

**NQO₂'Yİ HEDEF ALAN MOLEKÜLLERİN
KARSİNOMA HÜCRELERİNDE PROFLAKTİK/TERAPÖTİK
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Proje No: 110S085

Doç. Dr. Mükerrerem Betül AYCAN

Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Doç. Dr. Nefise Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI

Arş. Gör. Eren DEMİRPOLAT

Arş. Gör. Canan ASLAN

NİSAN 2013

KAYSERİ

ÖNSÖZ

Kinon oksidoredüktazlar bütün dokularda bulunan temel metabolik enzimlerdendir. Önerilen projenin üst şemsiye kuruluşu olan A.B.D. Colorado Denver Üniversitesi'nde bulunan araştırma ekibi, NQO₁/NQO₂ molekülünün kanserle ilişkisi üzerine oldukça çok sayıda çalışmaya sahiptir. Proje ekibinin kronik myeloid lösemi hücreleri üzerinde NQO₂ inhibitörlerinin antikanserojen etkinlikleri ile ilgili NIH (National Institute of Health, USA) projesinin Türkiye kolu olarak gerçekleştirilen bu çalışmada özellikle NQO₂ enziminin antikanserojen etkinlik ile ilişkisi lösemi ile ilgili olan Jurkat hücrelerinde ve diğer farklı kanser hücrelerinde aydınlatılmaya çalışıldı. Bazı flavonoidler ve melatonin NQO₂ enzimi üzerinde inhibe edici özelliğe sahiptir. Bu enzim inhibitörlerinin potansiyel birer antikanserojen madde olduğu daha önce başka moleküller üzerinde gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmada bu enzimi inhibe ettiği bilinen Kemferol, Apigenin, Luteolin, Kersetin gibi flavonoidlerin ve melatoninin antikanserojen etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Çalışmada farklı karsinoma hücreleri üzerinde bu moleküllerin antikanserojen etkinlikleri incelenmiştir.

“NQO₂'yi Hedef Alan Moleküllerin Karsinoma Hücrelerinde Proflaktik/Terapötik Etkinliklerinin İncelenmesi” isimli proje 1011 kodlu Uluslararası Bilimsel Araştırma Projelerine (UBAP) Katılma Programı kapsamında olup, proje TÜBİTAK tarafından 110S085 proje No'su ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	iv
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. NAD(P)H: KİNON OKSİDOREDÜKTAZ 2 (NQO ₂)	2
2.2. FLAVONOİTLER.....	5
2.2.1. Luteolin.....	6
2.2.2. Kemferol.....	7
2.2.3. Apigenin	8
2.2.4. Kersetin.....	9
2.3. MELATONİN	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. GEREÇLER	13
3.2. YÖNTEM.....	13
3.2.1. Hücre Serileri.....	13
3.2.2. Hücre Kültürü	13
3.2.3. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difenil Tetrazolyum Bromid)	
Hücre Canlılık Testi	13

3.2.4. Toplam Reaktif Oksijen Miktarı	14
3.2.5. Hücre Çoğalması	14
3.2.6. Apo-1/Fas/CD95 Yolağı Deneyi	14
3.2.7. NQO ₂ Ekspresyonu	14
3.2.8. Akım Sitometrisi (Flow Cytometri)	14
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	15
4. BULGULAR	16
4.1. K562 VE KD K562 HÜCRELERİ İLE YAPILAN DENEYLER	16
4.1.1. Enzim Kinetiği Analizi.....	16
4.1.2. Hücre Bulguları.....	19
4.1.3. MTT Hücre Canlılığı Testi Bulguları.....	20
4.1.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Oluşumunun İncelenmesi.....	26
4.1.5. Apoptotik Etkinin İncelenmesi.....	31
4.2. JURKAT, MCF7 VE HEPG2 HÜZRELERİ İLE YAPILAN DENEYLER.....	40
4.2.1. Toplam ROS Deneyleri.....	40
4.2.2. APO-1/FAS/CD95 Yolağı Deneyleri.....	50
4.2.3. Hücre Çoğalmasına ait Deneyler.....	52
4.2.4. NQO ₂ Ekspresyonuna ait Deneyler.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
6. KAYNAKLAR.....	62
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	70

TABLO, ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 4.1. Luteolinin Michaelis-Menten grafiği değerleri.....	16
Tablo 4.2. Kemferolün Michaelis-Menten grafiği değerleri	17
Tablo 4.3. Kersetinin Michaelis-Menten grafiği değerleri.....	17
Tablo 4.4. Apigeninin Michaelis-Menten grafiği değerleri	18
Tablo 4.5. Melatoninin Michaelis-Menten grafiği değerleri.....	18
Şekil 2.1. Melatoninin muhtemel antioksidan etki mekanizması.....	4
Şekil 2.2. Flavon, Flavonol, Flavanon, Flavanonol yapıları	5
Şekil 2.3. Melatoninin kimyasal yapısı	10
Şekil 4.1. Hücrelerin sahip oldukları NQO ₂ miktarlarını gösteren Western Blot görüntüsü.....	19
Şekil 4.2. KD K562 hücre klonlarının içerdikleri NQO ₂ miktarlarının Western Blot görüntüsü.....	20
Şekil 4.3. K562 ve KD K562 hücreleri NQO ₂ proteini Western Blot görüntüsü	20
Şekil 4.4. Luteolin konsantrasyonlarının (5, 10, 25, 50, 100 µM) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları.....	32
Şekil 4.5. Kamferol konsantrasyonlarının (5, 10, 25, 50, 100 µM) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları.....	34
Şekil 4.6. Kersetin konsantrasyonlarının (5, 10, 25, 50, 100 µM) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları.....	35

Şekil 4.7. Apigenin konsantrasyonlarının (5, 10, 25, 50, 100 μ M) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları.....	37
Şekil 4.8. Melatonin konsantrasyonlarının (10, 100, 250, 1000, 2500 μ M) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları.	39
Şekil 4.9. Jurkat hücre serisinde NQO ₂ ekspresyonuna ait Western Blot jel görüntüleri	55
Şekil 4.10. MCF7 hücre serisinde NQO ₂ ekspresyonuna ait Western Blot jel görüntüleri	56
Şekil 4.11. HepG2 hücre serisinde NQO ₂ ekspresyonuna ait Western Blot jel görüntüleri	57
Şekil 4.12. Kemferolün NQO ₂ ekspresyonuna ait Western Blot jel görüntüleri.....	58
Grafik 4.1. Luteolinin Michaelis-Menten grafiği	16
Grafik 4.2. Kemferolün Michaelis-Menten grafiği	17
Grafik 4.3. Kersetinin Michaelis-Menten grafiği.....	17
Grafik 4.4. Apigeninin Michaelis-Menten grafiği	18
Grafik 4.5. Melatoninin Michaelis-Menten grafiği.....	18
Grafik 4.6. Artan luteolin konsantrasyonlarında hücre canlılığının K562 ve KD K562 hücre grupları arasında karşılaştırılması.	22
Grafik 4.7. Artan kemferol konsantrasyonlarında % hücre canlılık oranlarının K562 ve KD K562 hücre grupları arasında karşılaştırılması.	23
Grafik 4.8. Artan kersetin konsantrasyonlarında hücre canlılığının K562 ve KD K562 hücre grupları arasında karşılaştırılması.	24

Grafik 4.9. Artan apigenin konsantrasyonlarında % hücre canlılık oranlarının K562 ve KD K562 hücre grupları arasında karşılaştırılması	25
Grafik 4.10. Artan Melatonin konsantrasyonlarında % hücre canlılık oranlarının K562 ve KD K562 hücre grupları arasında karşılaştırılması.	26
Grafik 4.11. K562 ve KD K562 hücrelerinin farklı Luteolin konsantrasyonlarında ROS oluşumlarının karşılaştırılması.	27
Grafik 4.12. K562 ve KD K562 hücrelerinin farklı kemferol konsantrasyonlarında ROS oluşumlarının her bir doz için karşılaştırılması..	28
Grafik 4.13. K562 ve KD K562 hücrelerinin farklı kersetin konsantrasyonlarında ROS oluşumlarının karşılaştırılması.	29
Grafik 4.14. K562 ve KD K562 hücrelerinin farklı apigenin konsantrasyonlarında ROS oluşumlarının her bir doz için karşılaştırılması.	30
Grafik 4.15. K562 ve KD K562 hücrelerinin farklı melatonin konsantrasyonlarında ROS oluşumlarının her bir doz için karşılaştırılması.	31
Grafik 4.16. Luteolin konsantrasyonlarının (10, 25, 50, 100 μ M) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometre sonuç grafiği.	33
Grafik 4.17. Kemferol konsantrasyonlarının (10, 25, 50, 100 μ M) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometre sonuç grafiği.	34
Grafik 4.18. Kersetin konsantrasyonlarının (10, 25, 50, 100 μ M) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometre sonuç grafiği	36
Grafik 4.19. Apigenin konsantrasyonlarının (5, 10, 25, 50, 100 μ M) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometre sonuç grafiği	38

Grafik 4.20. Melatonin konsantrasyonlarının (10, 100, 250, 1000, 2500 μ M) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometre sonuç grafiği.....	39
Grafik 4.21. Jurkat hücre serisinde apigeninin toplam ROS değerleri.....	40
Grafik 4.22. Jurkat hücre serisinde kemferolün toplam ROS değerleri	41
Grafik 4.23. Jurkat hücre serisinde kersetinin toplam ROS değerleri.....	41
Grafik 4.24. Jurkat hücre serisinde luteolinin toplam ROS değerleri	42
Grafik 4.25. Jurkat hücre serisinde melatoninin toplam ROS değerleri	43
Grafik 4.26. MCF7 hücre serisinde apigeninin toplam ROS değerleri	44
Grafik 4.27. MCF7 hücre serisinde kemferolün toplam ROS değerleri	44
Grafik 4.28. MCF7 hücre serisinde kersetinin toplam ROS değerleri	45
Grafik 4.29. MCF7 hücre serisinde luteolinin toplam ROS değerleri	46
Grafik 4.30. MCF7 hücre serisinde melatoninin toplam ROS değerleri.....	46
Grafik 4.31. HepG2 hücre serisinde apigeninin toplam ROS değerleri.....	47
Grafik 4.32. HepG2 hücre serisinde kemferolün toplam ROS değerleri	48
Grafik 4.33. HepG2 hücre serisinde kersetinin toplam ROS değerleri.....	48
Grafik 4.34. HepG2 hücre serisinde luteolinin toplam ROS değerleri	49
Grafik 4.35. HepG2 hücre serisinde melatoninin toplam ROS değerleri.....	49
Grafik 4.36. Jurkat hücre serisinde insan APO-1/Fas/CD95 yolağının inhibisyonuna ait değerleri.....	50
Grafik 4.37. MCF7 hücre serisinde insan APO-1/Fas/CD95 yolağının inhibisyonuna ait değerleri.....	51

