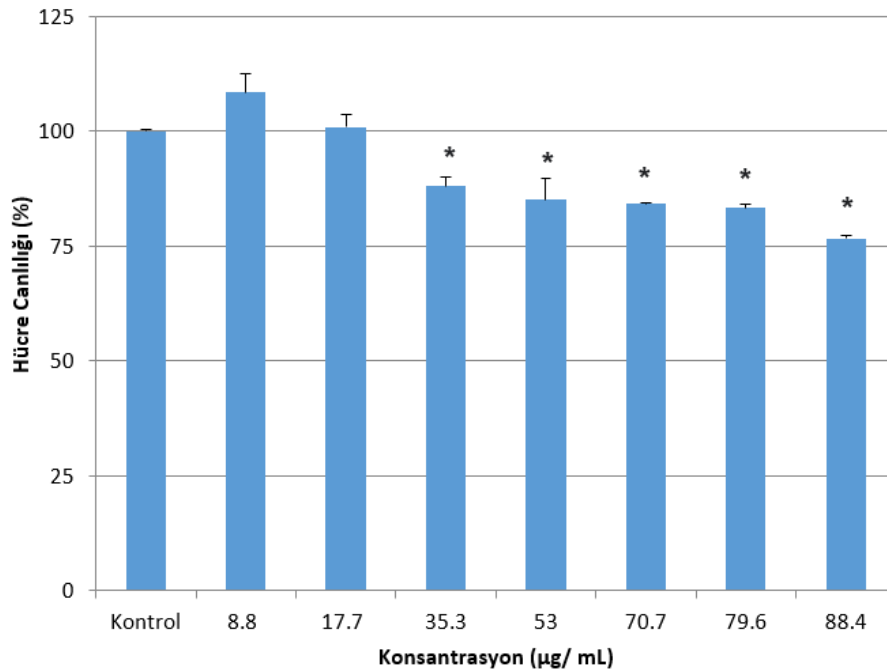


Şekil 4.10. A549 hücrelerinin EGCG'nin artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p<0.001$, kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan istatistiksel değerlendirmede, giderek artış gösteren EGCG konsantrasyonları ile A549 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda; 82.5 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyona kadar A549 hücrelerinin canlılığında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olmadığı ($p>0.05$), 91.6 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda ise hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$) tespit edildi. Bununla birlikte, EGCG'nin en yüksek konsantrasyonu olan 91.6 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonda bile hücre canlılığının yaklaşık %80 olduğu (%80.99) görülmüştür (Şekil 4.10). Böylece, 24 saatlik inkübasyon süresinde 9.1-91.6 $\mu\text{g/mL}$ arasındaki EGCG konsantrasyonlarının A549 hücrelerinin canlılıklarını etkili şekilde azaltamadıkları belirlendi. Bu nedenle, EGCG'nin belirlenen konsantrasyon aralığında A549 hücreleri üzerindeki IC_{50} dozu elde edilemedi. Sonuç olarak, EGCG'nin tez çalışmasının RT-qPCR ve western blot aşamalarından çıkarılmasına karar verildi.

4.4.5 Epikateşin-3-gallat (ECG)'ın A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

MTT hücre canlılık testi kullanılarak elde edilen ECG'ye ait doza bağlı % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.11'de gösterilmiştir. MTT analizi sonucunda, ECG'nin 24 saatlik inkübasyon sonucunda 8.8-17.7 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında A549 hücrelerinin canlılığını anlamlı olarak azaltmadığı görülmüştür.

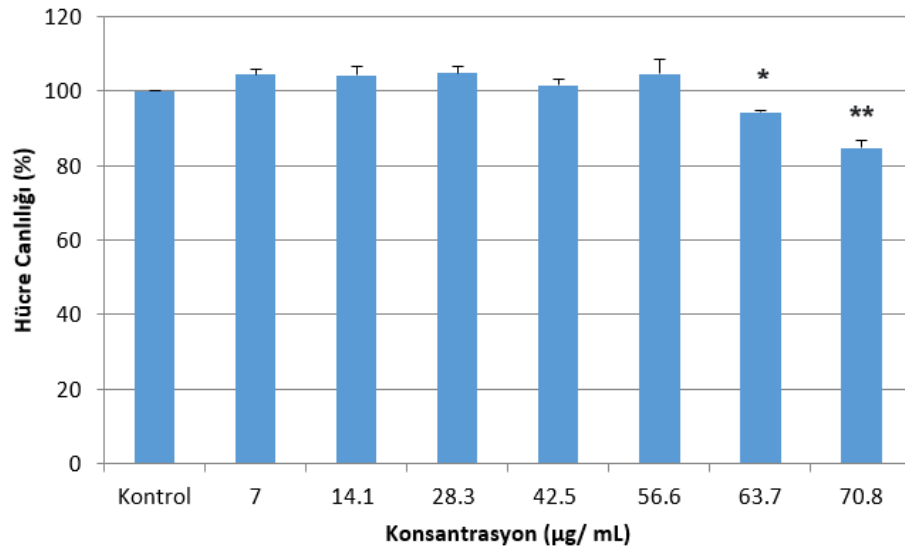


Şekil 4.11. A549 hücrelerinin ECG'nin artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p<0.001$, kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan istatistiksel değerlendirmede, ECG'nin giderek artış gösteren konsantrasyonları ile A549 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda; ECG'nin 17.7 µg/mL'lik konsantrasyona kadar A549 hücrelerinin canlılığını anlamlı şekilde azaltmadığı ($p>0.05$), 35.3 µg/mL ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise hücre canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalttığı ($p<0.001$) tespit edildi. Bununla birlikte, ECG'nin en yüksek konsantrasyonu olan 88.4 µg/mL'lik konsantrasyondaki hücre canlılığının azalmaya rağmen yine de %75'in üzerinde (%76.61) olduğu görülmüştür (Şekil 4.11). Böylece, 8.8-88.4 µg/mL arasındaki ECG konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyon süresinde A549 hücrelerinin canlılıklarını etkili şekilde azaltamadıkları belirlendi. Bu nedenle, ECG'nin belirlenen konsantrasyon aralığında A549 hücreleri üzerindeki IC₅₀ dozu elde edilemedi. Sonuç olarak, ECG'nin tez çalışmasının RT-qPCR ve western blot aşamalarından çıkarılmasına karar verildi.

4.4.6 Klorojenik Asit (ClAc)'in A549 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

MTT hücre canlılık testi kullanılarak elde edilen ClAc'e ait doza ve zamana bağlı % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.12'de gösterilmiştir. MTT analizi sonucunda, ClAc'nin 24 saatlik inkübasyon sonucunda A549 hücrelerinin canlılığını 7-56.6 µg/mL'lik konsantrasyonlarda hücre canlılığını azaltmadığı görülmüştür.



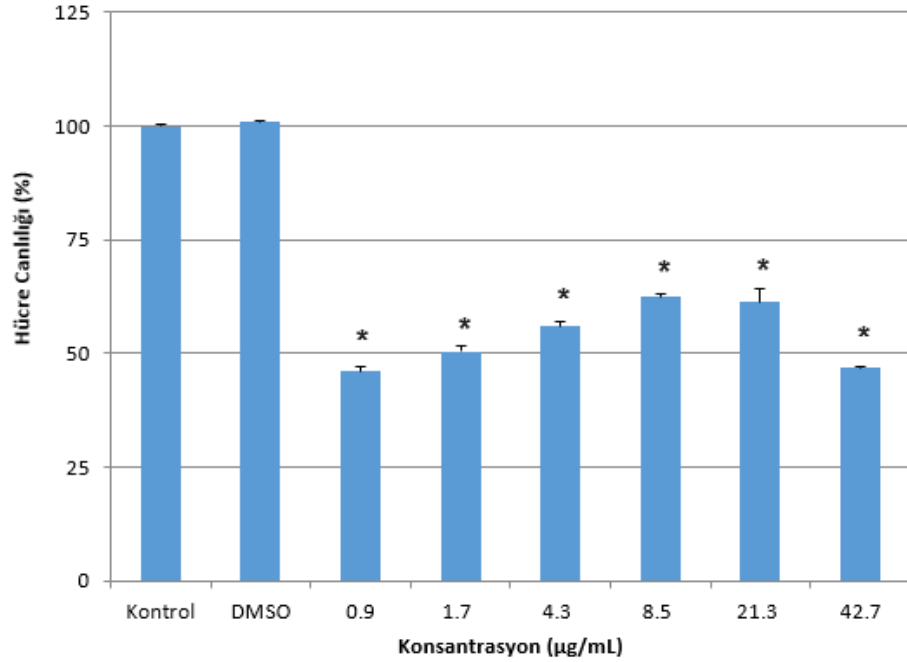
Şekil 4.12. A549 hücrelerinin ClAc'nin artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p<0.05$, ** $p<0.001$, kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan istatistiksel değerlendirmede, ClAc'nin giderek artış gösteren konsantrasyonları ile A549 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda; ClAc'nin 56.6 µg/mL'lik konsantrasyona kadar A549 hücrelerinin canlılığını anlamlı şekilde azaltmadığı ($p>0.05$), 63.7 ve 70.8 µg/mL'lik konsantrasyonlarda ise hücre canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalttığı (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.001$) tespit edildi. Bununla birlikte, ClAc'nin en yüksek konsantrasyonu olan 70.8 µg/mL'lik konsantrasyondaki hücre canlılığının azalmaya rağmen yine de %80'in üzerinde (%84.71) olduğu görölmüştür (Şekil 4.12). Böylece, 7-70.8 µg/mL arasındaki ClAc konsantrasyonlarının 24 saatlik inkübasyon süresinde A549 hücrelerinin canlılıklarını etkili şekilde azaltamadıkları belirlendi. Bu nedenle, ClAc'nin belirlenen konsantrasyon aralığında A549 hücreleri üzerindeki IC₅₀ dozu elde edilemedi. Sonuç olarak, ClAc'nin tez çalışmasının RT-qPCR ve western blot aşamalarından çıkarılmasına karar verildi.

4.5. A549 Hücrelerinde Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Taxol ve Resveratrol Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Klinikte akciğer kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve terapötik etkisini kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek gösteren anti kanser bir kemoterapi ilacı olan Taxol (Paclitaxel), A549 hücrelerinde apoptozun indüklenmesinde pozitif kontrol olarak kullanıldı. Yine, klinik uygulaması sınırlı olmakla birlikte, anti kanser etkileri bilinen Resveratrol de A549 hücrelerinde otofajinin indüklenmesinde pozitif kontrol olarak kullanıldı (2, 53, 135-139). Apoptoz ve otofajinin indüklenmesinde pozitif kontrol olarak kullanılan taxol ve resveratrol'un A549 hücrelerindeki IC₅₀ konsantrasyonları ise MTT hücre canlılık testi ile belirlendi. Bunun için, A549 hücreleri taxol ve resveratrolün artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edildiler. Taxol için giderek artış gösteren 1-50 µM arasındaki (1, 2, 5, 10, 25 ve 50 µM) konsantrasyonlar, resveratrol için de yine giderek artış gösteren 5-200 µM arasındaki (5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM) konsantrasyonlar kullanıldı. Taxol ve resveratrol konsantrasyonları µg/mL cinsinden hesaplandı. Buna göre; taxol için 0.9-42.7 µg/mL arasındaki (0.9, 1.7, 4.3, 8.5, 21.3, 42.7 µg/mL) konsantrasyonlar, resveratrol için ise 1.1-45.6 µg/mL arasındaki (1.1, 2.3, 5.7, 11.4, 22.8, 45.6 µg/mL) konsantrasyonlar kullanıldı. Yapılan MTT analizi sonucunda, taxol ve resveratrolün 24 saatlik inkübasyonda A549 hücrelerindeki IC₅₀ konsantrasyonları belirlendi.

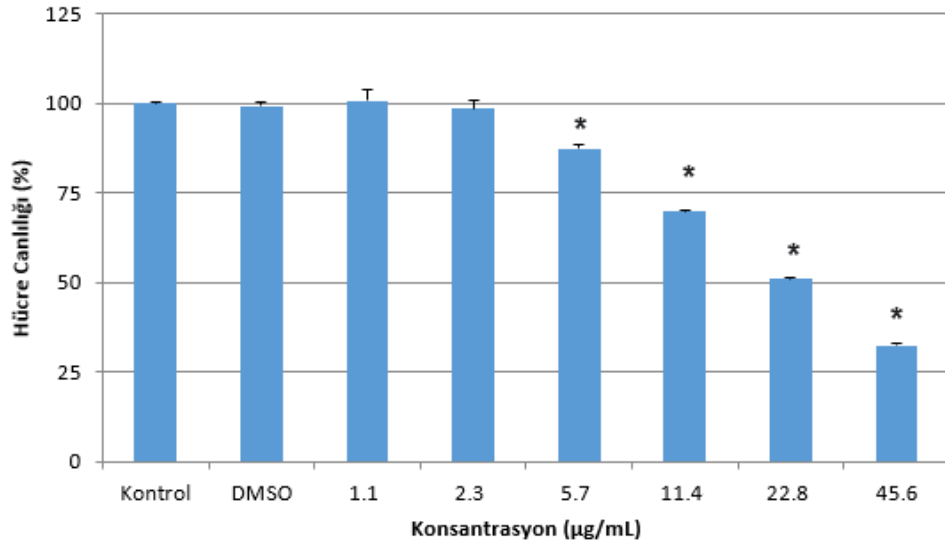
MTT hücre canlılık testi kullanılarak elde edilen Taxol'e ait % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.13'de gösterilmiştir. MTT analizi sonucunda, kullanılan tüm taxol konsantrasyonlarının A549 hücrelerinin canlılığını azalttığı görülmüştür.



Şekil 4.13. A549 hücrelerinin Taxol'ün artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p < 0.001$, kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, Taxol'ün giderek artış gösteren konsantrasyonları ile A549 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonunda, kullanılan tüm taxol konsantrasyonlarının A549 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalttıkları ($p < 0.001$) tespit edildi. Böylece, 24 saatlik inkübasyonda taxol'ün A549 hücrelerindeki IC_{50} dozu 1.7 µg/mL olarak belirlendi (Şekil 4.13).

MTT hücre canlılık testi kullanılarak elde edilen Resveratrol'e ait % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.14'de gösterilmiştir. MTT analizi sonucunda, resveratrolün 24 saatlik inkübasyonda A549 hücrelerinin canlılığını 1.1-2.3 µg/mL'lik doz aralığında anlamlı olarak azaltmadığı görülmüştür.



Şekil 4.14. A549 hücrelerinin Resveratrol'ün artan konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p < 0.001$, kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, resveratrol'ün giderek artış gösteren konsantrasyonlarının A549 hücreleri ile 24 saatlik inkübasyonunda, 1.1 ve 2.3 µg/mL'lik resveratrol konsantrasyonlarının A549 hücrelerinin canlılığını anlamlı şekilde azaltmadıkları ($p > 0.05$), bununla birlikte 5.7 µg/mL'lik ve daha daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.001$) tespit edildi. Böylece, 24 saatlik inkübasyonda resveratrol'ün A549 hücrelerindeki IC_{50} dozu 22.8 µg/mL olarak belirlendi (Şekil 4.14).

Çalışmada kullanılan taxol ve resveratrol DMSO içinde çözüldüler. Bununla birlikte, DMSO'nun kültür ortamındaki final konsantrasyonları % 1'den daha düşüktü. Yapılan MTT analizi ve istatistiksel değerlendirmede DMSO'nun kültür ortamındaki final konsantrasyonunun A549 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı ve kontrol grubuna göre A549 hücrelerinin canlılıklarını anlamlı olarak azaltmadığı görüldü ($p > 0.05$) (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).

4.6. *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Apoptoz Yolağında Görev yapan genlerin mRNA Ekspresyonlarına Etkileri

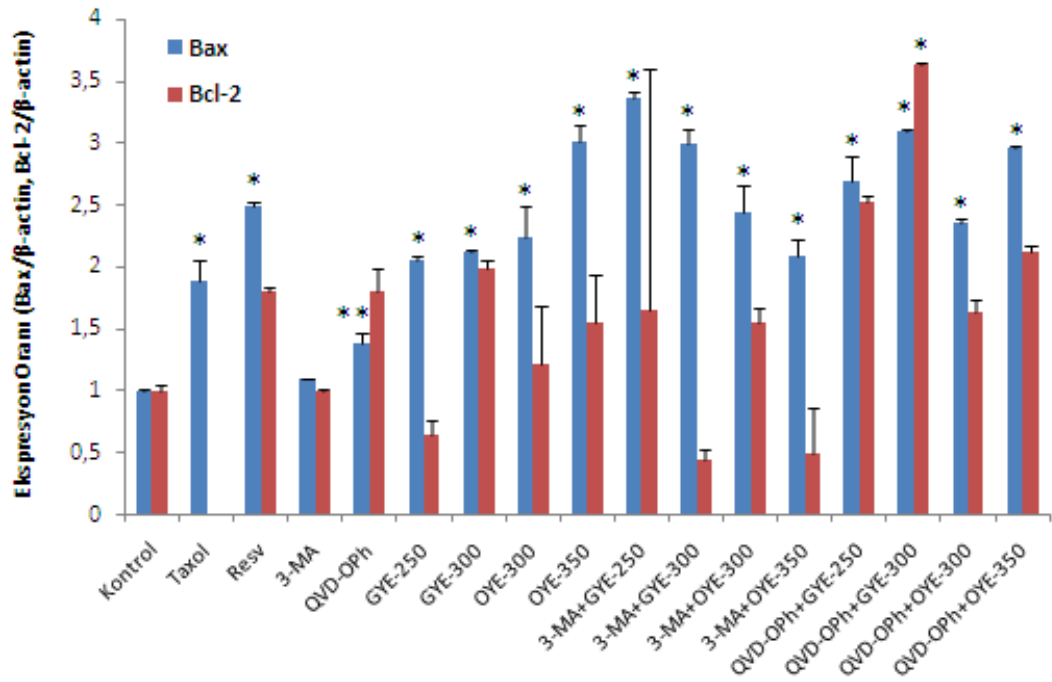
GYE ve OYE ekstrelerinin A549 hücrelerinde apoptotik yolda önemli roller oynayan antiapoptotik Bcl-2, proapoptotik Bax ve kaspaz 3 genlerinin mRNA transkripsiyon (ifadelenme) düzeylerine etkileri kantitatif gerçek zamanlı-PCR (RT-qPCR) yöntemi kullanılarak belirlendi. Genlerin ifade düzeyleri, β -actin kontrol geninin ifade seviyesi ile normalize edildi.

GYE ve OYE ekstrelerinin A549 hücrelerinde hem apoptotik yolağa etkilerini belirlemek hem de otofaji ile apoptoz arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak amacı ile, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan taxol ($2 \mu\text{M}$ 'a karşılık gelen $1.7 \mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonu) ve resveratrol'ün ($100 \mu\text{M}$ 'a karşılık gelen $22.8 \mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonu) yanı sıra, apoptozu inhibe eden genel kaspaz inhibitörü QVD-OPh ($20 \mu\text{M}$ 'a karşılık gelen $10.3 \mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonu) ve otofaji inhibitörü 3-MA (5mM 'a karşılık gelen $746 \mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonu) kullanıldı. Çalışmada kullanılan QVD-OPh ve 3-MA inhibitörlerinin konsantrasyonları ilgili inhibitörlerin bilgi formlarında önerilen dozlara ve literatüre göre belirlendi (67,140-143).

GYE ve OYE ekstrelerinin A549 hücrelerinde apoptotik yolağa etkilerini belirlemek ve aynı zamanda otofaji ile apoptoz arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak üzere, hücrelerin bir grubu apoptoz ve otofaji inhibitörleri ile 1 saat ön inkübasyona maruz bırakıldılar ve daha sonra ekstrelerin MTT analizi ile belirlenen konsantrasyonları (IC_{50} ve IC_{50} 'nin bir alt dozları) ile yeniden 24 saat inkübe edildiler. Ardından hücre gruplarından RNA'ları izole edilerek RT-qPCR yöntemi ile Bax, Bcl-2 ve kaspaz 3 genlerinin mRNA transkripsiyon düzeyleri belirlendi.

4.6.1. *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Proapoptotik Bax ve Antiapoptotik Bcl-2 genlerinin mRNA Ekspresyonuna Etkileri

GYE ve OYE ekstrelerinin A549 hücrelerinde proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2 genlerinin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.15'de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. A549 hücrelerinde proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2'nin mRNA ekspresyonlarına GYE ve OYE ekstrelerinin etkileri. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, (n=2).

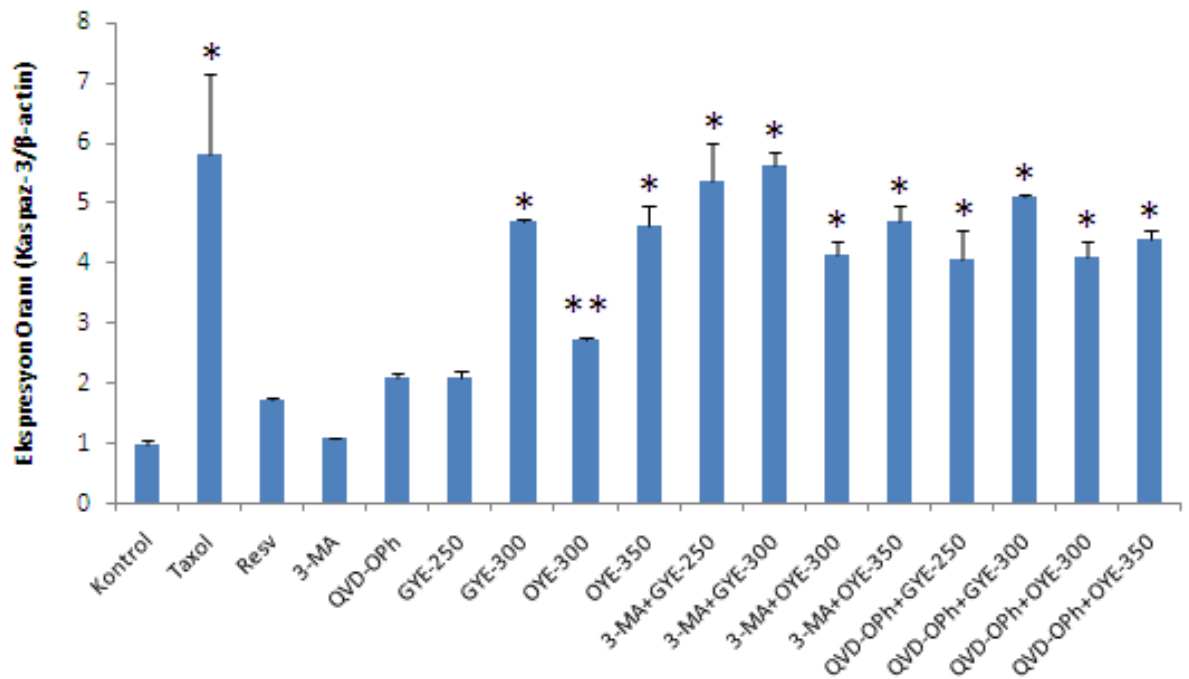
Yapılan RT-qPCR analizi sonucunda, yalnızca otofaji inhibitörü 3-MA ile inkübe edilen hücre grubu dışında, diğer tüm gruplarda proapoptotik Bax'ın mRNA ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği görüldü. Yalnızca ekstreler ile inkübe edilen hücre gruplarında OYE ekstresinin GYE ekstresine göre Bax mRNA düzeyini daha fazla artırdığı belirlendi. Otofaji inhibitörü 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen hücre gruplarında ise, Bax mRNA düzeylerinin daha fazla artış gösterdiği, Bcl-2 mRNA düzeylerinin ise azalma gösterdiği görüldü. Bax mRNA düzeyindeki en fazla artış ise 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ekstresinin 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonu ile inkübe edilen hücre grubunda görülmüş olup bu hücre grubundaki Bax mRNA düzeyi kontrol grubuna göre yaklaşık 3.5 kat arttığı görülmüştür. Apoptoz inhibitörü QVD-OPh ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen hücre gruplarında ise antiapoptotik Bcl-2 mRNA düzeylerinin diğer gruplardan daha yüksek olduğu görüldü. Taxol ile inkübe edilen hücre grubunda ise Bcl-2 mRNA ekspresyonunun tamamen inhibe olduğu görüldü (Şekil 4.15).

Yapılan istatistiksel analizde, tek başına 3-MA ile inkübe edilen hücre grubundaki Bax mRNA düzeyinin kontrol grubundan farklı olmadığı ($p > 0.05$), diğer tüm gruplarda ise

kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edildi ($p<0.001$). Bununla birlikte, tek başına QVD-Oph ile inkübe edilen hücre grubundaki Bax mRNA düzeyi kontrol grubuna göre 1.5 kat artış göstermekle birlikte, bu artış kontrol grubuna göre daha az anlamlı ($p<0.05$) bulundu. Antiapoptotik Bcl-2 mRNA düzeyinin ise, yalnızca QVD-Oph ve GYE ekstresinin 300 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonunun birlikte inkübe edildiği hücre grubunda anlamlı olarak artış gösterdiği ($p<0.001$), diğer gruplardaki artışların kontrol grubundan farklı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

4.6.2. *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Kaspaz 3 geninin mRNA Ekspresyonuna Etkileri

GYE ve OYE ekstrlerinin A549 hücrelerinde Kaspaz 3 geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.16'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. A549 hücrelerinde Kaspaz 3'ün mRNA ekspresyonuna GYE ve OYE ekstrlerinin etkileri. * $p<0.001$, ** $p<0.01$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, ($n=2$).

Yapılan RT-qPCR analizi sonucunda, resveratrol, sadece 3-MA, sadece QVD-Oph ve sadece GYE ekstresinin 250 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonu ile inkübe edilen hücre grupları dışındaki diğer tüm gruplarda kaspaz 3 mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği görüldü. Yalnızca GYE ve OYE ekstrleri ile inkübe edilen hücre gruplarında, kaspaz 3 mRNA düzeyinin artış gösterdiği belirlendi. Kaspaz 3 mRNA düzeyindeki bu artışın ise, otofaji inhibitörü 3-MA ve ekstrlerinin birlikte inkübe edildiği

hücre gruplarında ve apoptoz inhibitörü QVD-OPH ve ekstrelerin birlikte inkübe edildiği hücre gruplarında daha fazla olduğu görüldü. Kaspaz 3 geninin mRNA transkripsiyon düzeyindeki en fazla artış ise Taxol ile inkübe edilen hücre grubunda görülmüş olup, bu gruptaki kaspaz 3 mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre yaklaşık 6 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4.16).