Grafik 4.38. HepG2 hücre serisinde insan APO-1/Fas/CD95 yolağının inhibisyonuna ait değerleri.....	52
Grafik 4.39. Jurkat hücre serisinde hücre çoğalmasına ait değerleri.....	53
Grafik 4.40. MCF7 hücre serisinde hücre çoğalmasına ait değerleri.....	53
Grafik 4.41. HepG2 hücre serisinde hücre çoğalmasına ait değerleri.....	54
Grafik 4.42. Jurkat hücre serisinde NQO ₂ ekspresyonuna ait değerler.....	55
Grafik 4.43. MCF7 hücre serisinde NQO ₂ ekspresyonuna ait değerler	56
Grafik 4.44. HepG2 hücre serisinde NQO ₂ ekspresyonuna ait değerler	57

NQO2'Yİ HEDEF ALAN MOLEKÜLLERİN KARSİNOMA HÜCRELERİNDE PROFLAKTİK/TERAPÖTİK ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Kinonlar (Quinon), organik materyallerin yanması sonucunda açığa çıkan bir polisiklik aromatik hidrokarbon grubudur. Benzopiren kinon ve benzokinonları da içeren kinonlar oldukça reaktif moleküllerdir. Kinonlar, kinon oksidoredüktazlar (NQOs veya QRs) adı verilen bir flavoprotein ailesi tarafından 2 elektron indirgenerek detoksifiye edilirler. Bu çalışmada, NQO₂ enzim inhibitörlerinin (apigenin, kemferol, kersetin, luteolin ve melatonin) farklı kanser türlerine ait çeşitli karsinoma hücre serileri üzerindeki antikanserojen etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Kronik myeloid lösemi hücre serilerinden olan K562 hücrelerinde NQO₂'nin rolünü aydınlatabilmek amacıyla, NQO₂ KD (knock down) K562 hücreleri elde edilmiş ve çeşitli NQO₂ enzim inhibitörlerinin her iki hücre serisindeki hücre canlılığı, toplam reaktif oksijen türleri (ROS) ve apoptoz üzerine olan etkileri incelenmiştir. Akut T Lösemi Hücresi Klon E6-1'e ait Jurkat, insan meme adenokarsinomuna ait MCF7 ve insan hepatosellüler karsinomuna ait HepG2 hücre serilerinde aynı NQO₂ enzim inhibitörlerinin hücre canlılığı, toplam ROS, hücre çoğalması, apoptoz ve NQO₂ ekspresyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Sonuç olarak; kemferol, apigenin ve melatoninin K562 ve NQO₂ KD K562 hücre serileri üzerinde prooksidan etki göstererek sitotoksikite oluşturduğu, luteolin ve kersetinin KD K562 hücrelerinde apoptozu K562 hücrelerine göre daha fazla oranda arttırdığı, bu nedenle bu iki maddenin sitotoksik özelliğini başka bir yolak üzerinden gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır. Jurkat hücrelerinde apigeninin, MCF7 hücrelerinde kemferolün, HepG2 hücrelerinde ise apigeninin yüksek dozunun ve kersetinin sitotoksik etkisini NQO₂/ROS yolağını kullanarak gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: NQO₂, melatonin, flavonoit, karsinoma

INVESTIGATION OF PROFLACTIC/THERAPEUTICAL EFFICIENCIES OF MOLECULES TARGETING NQO2 ON CARCINOMA CELLS

ABSTRACT

Quinones of polycyclic aromatic hydrocarbons are abundant in all burnt organic materials. Quinones, including benzopyrene quinines and benzoquinons are highly reactive molecules which are detoxified by two-electrone reduction via NQOs or QRs. In this study, the mechanisms of anticancerogen effectiveness of several NQO₂ enzyme inhibitors (apigenin, kaempferol, quercetin, luteolin and melatonin) on different carcinoma cell lines were identified.

Chronic myeloid cell lines (K562 and NQO₂ KD K562) were used to clarify the effect of NQO₂ inhibition over cell viability, total ROS and apoptosis. Furthermore the anticancerogen effects of same inhibitors were tested on Acute T leukemia cell (clone E6-1-Jurkat), human breast cancer cell line (MCF7) and human hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2) via cell viability, total ROS, cell proliferation, apoptosis and NQO₂ expression.

As a result, kaempferol, apigenin and melatonin were prooxidant and cytotoxic on K562 and NQO₂ KD K562 cells, luteolin and quercetin triggered the apoptosis in KD K562 cells rather than the K562 cells, therefore it is revealed that these molecules might use another pathway rather than NQO₂ inhibition in these cell lines. In jurkat cell lines apigenin, in MCF7 cell lines keampferol, and in HepG2 cell lines high doses of apigenin and quercetin showed its cytotoxic effects using NQO₂/ROS pathway.

Key Words: NQO₂, melatonin, flavanoid, carcinoma

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kinonlar (Quinon), organik materyallerin yanması sonucunda açığa çıkan araba egzozlarında, sigara dumanında, hava kirliliği olan yerlerde doğal olarak oluşan geniş bir polisiklik aromatik hidrokarbon grubudur. Benzopiren kinonlar ve benzokinonların da içinde bulunduğu kinonlar, reaktif moleküllerdir ve hızla bir veya iki elektron kaybederler. Kinonların detoksifikasyonu kinon oksidoredüktazlar (NQOs veya QRs) tarafından gerçekleştirilir.

Melatonin ise pineal bezde serotonininden sentezlenen ve G proteinleri aracılı reseptörleri üzerinden etki gösteren bir hormondur. Melatoninin şimdiye kadar fonksiyonları ve lokalizasyonu iyi tanımlanmış 2 reseptörü olan MT1 ve MT2 üzerinde literatürde oldukça geniş bilgi bulunmaktadır. Ancak Melatoninin son keşfedilen reseptörü üzerindeki çalışmalar bunun bir G-aracılı proteinden çok bir enzim olduğunu göstermiştir. Bu reseptörler diğer melatonin reseptörlerinden farklı olarak nanomolar düzeyde melatonine afinite göstermesi, aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişmesi ve ligant bağlama/ayırışma hızının çok hızlı olması yönleri ile diğer reseptörlerden ayrılır. MT3 reseptörü için sinyal transdüksiyon mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak NQO₂ üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar melatoninin bu enzim üzerinde bağlanma bölgesine sahip olduğunu hatta bu enzimin doğrudan MT3'ün kendisi olabileceğini göstermiştir. NQO₂, FAD bağımlı bir molekül olup, eş-substrat olarak N-ribosil ve N-alkildihidronikotinamit kullanmaktadır. Melatoninin QR₂ üzerinde bağlanma yerlerinin bulunması melatoninin de bu enzim için eş-substrat olabileceğini düşündürmüştür.

Melatoninin reseptörlerinden MT3 olarak kabul edilen NQO₂ (QR₂)'nin aktif enzimi inaktif hale dönüştürmesi aynı zamanda antikanserojen etkinlik gösteren flavonoidlerin de etki mekanizmalarına ışık tutucu özelliktedir. Yapılan son çalışmalarda melatoninin bu moleküllerle sinerjik etkiye girerek antikanserojen etkinliği artırabileceği özelliği bazı flavonoidler üzerinde çalışılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada ilk kez NQO₂ inhibitörlerinin en aktiflerinden olan Apigenin, Kemferol, Kersetin, Luteolin gibi flavonoidlerin ve melatoninin kronik myeloid lösemi hücreleri başta olmak üzere çeşitli karsinoma hücreleri (hepatokarsinoma ve meme kanseri) üzerindeki antikanserojen etki mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NAD(P)H: Kinon Oksidoredüktaz 2 (NQO₂)

NQO₂, kinon oksidoredüktaz ailesinin ikinci üyesidir. NQO₂ cDNA'sı, 976 nükleotit uzunluğunda olup, 231 aminoasitlik (Ma= 25,956) bir protein kodlar. Ayrıca insan NQO₂ proteininin karboksil ucu insan, fare ve rat NQO₁ proteininden 43 amino asit daha kısadır. İnsan NQO₁ cDNA'sı ve proteini, insan karaciğer sitozolik NQO₁ cDNA ve proteinine sırasıyla %54 ve %49 benzerlik gösterir (JAISWAL, 1990). NQO₂'de NQO₁ gibi dimer enzim yapısına sahiptir ve her bir alt ünitesinde prostetik grup olarak FAD taşır. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar NQO₂'nin NQO₁'den kofaktör gereksinimi bakımından farklı olduğunu, elektron vericisi olarak NAD(P)H kullanmak yerine NRH (Dihidronikotinamide ribozid) kullandığını göstermiştir (YANG, 2012; WU, 1997). Ayrıca NQO₂ kristal yapı analizleri NQO₁'de olmayan spesifik metal bağlama bölgelerine sahip olduğunu göstermiştir (FOSTER, 1999). Ayrıca NQO₂ katalitik bölgesinde NQO₁'den farklı olarak sadece His/Asn¹⁶¹ mutasyonu içerir. (VELLA, 2005).

NQO₂ kinonlardan ve oksidasyon redüksiyon boyalarından iki elektron indirgenme reaksiyonlarını katalizler. Ayrıca metil kırmızısını elektron alıcısı olarak kullanarak dört elektron indirgeyebilir bu reaksiyonda NQO₁'den 11 kat, sitotoksik bileşik CB1954 (5-aziridin-1yl)-2,4-dinitrobenzamid)'ün indirgenmesinde 3000 kat daha aktiftir (WU, 1997).