Yapılan istatistiksel analizde, resveratrol, sadece 3-MA, sadece QVD-OPH ve sadece GYE ekstresinin 250 µg/mL'lik konsantrasyonu ile inkübe edilen hücre gruplarındaki kaspaz 3 mRNA düzeylerinin kontrol grubundan farklı olmadığı ($p>0.05$), diğer tüm gruplarda ise kaspaz 3 mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edildi ($p<0.001$). Bununla birlikte, sadece OYE ekstresinin 300 µg/mL'lik konsantrasyonu ile inkübe edilen hücre grubundaki artışın kontrol grubuna göre daha az anlamlı olduğu ($p<0.01$) görüldü. OYE 350 ve GYE 300 µg/mL'lik konsantrasyonu ile inkübe edilen hücre grubu kontrol grubuna göre kıyaslandığında yaklaşık 4.5 kat arttığı görülmüştür.

4.7. C. siliqua Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Apoptoz Yolağında Görev yapan Proteinlerin Ekspresyonlarına Etkileri

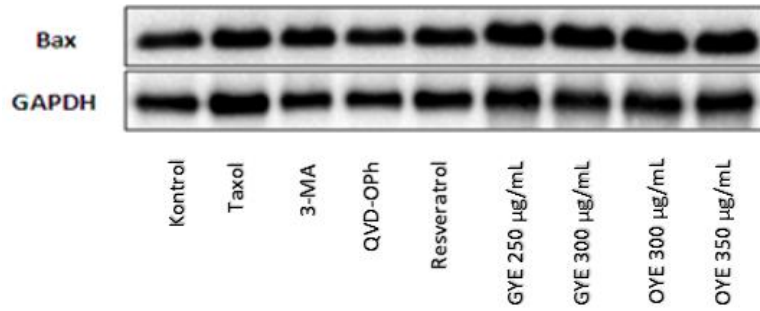
A549 hücrelerinde, GYE ve OYE ekstrelerinin apoptoz yolağında görev yapan Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonları üzerindeki etkileri Western blot analizi ile belirlendi. Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ifade düzeyleri, GAPDH kontrol proteininin ifade seviyesi ile normalize edildi.

Bununla birlikte, western blot deneylerinde örnek sayısının çok fazla olması nedeni ile, sarf malzeme sıkıntısı yaşanmış ve gereç ve yöntem bölümünde de belirtildiği gibi sarf malzeme yetersizliği nedeni ile western blot analizleri ile ilgili tüm deneyler bir kez yapılabilmiştir. Bu nedenle, western blot analizlerinden elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri yapılamamış ve elde edilen sonuçlar kontrol gruplarına (normal kontrol grubu, pozitif kontrol grupları olan QVD-OPh, 3-MA, Taxol ve Resveratrol grupları) göre artma ya da azalma gösterdi şeklinde ifade edilmiştir. Fakat bu artış ya da azalmaların istatistiksel olarak anlamlılıkları belirlenememiştir. Diğer taraftan, yine örnek sayısının çok fazla olması nedeni ile, tüm örnekler tek bir membran üzerinde görüntülenememiştir. Bu sebeple, sadece GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen hücre grupları ve çalışmada pozitif kontrol grupları olarak kullanılan ve hücrelerle tek başına inkübe edilen QVD-OPh, 3-MA, Taxol ve Resveratrol hücre

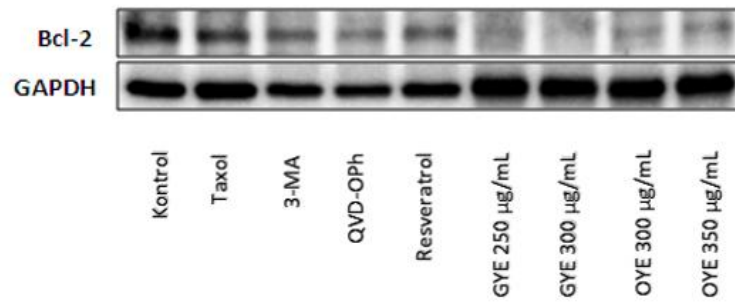
grupları ile tek bir membranda, apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPh ve 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra tekrar GYE ve OYE ekstraları ile inkübe edilen hücre grupları ise başka bir membranda görüntülenmiştir.

4.7.1. *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Hücrelerinde Proapoptotik Bax ve Antiapoptotik Bcl-2 Protein Ekspresyonlarına Etkileri

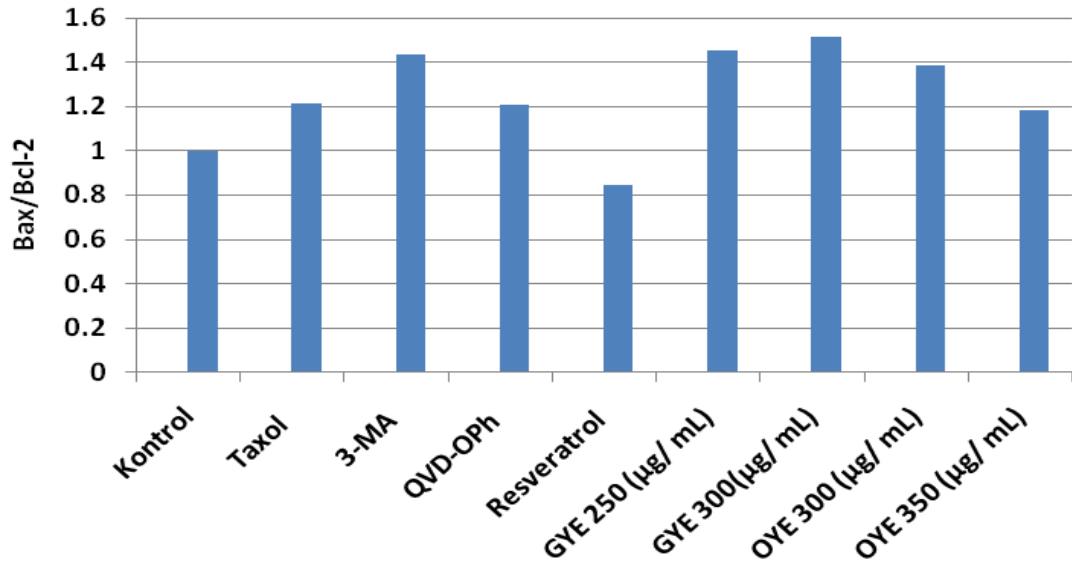
GYE ve OYE ekstraları, taxol, 3-MA, QVD-OPh ve resveratrol'ün A549 hücrelerindeki proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonlarına etkilerini gösteren western blot görüntüleri ve görüntülerin analizi ile elde edilen Bax/Bcl-2 oranına ait grafik sırasıyla Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.17. GYE ve OYE ekstraları, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve Resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarındaki Bax protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.



Şekil 4.18. GYE ve OYE ekstraları, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve Resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarındaki Bcl-2 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.



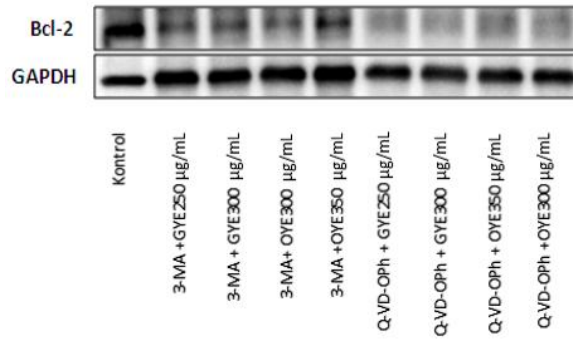
Şekil 4.19. GYE ve OYE ekstraktları, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarındaki Bax/Bcl-2 oranını gösteren grafik.

Western blot analizi sonucunda, Bax/Bcl-2 oranının resveratrol grubu dışında diğer tüm gruplarda kontrol grubuna göre artış gösterdiği görüldü. Bax/Bcl-2 oranındaki en fazla artış ise GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen hücre gruplarında görüldü. Bununla birlikte, GYE ekstresinin 300 µg/mL'lik konsantrasyonu ile inkübe edilen hücre grubundaki Bax/Bcl-2 oranı kontrol grubuna göre yaklaşık 1.5 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4.17-19).

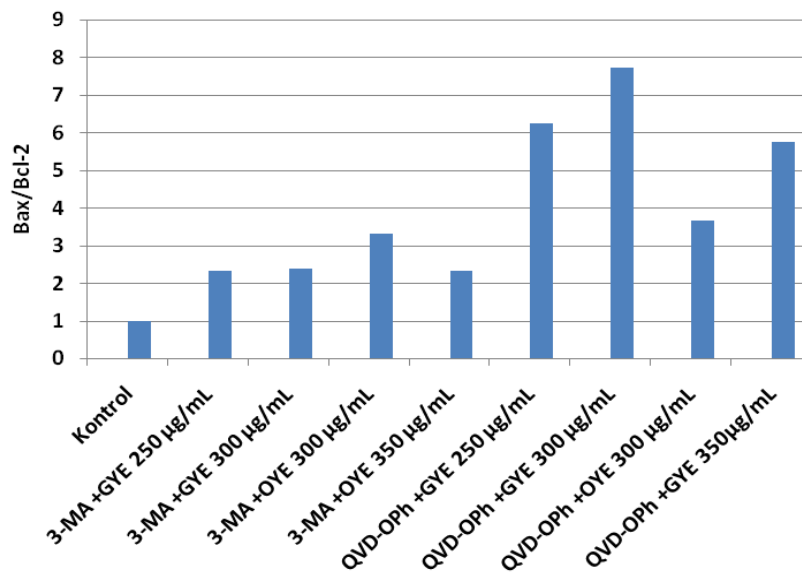
Apoptoz inhibitörü QVD-OPH ve otofaji inhibitörü 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen hücre gruplarındaki proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonlarını gösteren western blot görüntüleri sırasıyla Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de, görüntülerin analizi ile elde edilen Bax/Bcl-2 oranına ait grafik de Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen A549 hücre guplarında Bax protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.



Şekil 4.21. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen A549 hücre guplarında Bcl-2 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.



Şekil 4.22. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen A549 hücre guplarında Bax/Bcl-2 oranını gösteren grafik.

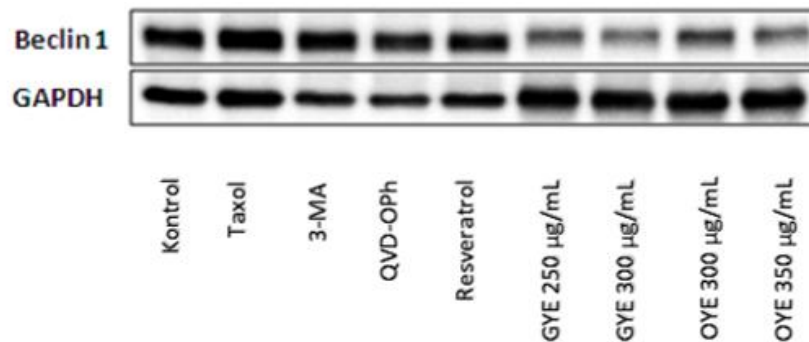
Western blot analizi sonucunda, Bax/Bcl-2 oranının tüm gruplarda kontrol grubuna göre artış gösterdiği görüldü. Bununla birlikte, 3-MA ön inkübasyon yapılan hücre gruplarında Bax/Bcl-2 oranındaki en fazla artış kontrol grubuna göre OYE ekstresinin 300 µg/mL'lik konsantrasyonunda yaklaşık 3.5 kat artış görülmüştür. QVD-OPH ile ön inkübasyon yapılan hücre gruplarında ise Bax/Bcl-2 oranındaki en fazla artış kontrol grubuna göre GYE ekstresinin 300 µg/mL'lik konsantrasyonunda 7.5 kat artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.20-22).

4.8. *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Otofaji Yolağında Görev yapan Proteinlerin Ekspresyonlarına Etkileri

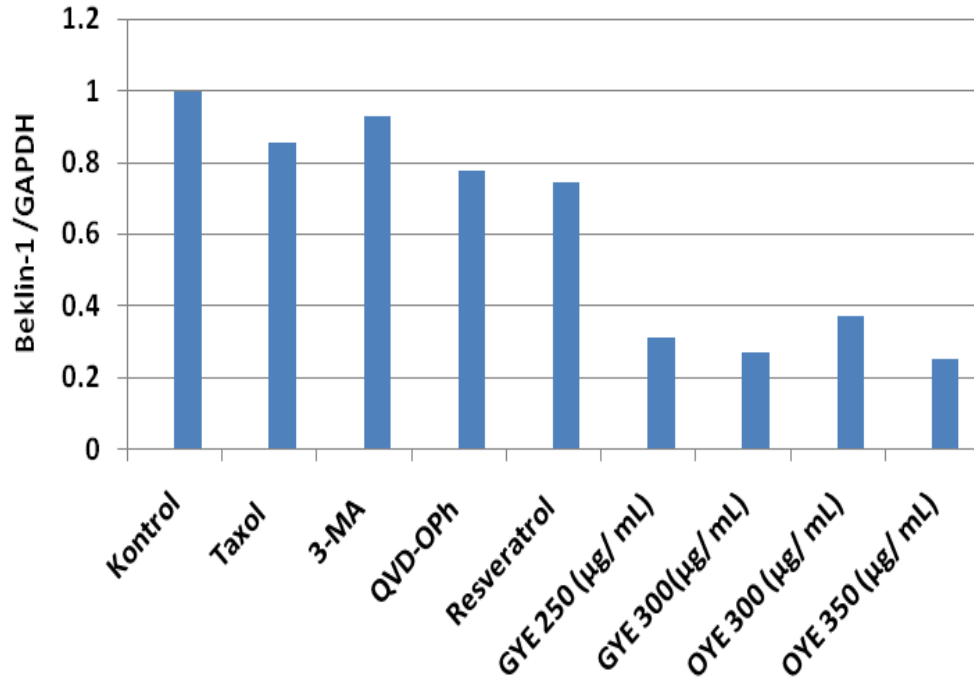
A549 hücrelerinde, GYE ve OYE ekstrelerinin otofaji yolağında görev yapan Beklin 1, Atg 5 ve LC3A/B proteinlerinin ekspresyonları üzerindeki etkileri Western blot analizi ile belirlendi. Beklin 1, Atg 5 ve LC3A/B proteinlerinin ifade düzeyleri GAPDH kontrol proteininin ifade seviyesi ile normalize edildi.

4.8.1. *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Beklin 1 Protein Ekspresyonuna Etkileri

GYE ve OYE ekstreleri, taxol, 3-MA, QVD-OPH ve resveratrol'ün A549 hücrelerindeki Beklin 1 protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüleri Şekil 4.23'de, görüntülerin analizi ile elde edilen beclin 1 ekspresyon düzeylerine ait grafik ise Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



Şekil 4.23. GYE ve OYE ekstreleri, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve Resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Beklin 1 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.



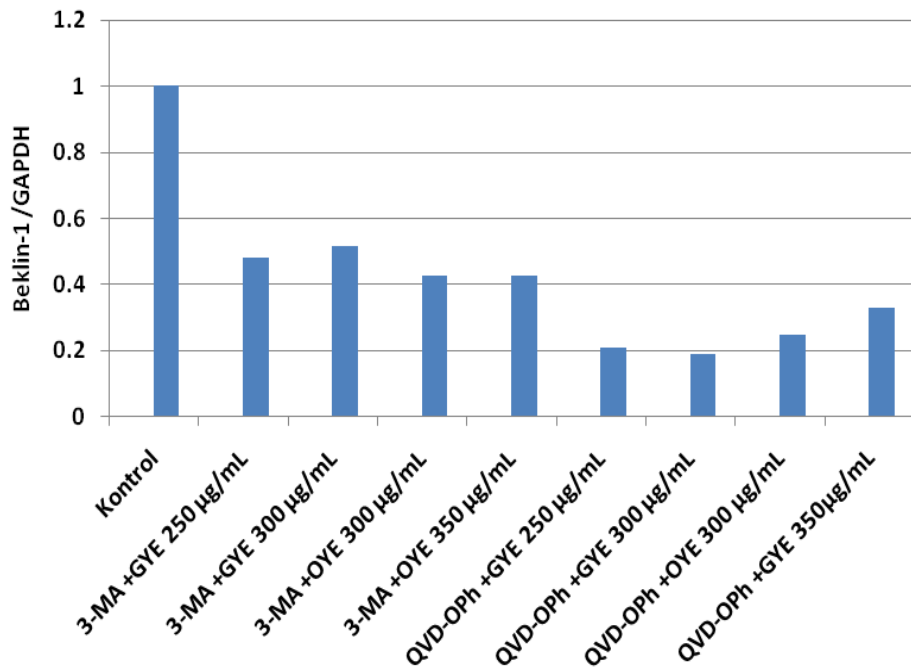
Şekil 4.24. GYE ve OYE ekstreleri, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL) , QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında beclin 1 protein ekspresyon düzeylerini gösteren grafik.

Western blot analizi sonucunda, taxol, 3-MA, QVD-OPH ve resveratrol ile inkübe edilen tüm pozitif kontrol hücre gruplarındaki beclin 1 protein ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. Bununla birlikte, GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen hücre gruplarında beclin 1 protein ekspresyonunu kontrol grubuna göre güçlü şekilde azalma görülmüş olup, en güçlü inhibisyon ise OYE 350 µg/mL'lik konsantrasyonda beclin 1 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre yaklaşık 0.7 kat inhibe olduğu görüldü (Şekil 4.23-24).

Apoptoz inhibitörü QVD-OPH ve otofaji inhibitörü 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen hücre gruplarındaki beclin 1 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüleri Şekil 4.25'de, görüntülerin analizi ile elde edilen beclin 1 ekspresyon düzeylerine ait grafik ise Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında beclin 1 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.



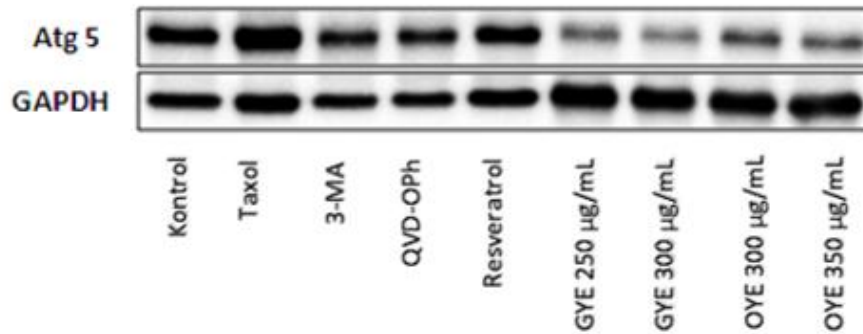
Şekil 4.26. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında beclin 1 protein ekspresyon düzeylerini gösteren grafik.

Western blot analizi sonucunda, GYE ve OYE ekstraktlarının tüm gruplarda beclin 1 protein ekspresyon düzeyini kontrol grubuna göre güçlü şekilde inhibe ettiği görüldü. Bununla birlikte QVD-OPH ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen hücre gruplarında beclin 1 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmış olup, en güçlü inhibisyon ise QVD-OPH ile ön inkübasyon

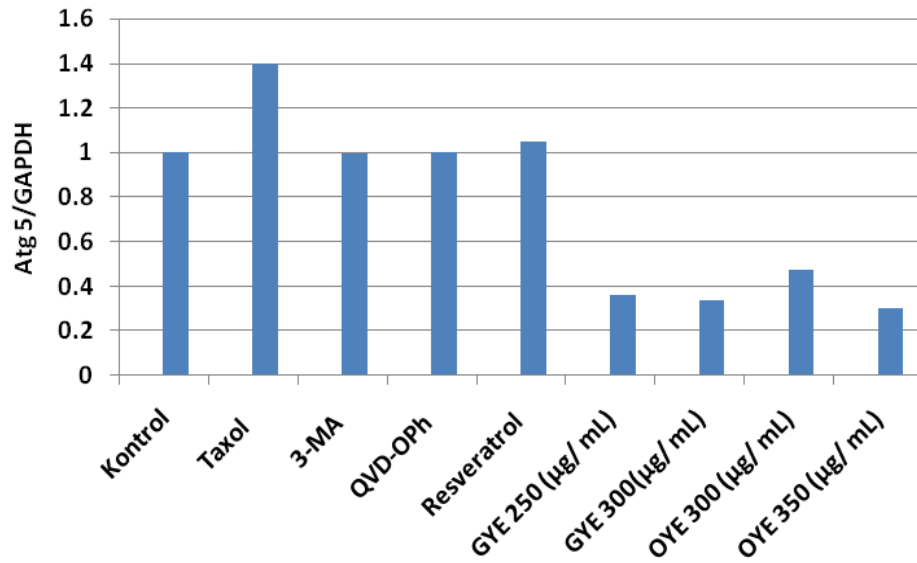
yapıldıktan sonra GYE 300 µg/mL'lik konsantrasyonda beclin 1 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre yaklaşık 0.8 kat azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.25-26). Daha da ötesi, tek başına 3-MA ve tek başına QVD-OPH ile inkübe edilen hücre gruplarındaki beclin 1 ekspresyon düzeylerinin (Şekil 4.23 ve 4.24), 3-MA ve QVD-OPH ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen hücre gruplarında çok daha etkili şekilde azaldığı belirlenmiştir.

4.8.2. *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde Hücrelerinde Atg5 Protein Ekspresyonuna Etkileri

GYE ve OYE ekstraktları, taxol, 3-MA, QVD-OPH ve resveratrol'un A549 hücrelerindeki Atg 5 protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüleri Şekil 4.27'de, görüntülerin analizi ile elde edilen Atg 5 ekspresyon düzeylerine ait grafik ise Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



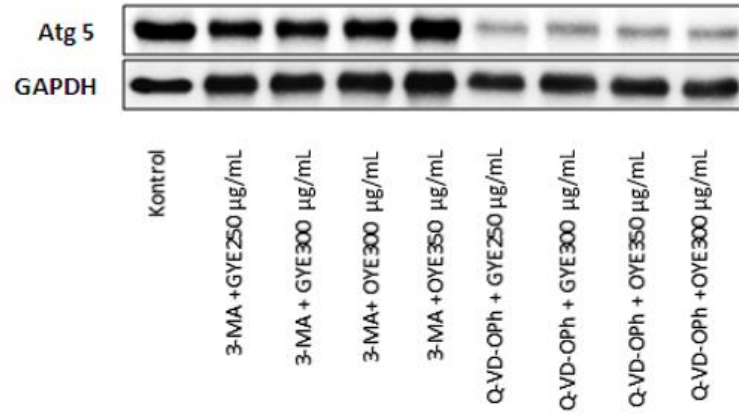
Şekil 4.27. GYE ve OYE ekstraktları, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3µg/mL) ve resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Atg 5 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.



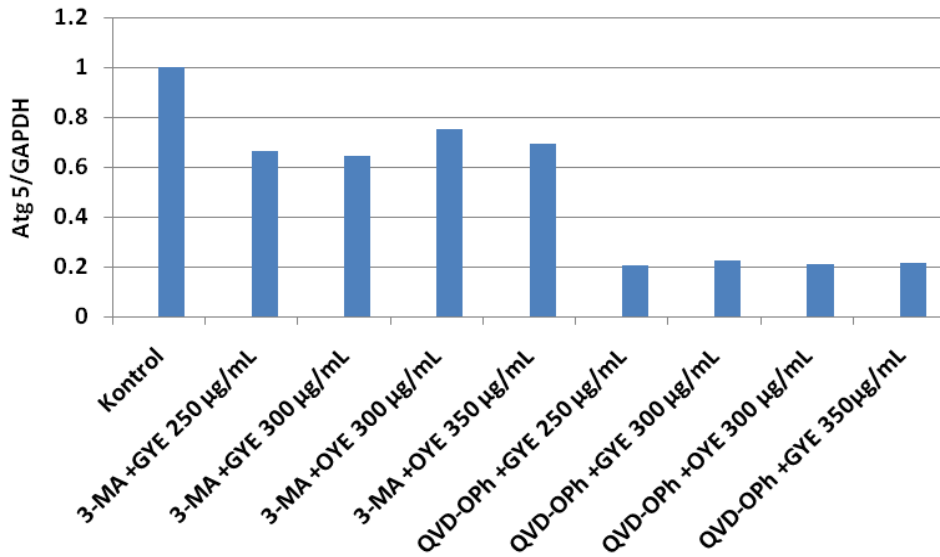
Şekil 4.28. GYE ve OYE ekstraktları, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3µg/mL) ve resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Atg 5 protein ekspresyon düzeylerini gösteren grafik.

Western blot analizi sonucunda, taxol ve resveratrol hücre grubu dışındaki diğer tüm gruplarda Atg 5 protein ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. En güçlü inhibisyon ise kontrol grubuna göre GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen hücre gruplarında olup, en güçlü inhibisyon ise OYE 350 µg/mL'lik konsantrasyonda Atg 5 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre yaklaşık 0.7 kat azaldığı görülmüştür. (Şekil 4.27-28).

Apoptoz inhibitörü QVD-OPH ve otofaji inhibitörü 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen hücre gruplarındaki Atg 5 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüleri Şekil 4.29'da, görüntülerin analizi ile elde edilen Atg 5 ekspresyon düzeylerine ait grafik ise Şekil 4.30'da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Atg 5 protein ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü.



Şekil 4.30. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında Atg 5 protein ekspresyon düzeylerini gösteren grafik.

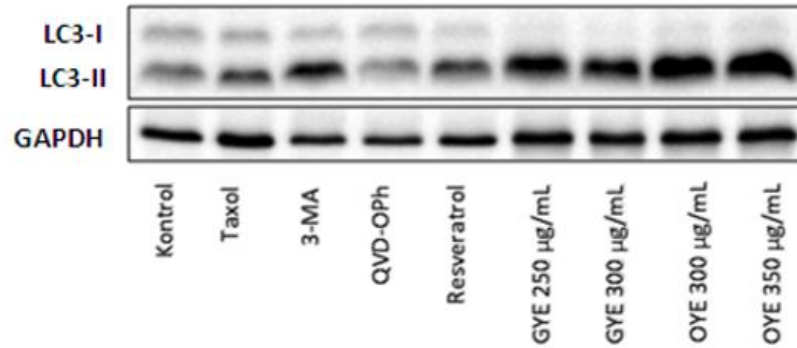
Western blot analizi sonucunda, 3-MA ve QVD-OPH ile ön inkübasyon yapılan tüm hücre gruplarında GYE ve OYE ekstraktlarının Atg 5 protein ekspresyonunu kontrol grubuna göre güçlü şekilde inhibe ettikleri görüldü. En güçlü inhibisyon ise QVD-OPH ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen hücre gruplarında görülmüş olup, en güçlü inhibisyon ise QVD-OPH ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE 350 µg/mL'lik konsantrasyonda Atg 5 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre yaklaşık 0.8 kat azaldığı görülmüştür (Şekil 4.29 ve 4.30). Daha

da ötesi, 3-MA ve QVD-OPH ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen hücre gruplarındaki Atg 5 ekspresyon düzeylerinin, sadece 3-MA ve sadece QVD-OPH ile inkübe edilen hücre gruplarındakine göre (Şekil 4.27 ve 4.28) çok daha etkili şekilde azaldığı belirlendi.