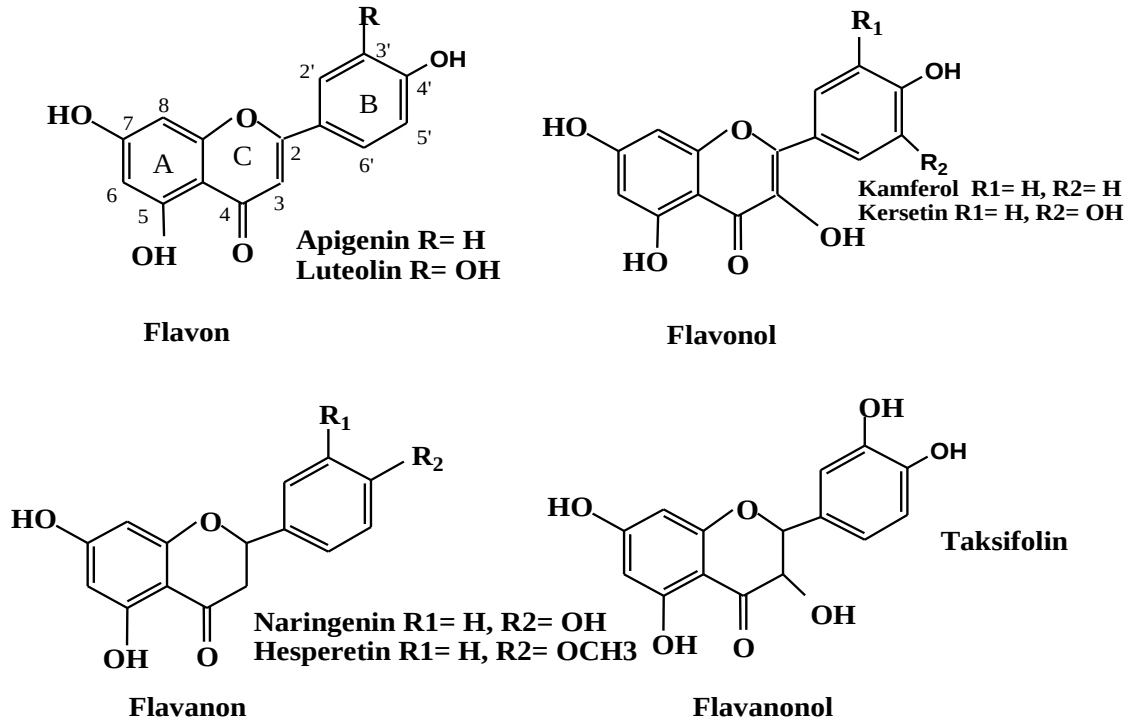
NQO₂'nin NQO₁ ile yapısal benzerliklerinden dolayı kinon toksisitesine karşı koruyucu olduğu kabul edilmiş ve yapılan çalışmalar bu görüşü desteklemiştir. NQO₂-/- farelerde benzo(a)pirenin kanserojen aktivitesi, NQO₁ -/- farelerde benzer şekilde artmıştır. Yine NQO₂ -/- farelerde normal farelere göre DMBA ve benzo(a)pirenin indüklediği deri kanserine karşı duyarlılığın arttığı gözlenmiştir. Yani NQO₂ kimyasal karsinojenlere karşı koruyucu etki göstermiştir (ISKANDER, 2004). Fakat bir başka çalışmada NQO₂ -/- farelerde, NQO₁ -/- farelerin aksine menadionun indüklediği karaciğer toksisitesi azalmıştır. Bu sonuçlar NQO₂'nin menadionun metabolik aktivitesini katalizlediği ve toksisiteye sebep olduğunu göstermiştir (LONG, 2002). Bu verilere göre NQO₂ toksisiteyi indükleyen bir enzim ise aktivitesinin inhibe edilmesi söz konusu olmuştur. NQO₂ dikumoral, sibakron mavisi ve fenindon gibi NQO₁'in tipik inhibitörlerine karşı dayanıklıdır (YANG, 2012; WU, 1997). Flavonların NQO₂'nin kuvvetli kompetatif inhibitörü olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda hem krisin hem de 7,8-dihidroksiflavonun NQO₁'i eşit kuvvette (Ki değeri

yaklaşık 30nM) inhibe ettiği bulunmuştur. NQO₂ için ise krisin makul, 7-8dihidroksiflavonun ise oldukça zayıf inhibitör oldukları gözlenmiştir. Flavonların C3 pozisyonundaki OH grubu (örn; Galangin) NQO₁ inhibisyonunu (K_i=720nM) azaltırken, galangin NQO₂'yi krisinden daha kuvvetli inhibe edebilir. C3 ve C4 pozisyonunda OH grubu olması NQO₂ inhibisyonunu önemli ölçüde artıran bir özelliktir. Şimdiye kadar denenmiş en güçlü flavon inhibitör (K_i=21nM) kersetindir. NQO₂ ve NQO₁ inhibisyon profilinde flavonların farklılık göstermesinin muhtemel sebebi aktif bölgelerindeki yapısal farklılıklardır (WU, 1997). NQO₂ diğer bilinen inhibitörleri benzo(a)piren (YANG, 2012) ve kanser önleyici, kardiyoprotektif ve yaşlanma karşıtı özelliklere sahip olduğu bilinen resveratrol'dür. Resveratrolün *in vitro* ortamda NQO₂'nin aktif bölgesine spesifik olarak bağlanarak NQO₂'yi inhibe edici etki göstermesi bu bileşiğin antikanserojen etkinliğinin NQO₂ inhibisyonundan kaynaklandığı fikrini oluşturmuştur (BURYANOVSKYY, 2004).

NQO₂ inhibisyonunun kanser metabolizmasında bir rolü olabileceği görüşü NQO₂'nin antikanserojen etkisi bilinen melatoninin 3. reseptörü olduğunun gösterilmesi ile kuvvetlenmiştir (MAILLIET, 2004). Melatoninin son keşfedilen reseptörünün diğer melatonin reseptörlerinden farklı olarak nanomolar düzeyde melatonine afinite göstermesi, aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişmesi ve ligant bağlama/ayırma hızının çok hızlı olması yönlerinden G-aracılı protein olan MT1 ve MT2 reseptörlerinden farklı davranan bir enzim olduğunu göstermiştir (NOSJEAN, 2000). NQO₂ üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar melatoninin bu enzim üzerinde bağlanma bölgesine sahip olduğunu hatta bu enzimin direk MT3'ün kendisi olabileceğini göstermiştir (MAILLIET, 2004). NQO₂ -/- fareler üzerinde NQO₂ ve MT3 arasındaki ilişki araştırıldığında bu farelerde MT3 bağlanma bölgesinin artık mevcut olmadığı, MT3 spesifik radyoligantı 2-[¹²⁵I]-iyodo, 5-metoksikarbonilamino-N-asetiltriptamin (2-[¹²⁵I]-MCANAT) kullanılarak tespit edilmiştir. Bu veriler *in vivo* ortamda NQO₂'nin MT3 bağlanma bölgesinin parçası olduğunu ve üçüncü melatonin bağlanma bölgesinin varlığını kanıtlamıştır (MAILLIET, 2004). Benzer çalışmalar CHO (Chinese Hamster Ovary) hücrelerinde de yapılmış aynı sonuçlara ulaşılmıştır (MAILLIET, 2005). Buna ilaveten gerçekleştirilen çalışmalarda ise bu enzimin membranda değil sitozolde olduğunu ve karaciğer, böbrek ve beyin başta olmak üzere hemen hemen bütün dokularda mevcut olduğunu göstermiştir (MAILLIET, 2005; BOUTIN, 2008).

2.2. FLAVONOİTLER

Flavonoit sözcüğü sarı renkli olmalarından dolayı latince sarı anlamına gelen “flavus” sözcüğünden türetilmiştir (KAHRAMAN, 2002). Bitkilerden izole edilmiş, bitkinin bir takım gelişim aşamalarında ve savunmasında önemli rol oynayan yaprak, çiçek ve meyve gibi kısımlarında yaygın şekilde bulunan ve renginden sorumlu olan 4000 den fazla flavonoit mevcuttur. Bu bileşikler fenilbenzopiren (C₆-C₃-C₆) yapısına sahiptirler (DOĞAN, 2008). Doygunluk oranları ve merkez piran halkasının yapısına göre flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar, kateşinler ve antosiyaninler olmak üzere altı farklı gruba ayrılırlar (Di CARLO, 1999; TSAO, 2010).



Şekil 2.2. Flavon, Flavonol, Flavanon, Flavanonol yapıları (TSAO, 2010)

Flavonoitler, iki aromatik A ve B halkasının üç karbon köprüsü (C) ve bir heterosiklik oksijenle bağlandığı difenilpropan (C₆-C₃-C₆) iskelet yapısına sahiptir. A halkası 5 ve 7

pozisyonunda karakteristik bir hidroksilasyon gösterirken, B halkası genellikle 4', 3' ve 4' veya 4' ve 5' pozisyonlarında hidroksillenir (KAHRAMAN, 2002).

Flavonoit grupları arasındaki yapısal farklılıklar; fenolik hidroksil gruplarının sayısı ve dağılımındaki çeşitlilikler, bunların substitüsyonları ve C-halkasının kimyası ile açıklanmaktadır. Flavonoitlerin yapısında yaygın olarak bulunan hidroksil grupları reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla alkillenir veya glikozillenir. Bu nedenle, doğada flavonoitlerin metoksi ve glikozit türevlerine sık rastlanır (DOĞAN, 2008). Flavonoitlerin en önemli etkisi oksijen türevi serbest radikalleri süpürmeleridir. *In vitro* deneysel sistemler antioksidan etkilerinin yanı sıra antiallerjik, antiviral, antitümör, antienflamatuar, antimitojen ve antigenotoksik etkileri de içeren birçok biyolojik aktivitede rol oynadıklarını göstermektedir (NIJVELDT, 2001). Bu aktiviteler, esas olarak flavonoit yapısındaki hidroksil grubunun sayısına ve pozisyonuna bağlıdır. Flavonoitler antioksidan aktivitelerini; ksantin oksidaz, lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile şelat oluşturarak, süperoksit anyonları, lipid peroksit radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak ve diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek göstermektedirler (DOĞAN, 2008).

2.2.1. Luteolin

Luteolin, 3',4',5,7-tetrahidroksiflavon olarak adlandırılan doğal bir bileşik olup, aynı zamanda bitkiler aleminde bol miktarda bulunan bir flavondur (SEELINGER, 2008a). Birçok bitki (maydonoz, brokoli, soğan yaprakları, havuç, yeşilbiber, elma kabuğu, yerkıstığı kabuğu) luteolince oldukça zengindir (SEELINGER, 2008b).

Luteolin lipidler, DNA ve proteinler üzerine ROS indükleyici hasarı inhibe eder. Luteolinin antioksidan etkisinde bazı mekanizmalar rol alabilir. Bunlardan ilki luteolinin kendi oksidasyonu yoluyla ROS süpürücü olarak görev yapabilmesidir. Luteolin'in ikinci halka yapısında ki orto-dihidroksi grubu ve üçüncü halkasındaki 2,3-çift bağı iyi bir antioksidan özellik sağlar. Aromatik hidroksil grubunda bulunan hidrojen atomu serbest radikallere verilebilir (SEELINGER, 2008a). İkinci mekanizmada luteolin ROS oluşturan oksidazları inhibe ederek, (ksantin oksidaz) süperoksit $O_2^{\bullet-}$ oluşumunu baskılar. Hücresel bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen enzimleri direk olarak inhibe edebilir. Örneğin, luteolin karaciğer lipidlerinde lipooksijenaz, siklooksijenaz ve askorbik asitin stimüle ettiği malondialdehit oluşumunu baskılar (BROWN, 1998).

Yapılan çalışmalarda luteolinin kanserli hücrelerde hücre döngüsünü kontrol noktalarında durdurarak, kontrolsüz hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (MATSUKAWA, 1993; KOBAYASHI, 2002; CASAGRANDE, 2001). Bununla birlikte luteolinin birçok kanser türünde (epidermal tümör, lösemi, pankreas tümörü ve hepatoma) apoptotik hücre yolaklarını aktive ederek apoptotik hücre ölümünü indüklediği (HELTON, 2007; CHOWDHURY, 2002; HUANG, 1999; CHENG, 2005; LEE, 2005; HORINAKA, 2005; SELVENDIRAN, 2006) görülmüş, böylece luteolinin onkostatik etkisi ispatlanmıştır. Ayrıca luteolin anjiyogenezi başlatmak için gerekli proteinleri inhibe eden kuvvetli bir anjiyogenez inhibitörüdür (BENASSAYAG, 2002; JOUSSEN, 2000; BAGLI, 2004).

2.2.2. Kemferol

Kemferol (3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on) bir çok yenilebilir bitkide (çay, brokoli, lahan, fasulye, pırasa, domates, çilek ve üzüm vb.) ve geleneksel tıpta kullanılan bitki veya botanik ürünlerde (*Ginko biloba*, *Tilia* sp, *Equisetum* sp, *Moringa oleifera*, *Sophora japonica* ve propolis vb.) bulunan bir flavonoldür (CALDERON -MONTANO, 2011). Bazı epidemiyolojik çalışmalar kemferol içeren yiyeceklerin tüketiminin kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalık riskinin azalması arasında pozitif ilişki olduğunu göstermektedir. Çok sayıda klinik öncesi çalışma kemferol ve bazı kemferol glikozitlerinin, antioksidan, antienflamatuar, antimikrobiyal, antikanser, kardiyoprotektif, nöroprotektif, antidiyabetik, antiosteoporik, östrojenik/antiöstrojenik, anksiyolitik, analjezik ve antialerjik aktivitelerin dahil olduğu çok sayıda farmasötik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (CALDERON -MONTANO, 2011).

Kemferol, bazı kemferol glikozitleri ve kemferol içeren birçok bitkinin antioksidan aktivitesi ile ilgili birçok bilgi mevcuttur (KAMPKÖTTER, 2007). C3, C5 ve C4'de hidroksil grupları varlığı kemferolün antioksidan özelliği için önemli bir yapısal özelliğidir (PIETTA, 2000). Kemferolün kuvvetli bir süperoksit süpürücüsü olması, fenton reaksiyonları esnasında bakır veya demir iyonları ile şelat yaparak hidroksil radikali oluşumunu azaltması, ksantin oksidaz gibi ROS üreten enzimlerin aktivitesini inhibe edebilmesi antioksidan aktivitesinde önemli rol oynar (WANG, 2006; NAGAO, 1999). Ayrıca kemferol, süperoksit dismutaz, katalaz ve heme oksijenaz-1 gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu veya aktivitesini artırarak antioksidan etkiyi indükleyebilir (DORONICHEVA, 2007; LIN, 2003).

Kemferolün indüklediği hücre ölümleri çeşitli kanser hücrelerinde (akciğer, meme, kolon prostat karaciğer pankreas kan, lenf, deri, özefagus, beyin, rahim, yumurtalık, tiroid ve

kemik) gösterilmiştir (BRUSSELMANS, 2005; HUANG, 2010; KANG, 2009; MARFE, 2009). Yine kemferolün apoptoz indükleyici etkisi ile ilgili çok sayıda çalışma mevcuttur (CALDERON -MONTANO, 2011; MARFE, 2009) Ayrıca kemferol düşük konsantrasyonda bile DNA'yı birçok kanserojenin oluşturacağı hasara karşı koruduğu (CEMELI, 2004), anjiyogenezi inhibe ettiği bilinmektedir (SCHINDLER, 2006; KIM, 2006).

2.2.3. Apigenin

Apigenin ($C_5H_{10}O_5$), 4',5,7-trihydroxyflavone olarak adlandırılan, 5,7 ve 4' pozisyonlara -OH grubu eklenmiş ve moleküler kütlesi 270.24 g/mol olan doğal bir bileşiktir (LEFORT, 2013). Yenilebilir türdeki çoğu lifli bitki ve sebzelerde, (maydonoz, enginar, yer elması, fesleğen, reyhan, kereviz ve kereviz sapında) bol miktarda bulunan yaygın bir flavonoid'tir (MANACH, 2004).

Apigenin sahip olduğu sedatif, antispazmotik ve spazmolitik etkilerinden dolayı yaygın olarak anksiyete ve uyku bozukluklarının tedavisinde bir nutrasötik olarak kullanılmaktadır (LOSI, 2004).

Apigenin flavonoidinin aynı zamanda, çeşitli kanserler için kemo-koruyucu bir ajan olduğu belirtilmektedir (BALIGA, 2006). Bu flavonoidin, ultraviyole ile indüklenmiş DNA hasarına karşı önemli ölçüde aktivite gösterdiği ve buna bağlı olarak da apigeninin deri kanserine karşı koruma sağlayabileceği bildirilmektedir (BIRT, 1997). Apigenin kanser hücreleri ile kıyaslandığında normal hücreler üzerinde daha az sitotoksik etkiye sahiptir (WU, 2006). Bununla birlikte, apigeninin çeşitli kanser hücrelerinde (lösemi, meme, kolon, prostat, karaciğer, kan, lenf, deri ve tiroid) antikanserojenik etkiye sahip olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (BIRT, 2001; BIRT, 1997; KHAN, 2006; SHUKLA, 2006; SHUKLA, 2004; YIN, 2001; WAY, 2004; MORRISSEY, 2005; WAY, 2005). Yine, apigeninin apoptoz indükleyici etkisine dair çok sayıda çalışma mevcuttur (KHAN, 2006; SHUKLA, 2006; SHUKLA, 2004; YIN, 2001; WAY, 2004; MORRISSEY, 2005; WAY, 2005). Yapılan bir çalışmada apigenin kan, lenf hücreleri üzerinde de antikanserojen etkiye sahip olduğu ve lenfosit proliferasyonuna neden olan Concanavalin A' yi inhibe ettiği gösterilmiştir (CHOUDHURY, 2013).

Apigeninin antikanserojen özelliğe sahip olmasının yanı sıra, aynı zamanda anti-mutajenik, anti-inflamatuar ve anti-viral özelliklere de sahip olduğu bildirilmiştir (CHOUDHURY, 2013).

2.2.4. Kersetin

Suda eser miktarda çözülebilen bioflavonoitler sınıfına ait kersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon), birçok yenilebilir meyve ve sebzelerde (kırmızı şarap, greyfurt, ahududu, yaban mersini, kırmızı yaban mersini, kiraz, elma, soğan, siyah çay, az miktarlarda yapraklı yeşil sebzeler, fasulye, brokoli ve lifleri olan yeşillikler) bulunan bir flavonoldür (WACH, 2007).

Kersetin, doğada bitki çayları olarak bilinen bitkilerin yapraklarında, çiçeklerinde ve saplarında da bulunmaktadır (JOUBERT, 2012). Bu bitki çayları eczacılığın değişik alanlarında ve gıda ürünlerinde kullanılmaktadır (SARAF, 2010; KALE, 2010).

Kersetin, antioksidan özellikleri olan bir bitki pigmenti olup, vücuttaki hücreleri serbest radikallerin zararlarından korumaktadır (HE, 2008; BOOTS, 2008; DE GROOT, 1998; TERAÖ, 2009; WISEMAN, 1996).

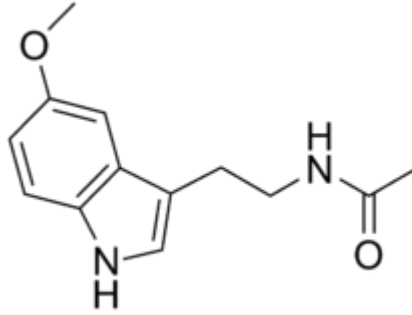
Yapılan birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, kersetinin oksidatif stres ve diğer tipteki hücre hasarlarına karşı hücreleri koruyucu bir biyoaktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (HE, 2008; BOOTS, 2008; DE GROOT, 1998; KUKONGVIRİYAPAN, 2012; KANG, 2013).

Güçlü bir antioksidan olan kersetinin kolesterolü düşürerek kalp hastalıkları riskini azalttığı belirtilmekte (HOLLMAN, 1996; HERTOÖ, 1993; KNEKT, 1996) ve yapılan çeşitli çalışmalarda, kersetin alımının artmasıyla plazma total kolesterol ve LDL-kolesterol konsantrasyonlarının düştüğü gösterilmiştir (HERTOÖ, 1993; KNEKT, 1996). Yine kersetinin antioksidan özelliği sayesinde, akciğerleri ve solunum yollarını sigara ve kirli havanın etkilerinden korumaya yardımcı olduğu ve akciğer kanseri riskini azalttığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (TAN, 2012).

Kersetinin antikanserojenik etkiye sahip olduğu ile ilgili birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma bulunmaktadır (MURPHY, 2011; VARGAS, 2010; MA, 2004; DIHAL, 2006; ARAUJO, 2011). Kersetinin kromatinin yeniden yapılandırılmasına katkıda bulunabileceği ve böylece kanser ilerlemesinde oldukça önemli olan epigenetik değişimlere engel olabileceği bildirilmektedir (GIBELLINI, 2011). Yapılan çalışmalarda kersetinin çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indükleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (BISHAYEE, 2013; YUAN, 2012).

2.3. Melatonin

Melatonin (5-metoksi-N-asetiltryptamin), serotonininden türevlenen, başta pineal bez ve retina olmak üzere birçok periferel doku ve organda sentezlenen indolamin yapısında bir nörohormondur. Günlük ve mevsimlik fizyolojik düzenlemeler için periferel organlara fotoperiyot ile ilgili bilgi aktararak, organizmanın sirkadiyen ritmini düzenler (JUNG, 2006).



Şekil 2.3. Melatoninin kimyasal yapısı

Melatonin sentezi triptofanın pinealositler içine alınması ile başlar ve N-asetil serotoninin melatonine dönüşümü ile tamamlanır. Sentezin düzenlenmesi primer olarak geceye, diğer bir deyişle karanlığa bağlıdır. Sentezlenen melatonin pineal bezin endokrin hücreleri olan pinealositlerden hızla kana salınır (Salgılanma hızı 29 mg gün-1 dür) (ŞENER, 2010).

Plazma melatonininin konsantrasyonu gece saatlerinde gündüze göre 3-10 kat arasında artmaya başlar. Melatonin plazma konsantrasyonu gündüz 0-20 pg/dl iken gece 50-200 pg/dl düzeyine yükselmektedir. Bir günde 30 mg melatonin üretilmektedir ve bunun % 80'ni gece sentez edilmektedir. Melatonin seviyesini ışığın yanında birçok çevresel faktörler (ısı, gel-git vb.) ve çeşitli ilaçlar örneğin β -blokörler etkiler (KLESZCZNSKI, 2011).