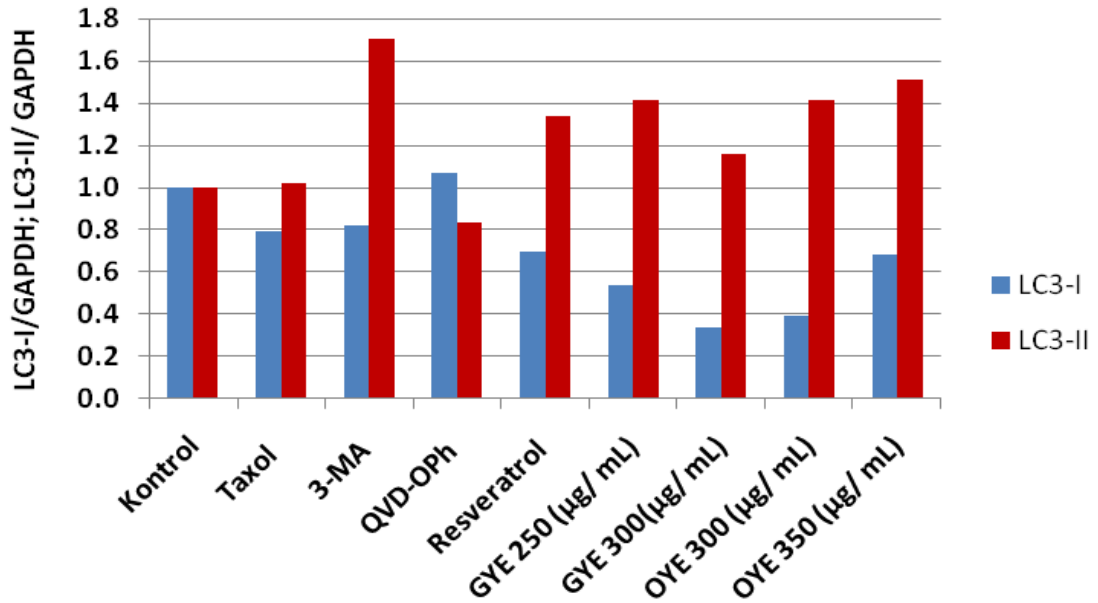
4.8.3. *C. siliqua* Yaprak Ekstrelerinin A549 Hücrelerinde LC3A/B Protein Ekspresyonuna Etkileri,

LC3 A/B (Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 A/B), otofaji belirteci olarak kullanılmaktadır. Otofaji sırasında LC3 A/B (LC3) kesilir ve sitozolik LC3 A/B-1 (LC3-I) tipi oluşturulur. LC3-I’de, fosfatidiletanolamine bağlanarak LC3 A/B-II (LC3-II)’ye dönüşür. LC3-II ise otofajinin belirteci olarak kullanılmaktadır.

GYE ve OYE ekstreleri, taxol, 3-MA, QVD-OPH ve resveratrol’ün A549 hücrelerindeki LC3-I ve LC3-II protein düzeylerine etkilerini gösteren western blot görüntüleri Şekil 4.31’de, görüntülerin analizi ile elde edilen LC3-I ve LC3-II protein düzeylerine ait grafik de Şekil 4.32’de gösterilmiştir.



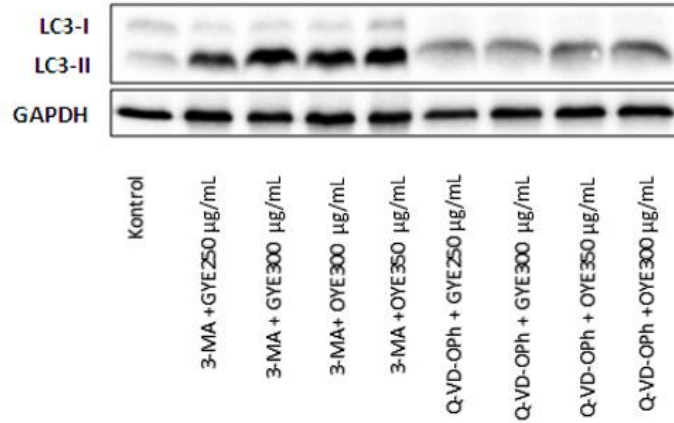
Şekil 4.31. GYE ve OYE ekstreleri, taxol (1.7µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve resveratrol (µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında LC3-II protein düzeyini gösteren western blot görüntüsü.



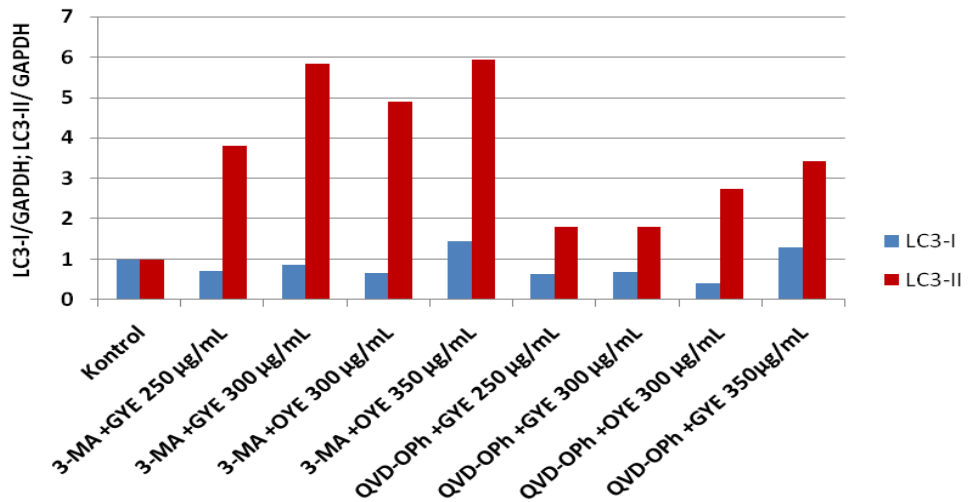
Şekil 4.32. GYE ve OYE ekstraktları, taxol (1.7 µg/mL), 3-MA (746 µg/mL), QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve resveratrol (22.8 µg/mL) ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında LC3-II protein düzeyini gösteren grafik.

Western blot analizi sonucunda, taxol ve QVD-OPH hücre grubu dışındaki diğer tüm hücre gruplarında LC3-II protein düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı görüldü. En etkili artış ise 3-MA ile inkübe edilen hücre grubunda olduğu ve kontrol grubuna göre yaklaşık 1.7 kat arttığı görülmüştür. OYE ekstraktları ile inkübe edilen hücre gruplarında görüldü (Şekil 4.31-32).

Apoptoz inhibitörü QVD-OPH ve otofaji inhibitörü 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen hücre gruplarındaki LC3-I ve LC3-II protein düzeylerini gösteren western blot görüntüleri Şekil 4.33’de, görüntülerin analizi ile elde edilen LC3-I ve LC3-II protein düzeylerine ait grafik ise Şekil 4.34’de gösterilmiştir.



Şekil 4.33. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında LC3-II protein düzeyini gösteren western blot görüntüsü.



Şekil 4.34. Apoptoz ve otofaji inhibitörleri QVD-OPH (10.3 µg/mL) ve 3-MA (746 µg/mL) ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen A549 hücre gruplarında LC3140-II protein düzeyini gösteren grafik.

Western blot analizi sonucunda, 3-MA ve QVD-OPH ile ön inkübasyon yapılan tüm hücre gruplarında LC3-II protein düzeyinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği görüldü. Kontrol grubuna göre en etkili artış ise 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra OYE 350 ve GYE 300 µg/mL'lik ekstre konsantrasyonları ile inkübe edilen hücre gruplarında görülmüş olup, bu gruplardaki LC3-II protein düzeyi kontrol grubuna göre yaklaşık 6 kat artış göstermiştir (Şekil 4.33-34). Daha da ötesi, sadece 3-MA ve sadece QVD-OPH ile inkübe edilen hücre gruplarındaki LC3-II protein düzeylerinin (Şekil 4.31-32), 3-MA ve QVD-OPH ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstraktları ile inkübe edilen hücre gruplarında çok daha etkili şekilde arttığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser vakaları son yüzyıl içerisinde ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sıraya yükselerek halk sağlığı açısından aşılması gereken bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (1, 18, 19).

Akciğer kanseri tedavi stratejileri genellikle kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayan hücre sağ kalım mekanizmalarının baskılanması ve hücre ölümüne neden olan sinyal yollarının tetiklenmesi gibi moleküler mekanizmaları hedef almaktadır. Antitümöral olarak kullanılan çeşitli kemoterapötik ajanların hücre içi moleküler mekanizmalarının araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu kapsamda malign tümörlerin ortadan kaldırılmasında kullanılabilecek ve bireye yan etkisi en aza indirgenmiş kemoterapötik ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (144).

Ülkemizde keçiboynuzu olarak da bilinen ve Fabaceae familyasına ait olan *Ceratonia siliqua* L. (*C. siliqua*) ağacı Akdeniz bölgelerine özgü bir bitki olup, Türkiye’de yaygın olarak Batı ve Güney Anadolu bölgelerinde doğal olarak yetişmektedir (7). Keçiboynuzu ağacının yaprakları fenolik bileşikler açısından zengin olup, meyve ve yapraklarından elde edilen ekstraktların çeşitli kanser hücre hatları üzerinde antioksidan ve antiproliferatif aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (115). *C. siliqua* yaprak ekstresinin yüksek antioksidan ve antiproliferatif aktiviteye sahip olması sebebi ile, bu bitkinin nutrasötik ya da farmasötik bir ürün olarak geliştirilmesi gerektiği belirtilmektedir (8, 9, 11-16).

Yapılan bir çalışmada, *C. Siliqua* yapraklarından hazırlanan su ekstresi ve total oligomer flavonoid (TOF)’lerin murin lösemi hücre hattı (L1210) üzerinde antioksidan etkileri araştırılmıştır. L1210 hücreleri, 25-400 µg/mL doz aralığındaki TOF ve su ekstresi ile 48 saat inkübe edilmiş ve MTT analizi ile TOF ve su ekstresinin L1210 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 65 ve 140 µg/mL olarak belirlenmiştir (115).

Bizim çalışmamızda ise, *C. siliqua* yapraklarından hazırlanan GYE ve OYE ekstralarının 24 saatlik inkübasyon sonucu A549 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 300 µg/mL ve 350 µg/mL olarak bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada, *C. siliqua* yapraklarından % 70'lik etanol ekstresi hazırlanarak ekstrenin toplam flavonoid içeriği yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tespit edilmiştir. HPLC analizi sonucunda, ekstre içeriğinde yüksek miktarda mirsetin, kersetin ve kamferol bulunduğu belirlenmiştir (130). *C. siliqua* kabuk (tohum zarfı) ve yapraklarından elde edilen ekstraların fare hepatosellüler karsinoma (T1) hücre hattı üzerindeki antitümoral etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise; ekstraların HPLC analizi yapılmış ve analiz sonucunda bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak ekstraların içeriğinde GAc, EGCG ve ECG'nin bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada her iki ekstrenin T1 hücreleri ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda kaspaz 3 aktivasyonunun arttığı ve böylece apoptozun indüklendiği belirtilmiştir (8). Bizim çalışmamızda ise, *C. siliqua* yapraklarından elde edilen %70'lik metanol ve %70'lik etanol ekstralarının fenolik bileşik içerikleri LC/MS/MS ile analiz edilmiş ve analiz sonucunda %70'lik metanol ekstresinin içeriğinde GAc, EGCG ve ECG bileşiklerinin, %70'lik etanol ekstresinin içeriğinde ise GAc, EGCG, ECG ve CIAC bileşiklerinin bulunduğu tespit edilmiştir.

C. siliqua yaprak ekstralarının içeriğinde bulunan GAc, CIAC, EGCG ve ECG bileşiklerinin çeşitli tümör hücre hatlarında, tümör hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalara yönelik literatür taraması yapılmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda, EGCG'nin 10-500 µM'lık konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen mezotelyoma hücre hatlarında (EHMES-10, EHMES-1, ACC-meso, Y-meso, ve MSTO-211H) EGCG'nin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Buna göre, EGCG'nin EHMES-10, EHMES-1, ACC-meso, Y-meso, ve MSTO-211H hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 179, 29, 42, 128, 35 µM olarak belirlenmiştir (145). Bizim çalışmamızda ise, EGCG'nin 9.1-91.6 µg/mL (20-200 µM) aralığındaki konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen A549 hücre hattında, EGCG'nin A549 hücrelerinin canlılıklarını anlamlı şekilde azaltmadığı görüldü. Bu sebeple, EGCG'nin A549 hücreleri üzerindeki IC₅₀ dozu elde edilememiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, GAc'nin çeşitli konsantrasyonları ile 48 saat inkübe edilen küçük hücreli karsinoma (SBC-3), skuamöz hücreli karsinoma (EBC-1) ve

adenokarsinoma (A549) kanseri hücre hatlarının canlılıkları üzerindeki etkisi MTT analizi ile belirlenmiş ve IC₅₀ değeri sırasıyla 10, 20, 60 µg/mL olarak belirlenmiştir (118). Bizim çalışmamızda ise GAc'nin 3.4-34 µg/mL (20-200 µM) aralığındaki konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda A549 hücre hattındaki IC₅₀ dozu elde edilememiştir.

Yapılan bir çalışmada klorojenik asitin 30 ve 50 µM'lık konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen A549 hücre hattında kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığının sırasıyla %27 ve %39 oranında inhibe olduğu belirtilmektedir (146). Bizim çalışmamızda ise klorojenik asitin 7-70.8 µg/mL (20-200 µM) aralığındaki konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen A549 hücre hattında klorojenik asitin A549 hücrelerinin canlılıklarını anlamlı şekilde azaltmadığı görüldü. Bu sebeple, klorojenik asitin A549 hücreleri üzerindeki IC₅₀ dozu elde edilemedi.