Melatonin başta sirkadyen ritim olmak üzere, mevsimsel üreme davranışları, endokrin organların fonksiyonlarının düzenlenmesi, retinadan dopamin salgılanmasının inhibe edilmesi, nörepinefrin aracılı endojen ve ekzojen vazokonstriksiyon etkisinin oluşması, immün cevabın artmasının sağlanması, tümör gelişiminin kontrol edilmesi gibi birçok fizyolojik role sahiptir. Bu fonksiyonları gerçekleştirirken spesifik reseptörlerine bağlanır. Melatoninin hücre zarı, sitoplazması ve çekirdeğinde bulunan üç farklı reseptör tipi tanımlanmıştır

(EKMEKCİOĞLU, 2006). Melatoninin membran reseptörleri MT1 ve MT2 yedi adet transmembran dizisine sahiptir ve G protein çiftleri aracılığıyla ekstraselüler sinyalleri iletirler. MT1 ve MT2 sırasıyla 350 ve 363 amino asit büyüklüğünde olup, G proteini ile ilişkilidirler. MT2, MT1'e %60 homoloji gösterir (SLOMINSKI, 2012). Ayrıca bu iki reseptör benzer farmakolojik özelliklere sahiptirler. Melatonin ve 2-[¹²⁵I]iyodomelatonine subnanomolar afinite gösterirler (MAILLIET, 2004).

MT1 reseptörleri beyin, kardiyovasküler sistem (çevresel kan damarlarında, aort ve kalp), immün sistem, testisler, yumurtalıklar, deri, karaciğer, böbrek, adrenal korteks, plasenta, meme, retina, pankreas ve dalakta ifade edilir. Bu reseptörler termoregülasyonda, arteriyel vazokonstrüksiyonda, kanser hücrelerinin proliferasyonunda, üreme ve metabolik fonksiyonlarda rol alırlar (PANDI-PERUMAL, 2008). MT2 ise immün sistem, beyin (özellikle hipotalamus, suprakiazmatik çekirdek (SCN)), retina, hipofiz, kan damarları, testisler, böbrek, gastrointestinal sistem, meme bezleri, adipoz doku ve deride bulunmuştur. MT2 reseptörünün ise, SCN'deki nöronal termoregülasyonda, retinada dopamin salgısının inhibisyonunda, vazodilatasyonun indüklenmesinde ve immün cevabın artırılmasında rol oynadığı bilinmektedir (PANDI-PERUMAL, 2008).

Melatonin lipofilik özelliğinden dolayı sitozolde ve çekirdekte bağlanma bölgelerine sahiptir. MT1 ve MT2 reseptörlerinden sonra melatonin ve [MCA-NAT (5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine)] ligantına MT1 ve MT2'den daha yüksek afinite gösteren sitozolik bir protein varlığı saptanmış daha sonra bu protein MT3 olarak tanımlanmıştır. MT3 saflaştırılıp tanımlandığında bu proteinin NRH₂kinon oksidoredüktaz 2 (NQO₂) olduğu tespit edilmiştir (NOSJEAN, 2001). NQO₂ geni taşımayan farelerde [125I]-MCA-NAT kullanılarak MT3 bağlanma bölgesi bulunmaması bu görüşü desteklemektedir. MT3'ün görevinin analogu NQO₁ gibi detoksifikasyon olduğu düşünülse de NQO₂ geni taşımayan farelerde menadiyon toksisitesine yabanıl tip farelerden daha fazla toksisite meydana getirmiştir ve henüz NQO₂'nin görevi tam olarak aydınlatılamamıştır (MAILLIET, 2005; NOSJEAN, 2001; BOUTIN, 2005).

Birçok vücut hücresinde reseptörü bulunan melatoninin çok yönlü özelliklerinden dolayı normal hücrelerde kanseri önleyici etkiler oluştururken, kanserli hücrelerde ise kanser gelişimini yok edici role sahiptir. Görme engelli kadınlarda görülen meme kanseri insidansının düşük olduğunun görülmesi üzerine yapılan çalışmalarda melatoninin direk meme kanserinde oldukça etkili olduğu, meme bezinde antiöstrojen etki göstererek anti-

tümoral etki yaptığı görülmüştür. Ayrıca melatonin mitojenik aktiviteyi azaltarak, kanserli dokuda hücre proliferasyonunu durdurmaktadır. Tümör büyümesini hızlandıran prolaktin, büyüme hormonu, gonadotropinler gibi hormonların salımını baskıladığı bildirilmiştir (SANCHEZ- BARCELO, 2003). Melatoninin oldukça güçlü antioksidan etkisi, serbest radikal aracılı kanser oluşumunu önlemektedir (LANOIX, 2012). Melatonin bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi sadece kansere karşı değil, başka birçok hastalığa karşı da organizma savunmasına katkı sağlar (TOPAL, 2009).

Melatonin hücreleri kanser oluşumuna karşı korur, çoğalmasını önler ve apoptozu indükler. (JUNG, 2006). Yine birçok kanser hücresinde yapılan çalışmalarda melatoninin bu hücrelerde hücre proliferasyonunu azaltıp, apoptozu indüklediği gösterilmiştir (UGUZ, 2012; GARCIA-SANTOS, 2006).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

Deneyisel çalışmalar hücre kültürü ve analitik çalışma laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş olup ilgili tüm gereçler kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm sarf malzemeler steril hücre kültürü için üretilmiştir. Tüm kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Serileri

Çalışmada Kronik Myeloid lösemi hücreleri K562 (ATCC, CCL-243); Akut T Lösemi Hücresi Klon E6-1 Jurkat (ATCC Kat No. TIB-152); İnsan hepatosellüler karsinom hücre hattı HepG2 (ATCC Kat No. HB-8065) ve İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı MCF7 (ATCC Kat. No. HTB-22), kullanıldı. İnsan lösemi hücre kültürü K562 ve NQO₂ KD K562 hücre serisi Prof. Dr. David Ross'un laboratuvarında (ABD Colorado Denver Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi) çalışıldı.

3.2.2. Hücre Kültürü

Jurkat ve K562 hücreleri, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), penisilin (10000 U/mL), streptomisin (10 mg/mL) ve 2 mM L-glutamin içeren RPMI 1640 Medium besi ortamı içerisinde, HepG2 ve MCF7 hücreleri ise, ısı ile inaktifleştirilmiş %10 fetal sığır serum (FBS), penisilin (10000 U/mL), streptomisin (10 mg/mL), 2 mM L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besi ortamı içerisinde, 37°C'de %5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkubatoründe üretildi. Hücrelerin besiyeri iki günde bir değiştirildi ve canlılıkları, çoğalma hızları ve morfolojik yapıları invert mikroskop ile takip edildi.

3.2.3. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2]-2,5-difenil Tetrazolyum Bromid) Hücre Canlılık Testi

Maddelerin hücre canlılığı üzerine etkisi sarı renkli tetrazolyum tuzunun mitokondride bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından mor renkli formazon kristallerine indirgenmesi prensibine dayanan MTT testi ile araştırıldı (BAYSAL, 2008).

3.2.4. Toplam Reaktif Oksijen Miktarı

Reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu, DCF (diklorofluoresin) yoğunluğunun floresans olarak ölçümü yöntemi ile belirlendi.

3.2.5. Hücre Çoğalması

Hücre çoğalması Cyquant NF Cell proliferation kiti prosesine uygun olarak gerçekleştirildi ve sonuçlar aynı yöntemle hesaplandı.

3.2.6. Apo-1/Fas/CD95 Yolağı Deneyi

Apoptoz yolaklarından CD95 Fas yolağı üzerinden gerçekleştirilen apoptoz çalışmaları Apo-1/Fas/CD95 ELISA kiti ile kit prosesine göre yapılarak sonuçlar aynı yöntemle hesaplandı.

3.2.7. NQO₂ Ekspresyonu

Hücrelerde NQO₂ ekspresyonu Western Blot yöntemine göre yapılarak hesaplamalarda kontrol antikoru olarak β -tubulin kullanıldı.

3.2.8. Akım Sitometrisi (Flow Cytometry)

Apoptozun ölçülmesinde akım sitometre kullanımının sebebi ölü hücrelerin miktarının tayini, apoptoz ve nekroz ile oluşan ölümlerin ayırt edilebilmesidir. Anneksin V (AV), apoptoza gitmekte olan hücreleri ayırt eder. Apoptozun erken evrelerinde, hücrelerin zar yapısı bozulmaya başlar. Hücre zarı iç kısmında bulunan fosfatidil serinler, zar dışına çıkarlar. Ortamda Ca^{2+} varlığında anneksin V, fosfatidil serin ile bağlanır. AV'in fosfatidil serine yüksek ilgisi vardır. Propidyum iyodür (PI) ise canlılık için standart bir akım sitometre probudur. Canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırır. Hücre zarı korunmuş canlı hücreler PI geçiremezler. Zar yapıları bozulduğunda PI, hücre içine kolayca girer ve DNA'ya bağlanır. Hücreler AV ve PI ile negatif boyanırsa, bu onların sağlıklı olduklarını işaret eder. AV pozitif, PI negatif boyanan hücreler, erken apoptoza gitmekte olduklarını göstermektedirler. Hücreler, hem AV hem de PI pozitif boyanırsa, geç apoptoza ya da nekroza gitmektedirler (DERİCİ, 2007).

3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Sonuçlar ortalama değeri $\pm$ %95 güvenilirlik sınırları dahilinde verilmiştir. Analizler SPSS ver. 13 programı kullanılarak ortalamalar arasındaki farkın önemliliği, One-way ANOVA testi posthoc test olarak Tukey ile gerçekleştirildi. $p < 0.05$ ve $p < 0.001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

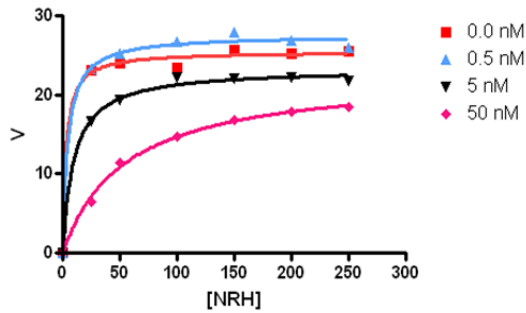
4.1. K562 VE KD K562 HÜCRELERİ İLE YAPILAN DENEYLER

Melatonin, luteolin, kemferol, kersetin ve apigeninin; NQO₂ enzimi üzerine NRH bağımlı enzim kinetiği deneyi sonucu elde edilen V_{max}, K_m ve K_i değerleri, K562 (myeloid lösemi) ve NQO₂ -/- K562 (KD K562) hücrelerinde NQO₂ proteini Western Blot görüntüleri, MTT canlılık testleri, ROS ölçümleri ve apoptoz bulguları aşağıda verilmiştir.

4.1.1. Enzim Kinetiği Analizi

Yapılan enzim kinetiği deneyleri ile *in vitro* ortamda; luteolin, kemferol, apigenin, kersetin ve melatoninin NQO₂ enzimi üzerine NRH bağımlı inhibitör etkisi ve inhibisyon şekli araştırılmıştır. İnhibitör etkisi araştırılan bu bileşiklerin Michaelis- Menten ve Lineweaver-burk grafikleri oluşturulup V_{max}, K_m ve K_i değerleri hesaplanıp, her bileşik için bulunan K_i değerleri kıyaslanarak sonuçlar yorumlanmıştır.