ECG'nin insan melanom kanseri (A375) hücre hattı üzerindeki antitümoral etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ECG'nin 100 µM'lık konsantrasyonunun kaspaz 3 aktivitesini artırarak apoptozu indüklediği belirtilmiştir (121). Bizim çalışmamızda ise A549 hücre hattında 8.8-88.4 µg/mL (20-200 µM) konsantrasyon aralığında ECG'nin IC₅₀ dozu belirlenememiştir.

Tez çalışması kapsamında, ekstrelerin içeriğinde bulunan GAc, CIAC, EGCG ve ECG bileşiklerinin A549 hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkileri 200 µM'lık konsantrasyona kadar incelenmiştir. Çalışma sonucunda, etkileri araştırılan fenolik bileşiklerden hiçbirinin A549 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri belirlenememiş ve çalışmada kullanılan doz aralığı (20-200 µM) IC₅₀ değerini belirlemede yetersiz kalmıştır. Bununla birlikte, fenolik bileşiklerin 200 µM'dan daha yüksek konsantrasyonları kullanıldığında A549 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri elde edilebilmekle birlikte, fenolik bileşiklerin daha yüksek konsantrasyonlarının sağlıklı hücreler üzerinde de sitotoksik etkiye neden olabileceklerinden dolayı 200 µM'dan daha yüksek konsantrasyonlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Akciğer kanserinin tedavisinde antitümoral bir ilaç olarak kullanılan taxol'un B lenfoma hücre hattında (BJAB) bcl-2 gen ve protein düzeylerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, taxol ile muamele edilen hücrelerde bcl-2 gen ve protein düzeylerinin azaldığı belirtilmektedir (147). Bizim çalışmamızda da taxol apoptozun uyarılmasında

pozitif kontrol olarak kullanılmış ve taxol'ün 1.7 µg/mL'lik konsantrasyonda A549 hücrelerinde Bax'ın gen ifadesini artırdığı Bcl-2 gen ifadesini ise tamamen inhibe ettiği görülmüştür.

Resveratrol, anti tümöral ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu oldukça iyi bilinen polifenol bir fitoaleksindir. Çalışmamızda resveratrol, A549 hücrelerinde otofajiyi indükleyerek otofaji ve apoptoz arasındaki ilişkiyi açığa çıkarmak için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (139). Yapılan bir çalışmada, insan kronik myeloid lösemi hücresi olan K562 hücre hattı 5-160 µM konsantrasyon aralığındaki resveratrol ile 72 saat inkübe edilmiş ve resveratrolün hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda resveratrolün kanser hücrelerinin canlılığını doza ve süreye bağlı olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (148). Başka bir çalışmada, resveratrolün 25 µM'ın üzeri dozlarda sisplatin, etoposid ve 5-florourasil ile kombine edildiğinde çeşitli kanser hücreleri üzerindeki terapötik etkinliğinin arttığı belirtilmektedir (57). Başka bir çalışmada da, A549 hücre hattında 50 µM resveratrol ile 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda resveratrol ile 24 saat inkübe edilen hücre grubunun inhibisyon oranı % 65.8 iken 72 saat inkübe edilen hücre grubundaki inhibisyon oranının % 40'lara kadar düştüğü belirtilmektedir (139). Bizim çalışmamızda ise, otofajinin indüklenmesinde pozitif kontrol olarak kullanılan resveratrol 1.1-45.6 µg/mL (5-200 µM) konsantrasyon aralığında A549 hücreleri ile 24 saat inkübe edilerek MTT analizi ile IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Resveratrolün 11.4 µg/mL'lik (50 µM) konsantrasyonunun hücre canlılığını ancak % 70'lere kadar düşürdüğü, 22.8 µg/mL'lik (100 µM) konsantrasyonunun ise hücre canlılığını % 50'ye düşürdüğü görülmüştür. Bu verilere göre çalışmamızda kullanılan resveretrolün IC₅₀ dozu literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada, A549 hücre hattında apoptoz ve otofaji yolları arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmak için apoptoz inhibitörü QVD-OPh (20 µM) kullanılmış ve QVD-OPh'in kaspaz 9 üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, QVD-OPh'in kaspaz 9 aktivasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür (140). Bizim çalışmamızda da QVD-OPh literatür bilgisi ile uyumlu olarak 10.3 µg/mL (20 µM)'lik konsantrasyonda kullanılmış ve A549 hücrelerinde QVD-OPh'in kaspaz 3 mRNA gen ifadesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak değiştirmedeği görülmüştür. Diğer taraftan QVD-OPh ile 1 saat ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE (300 µg/mL) ekstresi ile

muamele edilen hücre grubunda, kaspaz 3 mRNA gen ifadesinin tek başına QVD-OPh ile muamele edilen hücre grubuna göre yaklaşık 2 kat, kontrol grubuna göre de yaklaşık 5 kat arttığı görülmüştür. Bu artış GYE (300 µg/mL) ekstresinin A549 hücre hattında kaspaz 3 gen ifadesini artırarak apoptotik hücre ölümünü uyarıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Yine A549 hücreleri ile yapılan bir başka çalışmada, 5mM 3-MA ile iki saat ön inkübasyon yapıldıktan sonra, A549 hücreleri sfingozilfosforilkolin maddesi ile 3, 6, 12 saat inkübe edilmiş ve çalışma sonucunda A549 hücrelerinde LC3-II protein ekspresyon düzeyinin zamana ve doza bağlı olarak artış gösterdiği belirtilmiştir (142). Bizim çalışmamızda da 5mM (746 µg/mL) 3-MA ile 1 saat ön inkübasyon yapıldıktan sonra ekstrelerle inkübe edilen A549 hücre gruplarında LC3-II protein düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. Bu gruplarda ayrıca Bax/Bcl-2 ve kaspaz 3 mRNA düzeylerinde de kontrol grubuna göre artış olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, OYE ve GYE ekstrelerinin otofaji inhibitörü varlığında apoptotik belirteçlerin ifadelerini arttırdığını göstermiştir.

Ayrıca, çalışmamız sonucunda otofaji inhibitörü 3-MA ile ön inkübasyon yapılan hücre grubu dışında, sadece OYE ve GYE ekstreleri ile inkübe edilen hücre gruplarında da kontrol grubuna göre proapoptotik Bax gen ifadesinin arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar ise, GYE ve OYE ekstrelerinin apoptozu uyarmada etkili olduğunu göstermiştir.

Gallik asitin (GAc), farklı kanser hücre hatlarında apoptozu uyardığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, küçük hücreli olmayan insan akciğer kanseri NCI-H460 hücre hattında GAc (250 µM) ile 0, 6, 12, 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda Bax ve Bad protein düzeyleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, GAc'nin NCI-H460 hücre hattında proapoptotik Bax protein düzeyini kontrol grubuna göre artırdığı, antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL düzeylerini ise azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca, GAc'nin NCI-H460 hücrelerinde kaspaz 3 gen ekspresyon düzeyini de süreye bağlı olarak artırdığı belirtilmiştir (149).

Tez çalışması kapsamında OYE ve GYE ekstrelerinin A549 hücrelerinde kaspaz 3 mRNA düzeyini artırdığı görülmüştür. En etkili artışın ise anti kanser bir ilaç olan taxol ile muamele edilen hücre grubunda olduğu görülmüştür. 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra OYE ve GYE ekstreleri ile inkübe edilen hücre grubu, tek başına ekstre ile inkübe edilen hücre grubu ile kıyaslandığında kaspaz 3 mRNA düzeyinin daha

da arttığı görülmüştür. Bu verilere göre 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra OYE ve GYE ekstreleri ile inkübe edilen hücre gruplarında kontrol grubuna göre kaspaz 3 gen ifadesinin artması ekstrelerin otofajinin inhibisyonu sonucunda apoptotik yolağı aktifleştirdiğini göstermiştir.

Yapılan farklı bir çalışmada ise, A549 akciğer kanseri hücrelerinin 40 ve 80 $\mu\text{mol/L}$ EGCG ile 24 saat inkübasyonu sonucunda kontrol grubuna göre antiapoptotik Bcl-xL protein düzeyinin azaldığı ve proapoptotik Bax protein düzeyinin ise arttığı görülmüştür (150). Bizim çalışmamızda ise, EGCG'nin kullanılan doz aralığında (20-200 μM) A549 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, OYE ve GYE ekstrelerinin A549 hücrelerinde Bax/Bcl-2 protein düzeyini artırdığı görülmüştür. Ayrıca 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra OYE (300 $\mu\text{g/mL}$) ekstresi ile muamele edilen hücre grubu, tek başına OYE (300 $\mu\text{g/mL}$) ekstresi ile muamele edilen hücre grubu ile kıyaslandığında Bax/Bcl-2 protein düzeyinin yaklaşık 2.5 kat attığı görülmüştür.

Beklin-1 proteininin otofajinin uyarılmasında önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (26, 88). Bununla birlikte, yapılan literatür taraması sonucunda *Ceratonia siliqua* L. ve içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin (GAc, EGCG, ECG ve ClAc) A549 hücre hattında beklin 1 protein düzeyine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Farklı kanser türleri üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, otofajiyle ilgili beklin-1 proteininin kanser hücrelerinde düşük düzeyde ifade edildiği ve kanser oluşumunda tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı belirtilmiştir (151). Bizim çalışmamızda ise, beklin-1 protein düzeyinin A549 hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edildiği görülmüş ve 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra GYE ve OYE ekstreleri ile muamele edilen hücre grupları sadece GYE ve OYE ekstreleri ile inkübe edilen hücre grupları ile karşılaştırıldığında, tüm hücre gruplarındaki beklin 1 protein düzeyinin kontrol grubuna göre oldukça azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar, OYE ve GYE ekstrelerinin A549 hücre canlılığı üzerinde inhibe edici etkilerini beklin 1 protein ekspresyonunu azaltarak gösterdiklerini ortaya çıkarmıştır.

Atg 5, izolasyon memranı ya da fagofor oluşumu için otofajinin ilk evresinde gereklidir ve iki ubiquitin benzeri bir konjugasyon sisteminde görev almaktadır (152). Yapılan literatür taraması sonucunda *Ceratonia siliqua* L.'nin A549 hücre hattında Atg 5 protein düzeyine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Çalışmamızdan

elde edilen sonuçlar, tek başına GYE ve OYE ekstralarının A549 hücreleri üzerinde Atg 5 protein düzeyini kontrol grubuna göre azalttığı görülmüştür. Çalışmamızda western blot ile ilgili analizler gereç ve yöntem bölümünde de belirtildiği gibi, bir kez yapılabilmektedir. Bu sebeple, GYE ve OYE ekstralarının A549 hücrelerindeki Atg 5 protein düzeyine etkilerinin tam olarak anlaşılabilmesi için western blot ile ilgili analizlerin tekrarlanması gerektiği düşünülmektedir.

LC3-II otofagozom zarına bağlanarak otofaji sürecine önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada, EGCG'nin otofajik yolak üzerindeki etkisini belirlemek için insan mesotheliyoma hücre hatlarında (ACC-meso, Y-meso ve EHMES-10) LC3-II protein ifadeleri araştırılmıştır. ACC-meso hücre hattı 50 μ M, Y-meso hücre hattı 200 μ M ve EHMES-10 hücre hattı ise 250 μ M EGCG ile 3, 6, 9 saat inkübe edilmiştir. Bu verilere göre 3 ve 6. saatlerde EGCG'nin üç hücre hattında da LC3-II protein düzeyini artırdığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar EGCG'nin mesotheliyoma hücrelerinde otofajinin belirteci olarak görülen LC3-II'yi uyarmakta etkili olduğunu göstermiştir (145).

Bir başka çalışmada ise, gastrit kanseri HGC-27 hücre hattı üzerinde resveratrolün LC3-II protein düzeyine etkisi araştırılmıştır. Resveratrol ile 6 saat inkübasyona maruz bırakılan hücre grubunda LC3-II protein düzeyinde artış görülmediği, 16 ve 24 saat inkübasyona bırakılan hücre grubunda ise LC3-II protein düzeyinde artış görüldüğü belirtilmektedir (137). Çalışmamızda resveratrol ile muamele edilen hücre grubundaki LC3-II protein düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür.

Çalışmamızda, GYE ve OYE ekstraları ile inkübe edilen tüm hücre gruplarındaki LC3-II protein düzeylerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği görülmüştür. LC3-II protein düzeyindeki en etkili artış ise OYE (350 μ g/mL) ekstresi ile inkübe edilen hücre grubunda görülmüş olup, bu gruptaki LC3-II protein düzeyinin kontrol grubuna göre yaklaşık 1.5 kat arttığı görülmüştür. 3-MA ile ön inkübasyon yapıldıktan sonra OYE (350 μ g/mL) ekstresi ile inkübe edilen hücre grubunda ise, LC3-II protein düzeyinin kontrol grubuna göre yaklaşık 5.5 kat arttığı görülmüştür. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, ekstraların otofajiyi etkili şekilde indüklediğini göstermiştir.

Yapılan pek çok antikanser çalışmalarında otofaji ve apoptoz arasındaki bağlantı ortaya çıkarılmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmaların asıl hedefi, kanser hücrelerinde hücre ölümü ve yaşamı arasındaki bozulan dengenin düzenlenmesi amacıyla hücre ölüm

yolaklarında rol olan temel moleküler mekanizmalarının açığa çıkarılmasıdır. Otofaji ve apoptoz arasında üç farklı bağlantı söz konusudur. Tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz sonuçlara göre, tek başına ekstre ile inkübe edilen ve inhibitörlerle birlikte inkübe edilen hücre gruplarının kontrol grubu ve pozitif kontrollerle kıyaslanması sonucunda otofaji ve apoptoz arasındaki bağlantı tam olarak anlaşılamamıştır. Bu sebeple, A549 hücrelerinde otofaji ve apoptoz arasındaki mekanizmanın ortaya çıkarılması için farklı moleküler yöntemlerin de kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Ghali W, Vaudry D, Jouenne T, Marzouki MN. Lycium Europaeum Fruit Extract: Antiproliferative Activity on A549 Human Lung Carcinoma Cells and PC12 Rat Adrenal Medulla Cancer Cells and Assessment of Its Cytotoxicity on Cerebellum Granule Cells. Nutr Cancer 2015; 67(4): 637-46.
2. Hsieh YJ, Huang HS, Leu YL, et al. Anticancer Activity of Kalanchoe tubiflora Extract Against Human Lung Cancer Cells In Vitro and In Vivo Environ Toxicol 2016; 31(11): 1663-1673.
3. Hacıkamiloğlu E, Gültekin M, Boztaş G, ve ark. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanseri Daire Başkanlığı, “Türkiye Kanseri İstatistikleri”, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 2017, 44-46.
4. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET Amplification Leads To Gefitinib Resistance In Lung Cancer By Activating ERBB3 Signaling. Science 2007; 316(5827): 1039-43.
5. Moreira H, Szyjka A, Gasiorowski K. Chemopreventive Activity Of Celastrol In Drug-Resistant Human Colon Carcinoma Cell Cultures. Oncotarget 2018; 9(30): 21211-21223.
6. Wang L, Wang J, Fang L, et al. Chemopreventive Activity Of Celastrol In Drug-Resistant Human Colon Carcinoma Cell Cultures. Oncotarget 2014; 2014: 453972
7. Gulay MS, Yildiz-Gulay O, Ata A, Balic A, Demirtaş A. Toxicological Evaluation of Carob (*Ceratonia siliqua*) Bean Extracts in Male New Zealand White Rabbits J Anim Vet Adv 2012; 11: 1853-1857.
8. Corsi L, Avallone R, Cosenza F, et al. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. Fitoterapia 2002; 73(7-8): 674-84.

9. Kumazawa S, Taniguchi M, Suzuki Y, et al. Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 373–377.
10. Makris DP, Kefalas P. Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a Source of Polyphenolic Antioxidants. *Food Technol. Biotechnol* 2004; 42 (2): 105–108.
11. Karim AA, Azlan A. Fruit Pod Extracts as a Source of Nutraceuticals and Pharmaceuticals. *Molecules* 2012; 17(10): 11931-11946.
12. Zunft HJ, Lüder W, Harde A, et al. Carob Pulp Preparation for Treatment of Hypercholesterolemia. *Adv Ther* 2001;18(5): 230-6.
13. Avallone R, Cosenza F, Farina F, Baraldi C, Baraldi M. Extraction and Purification from *Ceratonia siliqua* of Compounds Acting on Central and Peripheral Benzodiazepine Receptors. *Fitoterapia* 2002; 73: 390–396.
14. Agrawal A, Mohan M, Kasture S, et al. Antidepressant Activity of *Ceratonia siliqua* L. Fruit Extract, A Source of Polyphenols. *Nat Product Res* 2011; 25: 450–456.
15. Souli A, Sebai H, Chehimi L, et al. Hepatoprotective Effect of Carob Against Acute Ethanol-induced Oxidative Stress in Rat. *Toxicol Ind Health* 2015; 31(9): 802-10.
16. Baraldi M. Aqueous Extract of *Ceratonia siliqua* Leaves and Pods Containing Polyphenols with Antioxidant and Antitumor Activities. *Eur Patent* 2004; EP1438058A1, WO 2003033006 A1.
17. Vorster C, Stander A, Joubert A. Differential signaling involved in *Sutherlandia frutescens*-induced cell death in MCF-7 and MCF-12A cells. *J Ethnopharmacol* 2012; 140(1): 123-30.
18. Leclerc L, Fransolet M, Cote F, et al. Heat-Modified Citrus Pectin Induces Apoptosis-Like Cell Death And Autophagy In Hepg2 And A549 Cancer Cells. *Plos One* 2015; 10(3): E0115831.
19. Rathee D, Lather V, Grewal AS, Dureja H. Targeting matrix metalloproteinases with novel diazepam substituted cinnamic acid derivatives: design, synthesis, in vitro and in silico studies. *Chem Cent J* 2018; 12(1): 41.
20. Erman Y. Erkek Ve Kadınların Diyet-Kanser İlişkisi Hakkında Bilgi Ve İnanışları, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2007: 144.

21. Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Frajese GV, Tresoldi I, et al. In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment *Int J Mol Sci* 2015; 16(5): 9236.
22. Weng CJ, Yang YT, Ho CT, Yen GC. Mechanisms of Apoptotic Effects Induced by Resveratrol, Dibenzoylmethane, and Their Analogues on Human Lung Carcinoma Cells *J Agric Food Chem* 2009; 57(12): 5235-43.
23. De Silva L, Chuah LH, Meganathan P, Fu JY. Tocotrienol And Cancer Metastasis. *Biofactors* 2016; 42(2): 149-62.
24. Schulz WA. *Molecular Biology of Human Cancers*, Springer Science+Business Media B.V, Springer Netherlands, 2005:508.
25. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, et al. Chemical Carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc* 2007; 79(4): 593-616.
26. Ghosh S, Bishayee K, Khuda-Bukhsh AR. Graveoline Isolated from Ethanolic Extract of *Ruta graveolens* Triggers Apoptosis and Autophagy in Skin Melanoma Cells: A Novel Apoptosis-Independent Autophagic Signaling Pathway. *Phytother Res* 2014; 28(8): 1153-62.
27. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
28. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 2008; 19(1): 55-63.
29. Hanahan D, Coussens LM. Accessories To The Crime: Functions Of Cells Recruited To The Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 2012; 21(3): 309-22.
30. Maslov AY, Vijg J. Genome Instability, Cancer And Aging. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790(10): 963-9.
31. Denko NC, Giaccia AJ, Stringer JR, Stambrook PJ The Human Ha-Ras Oncogene Induces Genomic Instability In Murine Fibroblasts Within One Cell Cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(11): 5124-8.
32. Braicu C, Pileczki V, Pop L et al. Dual Targeted Therapy With P53 Sirna And Epigallocatechingallate In A Triple Negative Breast Cancer Cell Model *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 791-800.
33. Chen WS, Wei Sj, Liu JM. et al. Tumor Invasiveness And Liver Metastasis Of Colon Cancer Cells Correlated With Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression And

- Inhibited By A COX-2-Selective Inhibitor, Etodolac *Int J Cancer* 2001; 91(6): 894-9.
34. Zhou Y, Rucker EB, Zhou BP. Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2016; 48(1): 60-74.
 35. Cuevas I, Boudreau N. Chapter 2 Managing Tumor Angiogenesis: Lessons from VEGF-Resistant Tumors and Wounds. *Adv Cancer Res* 2009; 103: 25-42.
 36. Lopes-Bastos BM, Jiang WG, Cai J. Tumour-Endothelial Cell Communications: Important and Indispensable Mediators of Tumour Angiogenesis. *Anticancer Res* 2016; 36(3): 1119-26.
 37. Xie XC, Ge LY, Lai H et al. The Relationship between Telomerase Activity and Clinicopathological Parameters in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis *Balka Med J* 2016; 33(1): 64-71.
 38. Gao Y, Xu J, Li B, Jin Y. PCR-free and label-free fluorescent detection of telomerase activity at single-cell level based on triple amplification. *Biosensors and Bioelectronics* 2016; 81: 415–422.
 39. Tana CS, Cho BC, Soo RA. Next-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor receptor - mutant non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2016; 93: 59-68.
 40. Li MJ, He Q, Li M, Luo F, Guan YS. Role of gefitinib in the targeted treatment of non-small-cell lung cancer in Chinese patients. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 1291-302.
 41. Tan CS, Gilligan D, Pacey S Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2015; 16(9): e447-e459.
 42. Pirker R, Filipits M. Personalized treatment of advanced non-small-cell lung cancer in routine clinical practice. *Cancer Metastasis Rev* 2016; 35(1): 141-50.
 43. Miller YE. Pathogenesis of lung cancer: 100 year report. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33(3): 216-23.

44. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology Of Lung Cancer: Diagnosis And Management Of Lungcancer. 3rd Ed: American College Of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest 2013; 143(5): 1-29.
45. Bao M, Song Y, Xia J et al. miR-1269 promotes cell survival and proliferation by targeting tp53 and caspase-9 in lung Cancer. Onco Targets Ther 2018; 11: 1721-1732.
46. Sabari JK, Paik PK. Relevance Of Genetic Alterations In Squamous And Small Cell Lung Cancer. Ann Transl Med 2017; 5(18): 373.
47. Saito G, Jinta T, Nakaoka H, et al. Small Cell Lung Cancer In A 20-Year-Old Non Smoking Man With Systemic sclerosis. Intern Med 2017; 56(12): 1549-1552.
48. Kim HJ, Park C, Han MH, et al. Baicalein Induces Caspase-dependent Apoptosis Associated with the Generation of ROS and the Activation of AMPK in Human Lung Carcinoma A549 Cells. Drug Dev Res 2016; 77(2): 73-86.
49. Park K, Tan EH, O'Byrne K, et al. Afatinib Versus Gefitinib As First-Line Treatment Of Patients With EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (LUX-Lung 7): A Phase 2B, Open-Label, Randomised Controlled Trial. Lancet Oncol 2016; 17(5): 577-89.
50. Tai CJ, Wang CK, Tai CJ, et al. Aqueous Extract of Solanum nigrum Leaves Induces Autophagy and Enhances Cytotoxicity of Cisplatin, Doxorubicin, Docetaxel, and 5-Fluorouracil in Human Colorectal Carcinoma Cells. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013: 514719.
51. Kong F, Zhang R, Zhao X et al. Resveratrol raises *in vitro* anticancer effects of paclitaxel in NSCLC cell line A549 through COX-2 expression. Korean J Physiol Pharmacol 2017; 21(5): 465-474.
52. Leiva MC, Ortiz R, Contreras-Caceres R et al. Tripalmitin nanoparticle formulations significantly enhance paclitaxel antitumor activity against breast and lung cancer cells in vitro. Sci Rep 2017; 7(1): 13506.
53. Chen K, Shi W. Autophagy regulates resistance of non-small cell lung cancer cells to paclitaxel. Tumor Biol 2016; 37: 10539–10544.
54. Ying L, Zhu Z, Xu Z, et al. Cancer Associated Fibroblast-Derived Hepatocyte Growth Factor Inhibits the Paclitaxel-Induced Apoptosis of Lung Cancer A549

- Cells by Up-Regulating the PI3K/Akt and GRP78 Signaling on a Microfluidic Platform. *PLoS One*. 2015; 10(6): e0129593.
55. He F, Du T, Jiang Q, Zhang Y. Synergistic Effect of Notch-3-Specific Inhibition and Paclitaxel in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells Via Activation of The Intrinsic Apoptosis Pathway. *Med Sci Monit* 2017; 23: 3760-3769.
 56. Piotrowska H, Myszkowski K, Ziolkowska A, et al Resveratrol analogue 3,4,4',5-tetramethoxystilbene inhibits growth, arrests cell cycle and induces apoptosis in ovarian SKOV-3 and A-2780 cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 263: 53-60.
 57. Gu S, Chen C, Jiang X, Zhang Z. Resveratrol Synergistically Triggers Apoptotic Cell Death with Arsenic Trioxide via Oxidative Stress in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Biol Trace Elem Res* 2015; 163:112–123.
 58. Li B, Hou D, Guo H, et al. Resveratrol sequentially induces replication and oxidative stresses to drive p53-CXCR2 mediated cellular senescence in cancer cells. *Sci Rep* 2017; 7: 208.
 59. Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB. Apoptosis in the germ line. *Reproduction* 2011; 141: 139–150.
 60. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wideranging Implications In Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26: 239.
 61. Chelyshev IA, Cherepnev GV, Saitkulov KI. Apoptosis in the nervous system. *Ontogenez* 2001; 32(2): 118-29.
 62. Bar PR. Apoptosis the cell's silent exit. *Life Sci* 1996; 59(5-6): 369-78.
 63. Samali A, Gorman AM, Cotter TG. Apoptosis the story so far. *Experientia* 1996; 52(10-11): 933-41.
 64. Mori S, Sawada T, Okada T, et al. New anti-proliferative agent, MK615, from Japanese apricot “*Prunus mume*” induces striking autophagy in colon cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2007; 13(48): 6512-6517.
 65. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* 2016; 8(4): 603-19.
 66. Pfeiffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2018; 19(2).

67. Kuzelova K, Grebenova D, Brodska B. Dose-dependent effects of the caspase inhibitor Q-VD-OPh on different apoptosis-related processes. *J Cell Biochem* 2011; 112(11): 3334-42.
68. Chen-Deutsch X, Kutner A, Harrison JS, Studzinski GP. The pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh has anti-leukemia effects and can interact with vitamin D analogs to increase HPK1 signaling in AML cells. *Leuk Res* 2012; 36(7): 884-8.
69. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, et al. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 2003; 8(4): 345-52.
70. Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 1996; 17(8): 1595-607.
71. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyol Derneği Araş* 2008; 36(2): 120-130.
72. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 227-228.
73. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516.
74. Knillova J, Kolar Z, Hlobilkova A. The significance of key regulators of apoptosis in the development and prognosis of prostate carcinoma. II. Products of suppressor genes Rb and PTEN, CDKI, Fas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2003;147(1):11-7.
75. Kuş Ç. Nöroblastomalarda PI3-K Sağkalım Sinyal İletimini Değiştirerek Oluşan Apoptozis Sensitizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana 2010: 79.
76. Li J, Hou N, Faried A, et al. Inhibition of Autophagy by 3-MA Enhances the Effect of 5-FU-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(3): 761-71.
77. Dong Y, Yin S, Jiang C, et al. Involvement of autophagy induction in penta-1, 2, 3, 4,6-O-galloyl- β -D-glucose-induced senescence-like growth arrest in human cancer cells. *Autophagy* 2014; 10(2): 296-310.