Luteolin Enzim Kinetiği Bulguları

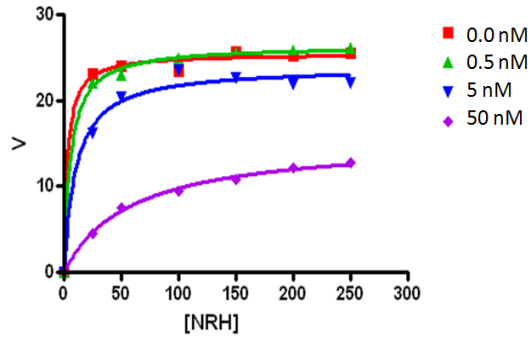


Konsantrasyon (nM)	V _{max}	K _m	R ²
0.0	25.50	2.945	0.9955
0.5	27.57	4.450	0.9958
5	23.34	9.665	0.9966
50	22.75	54.580	0.9970

Grafik 4.1. ve Tablo 4.1. Luteolinin Michaelis-Menten grafiği (R² = 0,9) ve değerleri

Grafik 4.1’de ve Tablo 4.1’de görüldüğü gibi, V_{max} birbirine yakın değerler veririrken, K_m değerleri artmıştır. Dolayısıyla gerçekleşen inhibisyon şekli yarışmalı inhibisyonudur. Luteolin için doğrusal Lineweaver Burke grafiğinden faydalanılarak hesaplanan K_i değeri 1.546 nM, V_{max} ise 25.50’dir.

Kemferol Enzim Kinetiği Bulguları

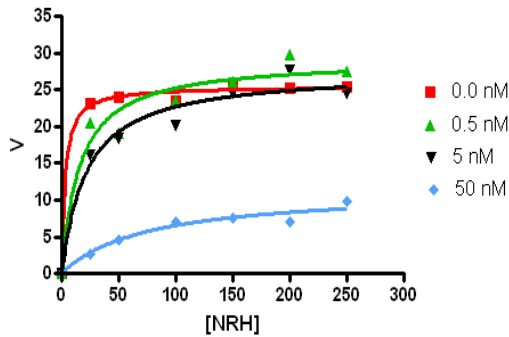


Konsantrasyon (nM)	Vmax	Km	R ²
0.0	25.50	2.945	0.9955
0.5	26.43	5,642	0.9981
5	23.97	10,200	0.9859
50	15.52	58,800	0.9969

Grafik 4.2. ve Tablo 4.2. Kemferolün Michaelis-Menten grafiği ($R^2=0,9$) ve değerleri

Grafik 4.2’de ve Tablo 4.2’de görüldüğü gibi, Vmax birbirine yakın değerler verirken, Km değerleri artmıştır. Dolayısıyla gerçekleşen inhibisyon şekli yarışmalı inhibisyonudur. Kemferol için doğrusal Lineweaver Burke grafiğinden faydalanılarak hesaplanan Ki değeri 0,5542 nM, Vmax ise 25,40’dır.

Kersetin Enzim Kinetiği Bulguları



Konsantrasyon (nM)	Vmax	Km	R ²
0.0	25.50	2.945	0,9955
0.5	29.20	15.720	0,9546
5	27.60	21.590	0,9662
50	11.50	75.790	0,9568

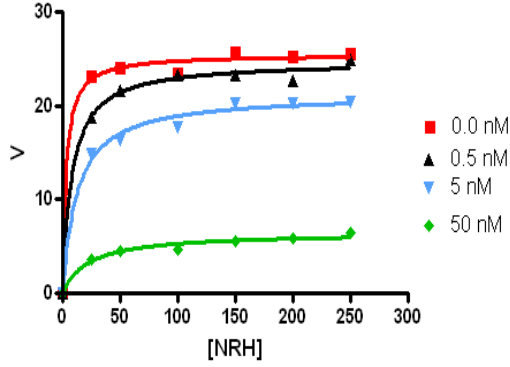
2.

Grafik 4.3. ve Tablo 4.3. Kersetinin Michaelis-Menten grafiği ($R^2=0,9$) ve değerleri

Grafik 4.3’de ve Tablo 4.3’de görüldüğü gibi, Vmax birbirine yakın değerler verirken, Km değerleri artmıştır. Dolayısıyla gerçekleşen inhibisyon şekli kompetitif (yavaş) inhibisyonudur.

inhibisyonudur. Kersetin için doğrusal Lineweaver Burke grafiğinden faydalanılarak hesaplanan K_i değeri 1.059 nM, V_{max} ise 27.42'dir.

Apigenin Enzim Kinetiği Bulguları:

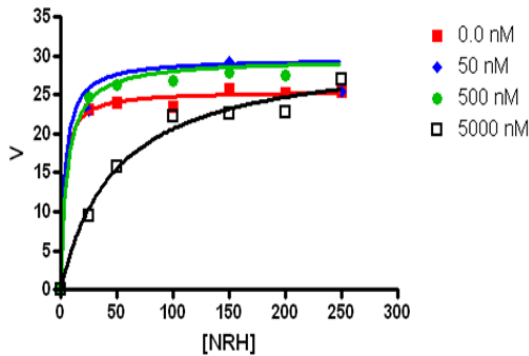


Konsantrasyon (nM)	Vmax	Km	R ²
0.0	25.50	2.945	0.9955
0.5	24.75	7.813	0.9946
5	21.26	12.400	0.9913
50	6.51	22.770	0.9766

Grafik 4.4 ve Tablo 4.4. Apigeninin Michaelis-Menten grafiği ($R^2 = 0,9$) ve değerleri

Grafik 4.4'de ve Tablo 4.4'de görüldüğü gibi, V_{max} ve K_m değerleri ise Tablo... 'de gösterilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde V_{max} birbirine yakın değerler verirken, K_m değerleri artmıştır. Dolayısıyla gerçekleşen inhibisyon şekli kompetitif (yarışmalı) inhibisyonudur. Apigenin için doğrusal Lineweaver Burke grafiğinden faydalanılarak hesaplanan K_i değeri 0,2506 nM, V_{max} ise 24,72'dir.

Melatonin Enzim Kinetiği Bulguları



Konsantrasyon (nM)	Vmax	Km	R ²
0.0	25.50	2.945	0.9955
50	29.68	3.742	0.9244
500	29.63	5.688	0.9823
5000	30.80	49.250	0.9816

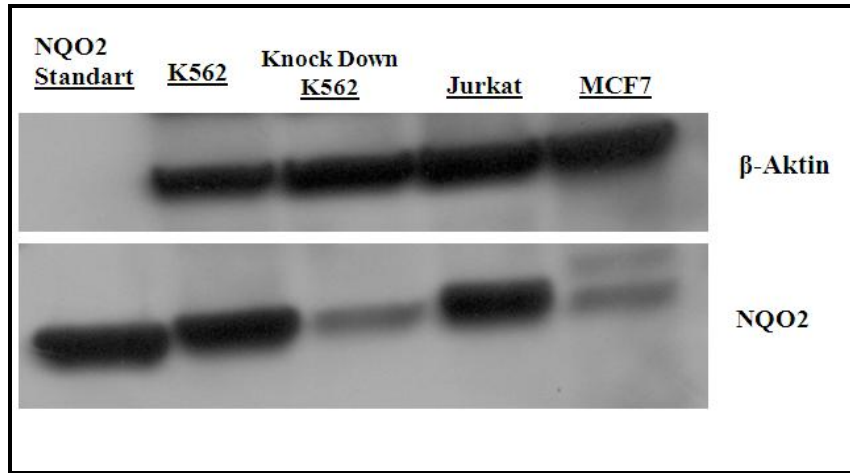
Grafik 4.5. ve Tablo 4.5. Melatoninin Michaelis-Menten grafiği ($R^2 = 0,9$) ve değerleri

Grafik 4.5’de ve Tablo 4.5’de görüldüğü gibi, V_{max} birbirine yakın değerler verirken, K_m değerleri artmıştır. Dolayısıyla gerçekleşen inhibisyon şekli yarışmalı inhibisyonudur. Melatonin için doğrusal Lineweaver Burke grafiğinden faydalanılarak hesaplanan K_i değeri 544.9 nM, V_{max} ise 28,45’dir.

4.1.2. Hücre Bulguları

Çalışmamızda kullanılacak hücre hattını belirlemek üzere en yaygın kanser türlerinden lösemi (K562) ve meme kanseri (MCF7) hücre hatları seçilmiş, içerdikleri NQO_2 miktarları Western Blot yöntemi ile tespit edilmiştir.

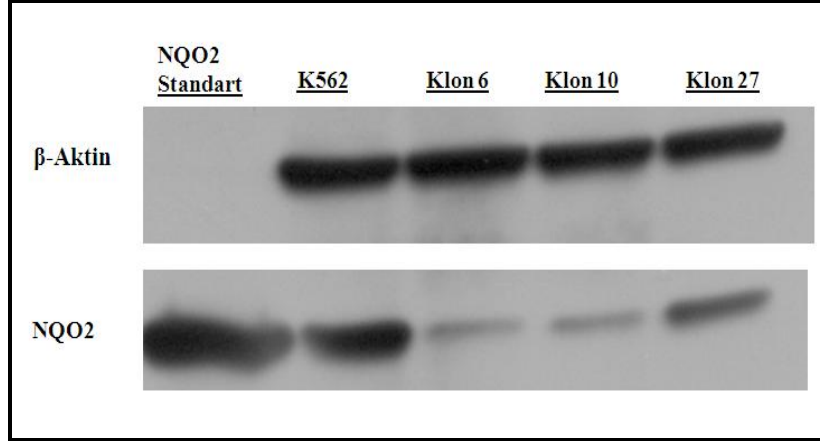
Hücre hattı belirlendikten sonra inhibitör maddelerin hücreler üzerine, NQO_2 enzimi varlığında ve yokluğunda, toksik, apoptotik, oksidan etki parametreleri ölçülüp sonuçlar NQO_2 enzim aktivitesi ile bağlantısı yönünden değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. Hücrelerin sahip oldukları NQO_2 miktarlarını gösteren Western Blot görüntüsü. K562 (miyeloid lösemi hücreleri), NQO_2 içermeyen K562 (KD K562), Jurkat (T lenfosit lösemi hücreleri), MCF7 (meme kanseri hücreleri). Yükleme kontrolü olarak β -Aktin proteinini görüntülenmiştir. Şekildeki görüntü üç farklı çalışmadan birini temsil etmektedir.

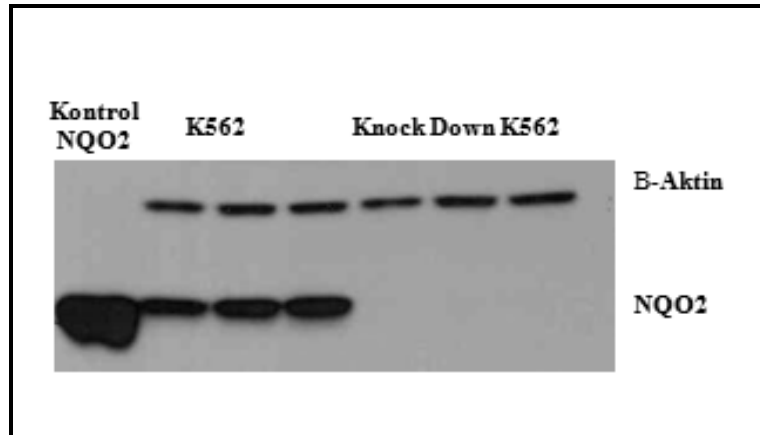
K562 ve Jurkat hücreleri bol miktarda NQO_2 proteini içerirken, MCF-7 ve KD K562 hücre dizileri ise NQO_2 proteini içermemektedir (Şekil 4.1). Hem yüksek oranda NQO_2 içerdiği için hem de NQO_2 proteini içermeyen klonu bulunduğu için K562 hücreleriyle çalışmaya karar verilmiştir. Üç farklı klonu mevcut olan KD K562 hücrelerinden Klon 10’un

en az miktarda NQO₂ içermektedir. Çalışmanın devamında KD hücre olarak Klon 10 kullanılmıştır.



Şekil 4.2. KD K562 hücre klonlarının içerdikleri NQO₂ miktarlarının Western Blot görüntüsü.

Son olarak K562 hücreleri ve “Klon 10” aynı Western Blot sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 4.2) K562 hücrelerinin bol miktarda NQO₂ içerirken ve KD K562 hücrelerin beklediği gibi NQO₂ içermemektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. K562 ve KD K562 hücreleri NQO₂ proteini Western Blot görüntüsü.

4.1.3. MTT Hücre Canlılığı Testi Bulguları

K562 ve KD K562 hücrelerinde flavonoidler (luteolin, kemferolün, kersetin ve apigenin) ve melatoninin hücre canlılığına etkisi MTT kolorimetrik hücre canlılığı testi ile

belirlenip sonuçlar canlılık oranı %100 kabul edilen kontrol grubu hücreler ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

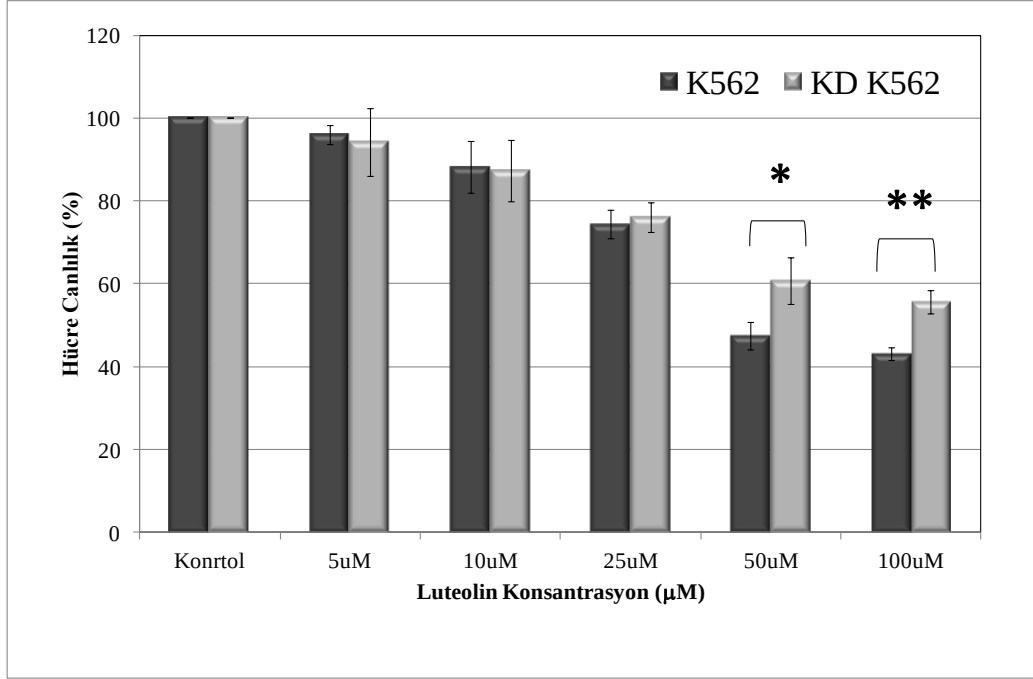
Luteolinin K562 ve KD K562 Hücrelerinde Canlılık Üzerine Etkisi

K562 ve KD K562 hücrelerine artan konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 100 μ M) luteolin ilave edilmiştir. K562 hücrelerinde luteolinin 10 μ M'lık konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığında kontrole kıyasla anlamlı ($p<0,05$) bir düşüş vardır. 10 μ M'dan itibaren konsantrasyon arttıkça canlılık doza bağımlı bir şekilde azalırken, 10 μ M konsantrasyonda ~ %12, 25 μ M konsantrasyonda ~ %25, 50 μ M konsantrasyonda ~ %53 ve 100 μ M konsantrasyonda ~ %57 oranında bir azalma tespit edilmiştir. KD K562 hücrelerinde ise luteolinin 25 μ M'lık konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığında kontrole kıyasla anlamlı ($p<0,05$) bir düşüş vardır. 25 μ M'dan itibaren konsantrasyon arttıkça canlılık doza bağımlı bir şekilde azalmış, 50 μ M konsantrasyonda ~%40 ve 100 μ M konsantrasyonda ~%43 olmak üzere anlamlı ($p<0,001$) bir azalma tespit edilmiştir.

K562 ve KD K562 hücreleri arasında hücre canlılığı yüzdeleri kıyaslandığında Grafik 4.6'da görüldüğü gibi sadece 50 μ M ve 100 μ M'lık konsantrasyonlarda anlamlı fark mevcuttur. 50 μ M için K562 hücrelerinde görülen ~ %47'lik canlılık oranı aynı konsantrasyon için KD K562 hücrelerinde ~%61'dir. 100 μ M için ise K562 hücrelerinde görülen ~%43'lük canlılık oranı, KD K562 hücrelerinde ~%56'dır. 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarda; NQO₂ içeren K562 hücrelerinde canlılık oranında daha fazla azalmıştır.

Kemferolün K562 ve KD K562 Hücrelerinde Canlılık Üzerine Etkisi

K562 ve KD K562 hücrelerine artan konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 100 μ M) luteolin ilave edilmiştir. K562 hücrelerinde kemferolün 50 μ M'lık konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığında kontrole kıyasla anlamlı ($p<0,05$) bir düşüş vardır. 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda canlılık doza bağımlı bir şekilde azalırken, 50 μ M konsantrasyonda ~ %18, 100 μ M konsantrasyonda ~ %24 oranında bir azalma tespit edilmiştir. KD K562 hücrelerinde ise bütün konsantrasyonlarda kontrole göre bir azalma tespit edilmesine rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kemferol KD K562 hücre canlılığını değiştirmemiştir.



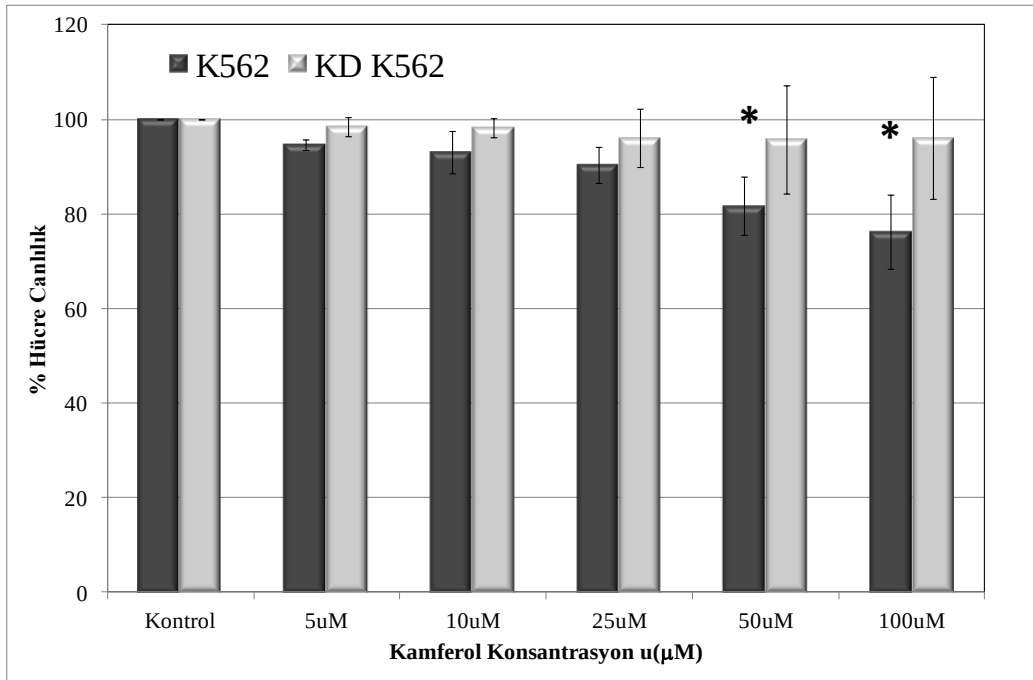
Grafik 4.6. Artan luteolin konsantrasyonlarında hücre canlılığının K562 ve KD K562 hücre grupları arasında karşılaştırılması. Anlamlılık değeri $**p<0.001$, $*p<0,05$ 'dir. Ortalama±Standart Sapma (Ort±STD) (n=3).