78. Sahin Y, Yıldız DA. Memeli Hücrelerinde Otofajinin Moleküler Mekanizması. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2017; 5(2): 205-218.
79. Gao P, Bauvy C, Souquere S, et al. The Bcl-2 homology domain 3 mimetic gossypol induces both BEKLİN 1-dependent and BEKLİN 1-independent cytoprotective autophagy in cancer cells. J Biol Chem 2010; 285(33): 25570-81.
80. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet 2009; 43: 67-93.
81. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. Am J Physiol Cell Physiol 2010; 298(4): C776-85.
82. Ryter SW, Choi AM. Autophagy in the lung. Proc Am Thorac Soc 2010; 7(1):13-21.
83. Moon EK, Kim SH, Hong Y, et al. Autophagy inhibitors as a potential antiamoebic treatment for Acanthamoeba keratitis. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(7): 4020-5.
84. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered Questions. Journal of Cell Science 2005; 118: 7-18.
85. Arslan DÖ, Korkmaz G, Gözüaçık D. Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2011; 2: 4.
86. Campbell GR, Bruckman RS, Herns SD, et al. Induction of autophagy by PI3K/mTOR and PI3K/mTOR/BRD4 inhibitors suppresses HIV-1 replication. J Biol Chem 2018; 293(16): 5808-5820.
87. Karadağ Aynur. Otofaji: Programlı Hücre Ölümü. Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi 2016;5: 2.
88. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Prolif 2012; 45(6): 487-98.
89. Campbell GR, Spector SA Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 through autophagy. Curr Opin Microbiol 2013; 16(3): 349-54.
90. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternativem Macroautophagy. Nature 2009; 461(7264):654-8.

91. Al Dhaheri Y, Attoub S, Ramadan G, et al. Carnoson Induces ROS mediated BEKLİN-1independent autophagy and apoptosis in triple negativebreast cancer. Plos One 2014; 9(10).
92. Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome–lysosome fusion. Journal of Cell Science 2017; 130(7): 1209-1216.
93. Şencan S. Otofajinin Kanserdeki Rolü, Doktora Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep 2015: 87.
94. Ulutaş S. Bazal Hücreli Karsinomlarda Otofaji Mekanizmasında Rol Alan Genler, Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Ana Bilim Dalı, Gaziantep 2015: 56.
95. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene 2004; 23(16): 2891-906.
96. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. Cell Death Differ 2009; 16(7): 966-75.
97. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. J Nutr 2003; 133(10): 3248S-3254S.
98. Hollman PC, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. Biomed Pharmacother 1997; 51(8): 305-10.
99. Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Ambriz-Perez DL, Heredia JB. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. Int J Mol Sci 2016; 9: 17(6).
100. Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP. Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. Am. J. Enol Vitic 2006; 57: 3.
101. Marzocchella L , Fantini M, Benvenuto M, et al. Dietary flavonoids: molecular mechanisms of action as anti- inflammatory agents. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov 2011; 5(3): 200-20.
102. Kim HJ, Park C, Han MH, et al. Baicalein Induces Caspase-dependent Apoptosis Associated with the Generation of ROS and the Activation of AMPK in Human Lung Carcinoma A549 Cells. Drug Dev Res 2016; 77(2): 73-86.

103. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem* 2011; 126(4): 1821-35.
104. Cherrak SA, Mokhtari-Soulmane N, Berroukeche, et al. In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. *PLoS One* 2016; 11(10): e0165575.
105. Sequeira IR, Poppitt SD. Unfolding Novel Mechanisms of Polyphenol Flavonoids for Better Glycaemic Control: Targeting Pancreatic Islet Amyloid Polypeptide (IAPP). *Nutrients* 2017; 9 (7): pii: E788.
106. Bigelow RL, Cardelli JA. The green tea catechins, (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG), inhibit HGF/Met signaling in immortalized and tumorigenic breast epithelial cells. *Oncogene* 2006; 25(13): 1922-30.
107. Sun G, Zhang S, Xie Y, Zhang Z, Zhao W. Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett* 2016; 11(1): 150-158100.
108. Hung H. Dietary quercetin inhibits proliferation of lung carcinoma cells. *Forum Nutr* 2007; 60: 146-57.
109. Batra P, Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech* 2013; 3(6): 439-459.
110. Kim HJ, Park C, Han MH et al. Baicalein Induces Caspase-dependent Apoptosis Associated with the Generation of ROS and the Activation of AMPK in Human Lung Carcinoma A549 Cells. *Drug Dev Res* 2016; 77(2): 73-86.
111. Kandaswami C, Lee LT, Lee PP et al. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo* 2005; 19(5): 895-909.
112. Aissani N, Coroneo V, Fattouch S, Caboni P. Inhibitory effect of carob (*Ceratonia siliqua*) leaves methanolic extract on *Listeria monocytogenes*. *J Agric Food Chem* 2012; 60(40): 9954-8.
113. Web_1. (2011). 1001 Fidan İnsana Ve Tabiata Hizmet. <https://www.1001fidan.com/ceratonia-siliqua-keci-boynuzu-fidani-1054> (05.06.2018).

114. Aboura I , Nani A, Belarbi M, et al. Protective effects of polyphenol-rich infusions from carob (*Ceratonia siliqua*) leaves and cladodes of *Opuntia ficus-indica* against inflammation associated with diet-induced obesity and DSS-induced colitis in Swiss mice. *Biomed Pharmacother* 2017; 96: 1022-1035.
115. Sassi A, Bouhlef I, Mustapha N, et al. Assessment in vitro of the genotoxicity, antigenotoxicity and antioxidant of *Ceratonia siliqua* L. extracts in murine leukaemia cells L1210 by comet assay. *Regul Toxicol Pharmacol* 2016; 77: 117-24.
116. Custodio L, Escapa AL, Fernandes E, et al. Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic activities of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) germ flour extracts. *Plant Foods Hum Nutr* 2011; 66(1): 78-84.
117. Bigelow RL, Cardelli JA. The green tea catechins, (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG), inhibit HGF/Met signaling in immortalized and tumorigenic breast epithelial cells. *Oncogene* 2006; 25(13): 1922-30.
118. Ohno Y, Fukuda K, Takemura G, et al. Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells. *Anticancer Drugs* 1999; 10(9): 845-51.
119. Faried A, Kurnia D, Faried LS, et al. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int J Oncol* 2007; 30(3): 605-13.
120. Choubey S, Varughese LR, Kumar V, Beniwal V. Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharm Pat Anal* 2015; 4(4): 305-15.
121. Chiu CT, Hsuan SW, Lin HH, et al. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract induces human melanoma cell death, apoptosis, and autophagy. *J Food Sci* 2015; 80(3): H649-58.
122. Li M, Li J, Gu QH et al. EGCG induces lung cancer A549 cell apoptosis by regulating Ku70 acetylation. *Oncol Rep* 2016; 35(4): 2339-47.
123. Zhang Y, Yang ND, Zhou F, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces non-apoptotic cell death in human cancer cells via ROS-mediated lysosomal membrane permeabilization. *PLoS One* 2012; 7(10): e46749.

124. Zhang YJ, Lu XW , Song N, et al. Chlorogenic acid alters the voltage-gated potassium channel currents of trigeminal ganglion neurons. *Int J Oral Sci* 2014; 6(4): 233-40.
125. Rtibi K, Selmi S, Grami D, et al. Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 522-528.
126. Ghanemi FZ, Belarbi M, Fluckiger A, et al. Carob leaf polyphenols trigger intrinsic apoptotic pathway and induce cell cycle arrest in colon cancer cells. *Journal of Functional Foods* 2017; 33: 112–121.
127. Bergeron C, Gafner S, Clausen E, et al. Comparison of the Chemical Composition of Extracts from *Scutellaria lateriflora* Using Accelerated Solvent Extraction and Supercritical Fluid Extraction versus Standard Hot Water or 70% Ethanol Extraction. *J Agric Food Chem* 2005; 53(8): 3076-80.
128. Olszewska MA. Variation in the phenolic content and in vitro antioxidant activity of sorbus aucuparia leaf extracts during vegetation. *Acta Pol Pharm* 2011; 68(6): 937-44.
129. Kwape TE, Chaturvedi P, Kamau JM, George S. Hepato-protective potential of methanol extract of leaf of *Ziziphus mucronata* (ZMLM) against dimethoate toxicity: biochemical and histological approach. *Ghana Med J* 2013; 47(3): 112-20.
130. Vaya J, Mahmood S. Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Biofactors* 2006; 28(3-4): 169-75.
131. Penarrieta JM, Alvarado JA, Akesson B, Bergenstahl B, et al. Total antioxidant capacity and content of flavonoids and other phenolic compounds in canihua (*Chenopodium pallidicaule*): an Andean pseudocereal. *Send to Mol Nutr Food Res* 2008; 52(6): 708-17.
132. WEB_2. (2016). ATCC Resmi sitesi. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-185?geo_country=tr (06.06.2018).
133. Stockert JC, Castro BA, Canete M, et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* 2012; 114(8): 785-796.

134. Tonder AV, Joubert AM, Cromarty AD, et al. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes* 2015; 8: 47.
135. Shu C, Li R, Yin Y, et al. Synergistic dual-targeting hydrogel improves targeting and anticancer effect of Taxol in vitro and in vivo. *Chem Commun (Camb)* 2014; 50(97): 15423-6.
136. Yu YF, Hu PC, Wang Y, et al. Paclitaxel induces autophagy in gastric cancer BGC823 cells. *Ultrastruct Pathol* 2017; 41(4): 284-290.
137. Signorelli P, Munoz Olaya JM, Gagliostro V, et al. Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells. *Cancer Lett* 2009; 282(2): 238-43.
138. Wang HC, Wu CC, Cheng TS, et al. Active Constituents from *Liriope platyphylla* Root against Cancer Growth In Vitro. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 857929.
139. Zhang J, Ma K, Qi T, et al. P62 Regulates resveratrol-mediated Fas/Cav-1 complex formation and transition from autophagy to apoptosis. *Oncotarget* 2015; 6(2): 789-801.
140. Ando M, Hoyos V, Yagyu S, et al. Bortezomib sensitizes non-small cell lung cancer to mesenchymal stromal cell-delivered inducible caspase-9-mediated cytotoxicity. *Cancer Gene Ther* 2014; 21(11): 472-482.
141. Goldberg L, Israeli R, Kloog Y. FTS and 2-DG induce pancreatic cancer cell death and tumor shrinkage in mice. *Cell Death Dis* 2012; 3: 284.
142. Yue H, Li W, Liu P, et al. Inhibition of autophagy promoted sphingosylphosphorylcholine induced cell death in non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 453(3): 502-7.
143. Lim EJ, El Khobar K, Chin R, et al. Hepatitis C virus-induced hepatocyte cell death and protection by inhibition of apoptosis. *J Gen Virol* 2014; 95: 2204-15.
144. Coşkun D. HCT 116 ve HT 29 Kolon Karsinoma Hücrelerinde Epibrassinolid Tarafından Tetiklenen Apoptotik Süreçte Poliaminlerin Rolü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Kültür Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2014: 78.

145. Satoh M, Takemura Y, Hamada H, Sekido Y, Kubota S. EGCG induces human mesothelioma cell death by inducing reactive oxygen species and autophagy. *Cancer Cell Int* 2013; 13(1): 19.
146. Yamagata K, Izawa Y, Onodera D, Tagami M. Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 2018; 441(1-2): 9-19.
147. Zhou X, Xu L, He K. The role of bcl-2 gene family in taxol-mediated apoptosis in BJAB B cell lymphoma cell line. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2000; 22(6): 453-5.
148. Yu Z. Resveratrol induces apoptosis of leukemia cell line K562 by modulation of sphingosine kinase-1 pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(3): 2755-62.
149. Ji BC, Hsu WH, Yang JS, et al. Gallic Acid Induces Apoptosis via Caspase-3 and Mitochondrion-Dependent Pathways in Vitro and Suppresses Lung Xenograft Tumor Growth in Vivo. *J Agric Food Chem* 2009; 57(16): 7596-604 bax ve kaspaz 3 aktivitesi.
150. Li M, Li JJ, Gu QH et al. EGCG induces lung cancer A549 cell apoptosis by regulating Ku70 acetylation. *Oncol Rep* 2016; 35(4): 2339-47.
151. Dalby KN, Tekedereli I, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy* 2010; 6(3): 322-9.
152. Lee MY, Liao MH, Tsai YN, Chiu KH, Wen HC. Identification and anti-human glioblastoma activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* methanolic extract. *J Agric Food Chem* 2011; 59(6): 2347-55.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Rukiye Nur ÜNSAL

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 20 Temmuz 1987, Pınarbaşı/ Kayseri

Medeni Durumu: Bekar

Email: rnurunsal@gmail.com

Yazışma Adresi: Yakut mah. Mustafa Kemal Paşa Bulv. Tuğba apt. 208/ 25 Kocasinan/
Kayseri

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Kayseri Sümer Lisesi	2004

YABANCI DİL

İngilizce