İki hücre grubunda aynı dozlar için hücre canlılığı yüzdeleri kıyaslandığında Grafik 4.7'de görüldüğü gibi yalnız 50μM ve 100μM'lık konsantrasyonlar için % hücre canlılık oranları arasında anlamlı fark oluşmuştur. 50 μM için K562 hücrelerinde görülen yaklaşık %81'lik canlılık oranı aynı konsantrasyon için KD K562 hücrelerinde %95 civarındadır. 100 μM için ise hücre canlılığı yüzdeleri K562 hücrelerinde %76 iken, KD K562 hücrelerinde yaklaşık %96 civarında olupbu konsatrasyonda iki hücre tipi arasında oluşan fark anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak NQO₂ enzimine sahip K562 hücrelerinde, bu enzime sahip olmayan KD K562 hücrelerine göre, 50μM ve 100μM konsantrasyonlarda % canlılık oranında daha fazla bir düşüş olduğu, bu konsantrasyonlar da iki hücre tipi % canlılıkları arasında görülen farkların anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Kersetin K562 ve KD K562 Hücrelerinde Canlılık Üzerine Etkisi

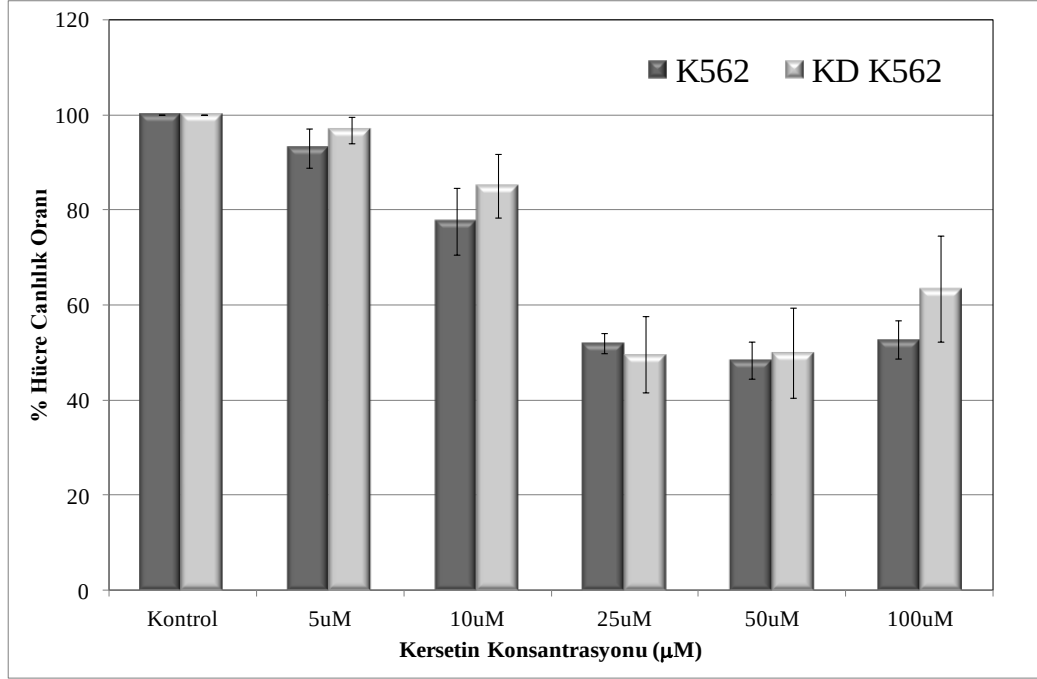
K562 ve KD K562 hücrelerine artan konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 100 μM) luteolin ilave edilmiştir. K562 hücrelerinde kersetinin artan konsantrasyonlarında doza bağımlı bir şekilde azalmıştır. 10 μM'lık konsantrasyonundan itibaren ise hücre canlılığında

kontrole kıyasla anlamlı ($p<0,001$) bir azalma tespit edilmiştir. Canlılık 5 μM konsantrasyonda ~ %7, 10 μM konsantrasyonda ~ %22, 25 μM konsantrasyonda ~ %49, 50 μM konsantrasyonda ~ %52 ve 100 μM konsantrasyonda ~ %47 oranında azalmıştır. KD K562 hücrelerinde kersetinin artan konsantrasyonlarında hücre canlılığı azalırken, 25 μM 'lık konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığında kontrole kıyasla anlamlı ($p<0,001$) bir azalma tespit edilmiştir. Canlılık 5 μM konsantrasyonda ~ %3, 10 μM konsantrasyonda ~ %15, 25 μM konsantrasyonda ~ %50, 50 μM konsantrasyonda ~ %50 ve 100 μM konsantrasyonda ~ %37 oranında azalmıştır.



Grafik 4.7. Artan kemferol konsantrasyonlarında % hücre canlılık oranlarının K562 ve KD K562 hücre grupları arasında karşılaştırılması. Anlamlılık değeri $**p < 0.001$, $*p < 0,05$ 'dir. Ortalama±Standart Sapma (Ort±STD) (n=3).

K562 ve KD K562 hücreleri arasında hücre canlılığı yüzdeleri kıyaslandığında Grafik 4.8'de görüldüğü gibi bütün konsantrasyonlar da fark mevcuttur. Fakat bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

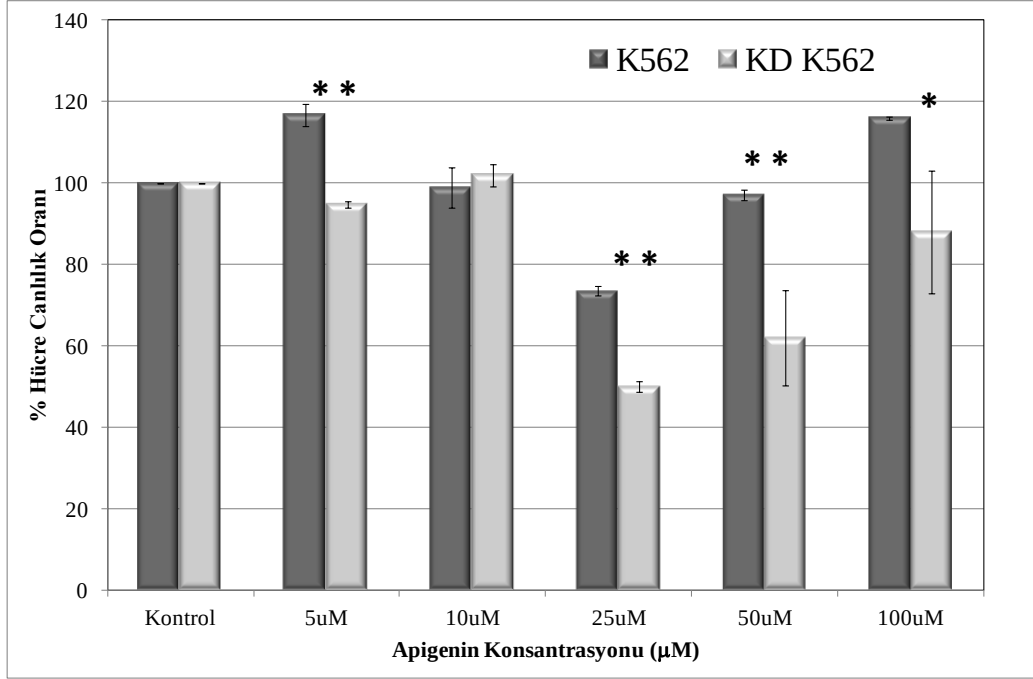


Grafik 4.8. Artan kersetin konsantrasyonlarında hücre canlılığının K562 ve KD K562 hücre grupları arasında karşılaştırılması. Ortalama±Standart Sapma (Ort±STD) (n=3).

Apigeninin K562 ve KD K562 Hücrelerinde Canlılık Üzerine Etkisi

K562 ve KD K562 hücrelerine artan konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 100 µM) luteolin ilave edilmiştir. K562 hücrelerinde apigeninin yalnızca 25 µM konsantrasyonunda hücre canlılığı kontrole kıyasla anlamlı ($p<0,001$) bir şekilde azalmıştır. 25 µM konsantrasyonda canlılıkta ~ %27 oranında azalma tespit edilmiştir. Diğer konsantrasyonlarda ise canlılık oranı artmıştır.

KD K562 hücrelerinde ise bütün konsantrasyonlarda kontrole göre bir azalma tespit edilmesine rağmen yalnızca 25 µM ve 50 µM konsantrasyonlarda tespit edilen azalma oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 25 µM konsantrasyonda canlılıkta ~ %50, 50 µM konsantrasyonda ise ~ % 38 oranında azalma tespit edilmiştir.

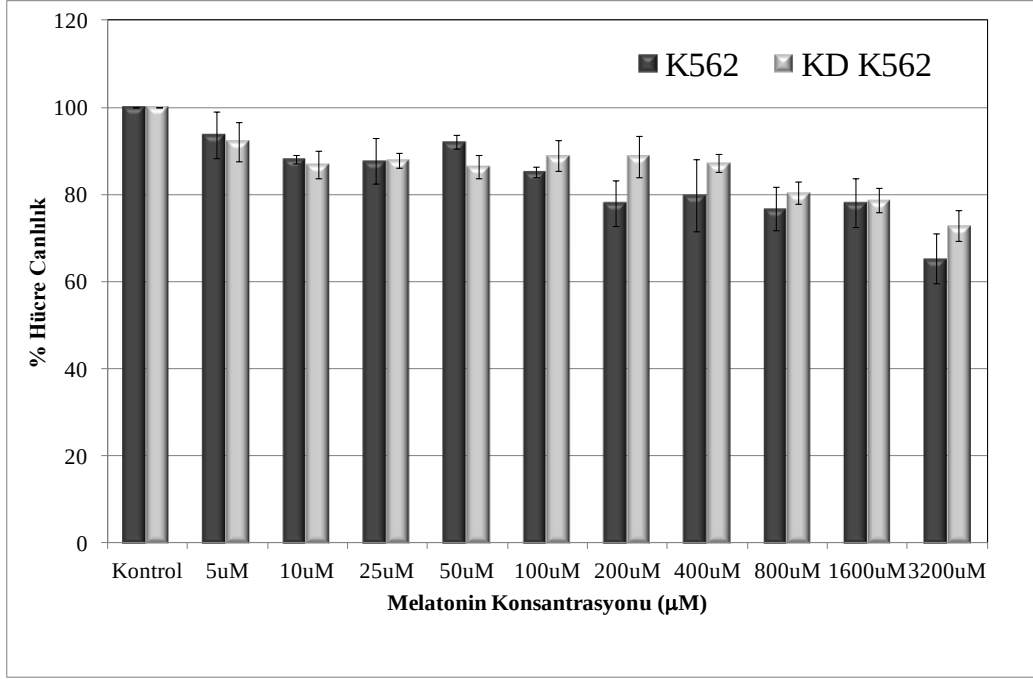


Grafik 4.9. Artan apigenin konsantrasyonlarında % hücre canlılık oranlarının K562 ve KD K562 hücre grupları arasında karşılaştırılması. Anlamlılık değeri $**p < 0.001$ 'dir. Ortalama±Standart Sapma (Ort±STD) (n=3).

İki hücre grubunda aynı dozlar için hücre canlılığı yüzdeleri kıyaslandığında Grafik 4.9.'da görüldüğü gibi 5 μM, 25 μM, 50μM ve 100μM'lık konsantrasyonlar için % hücre canlılık oranları arasında anlamlı fark oluşmuştur.

Melatoninin K562 ve KD K562 Hücrelerinde Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

K562 hücrelerinde 5μM, 10μM, 25μM ve 50 μM'lık konsantrasyonlarda canlılık oranında bir miktar azalma görülse de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. 100 μM'dan itibaren konsantrasyon arttıkça canlılığın doza bağımlı olmayan bir şekilde azaldığı, 100 μM, 200μM, 400μM, 800μM, 1600μM, 3200μM konsantrasyonlarında sırasıyla; ~ %15, %22, %21, %23, %22, %35 oranlarında anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. KD K562 hücrelerinin canlılığında ise 5 μM konsantrasyon için %8'lik bir azalma gözlemlense de istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı tespit edildi. 10μM, 25μM, 50 μM, 100μM, 200μM, 400μM, 800μM, 1600μM, 3200μM konsantrasyonlarında hücre canlılığının kontrole kıyasla sırasıyla doza bağlı olmayan bir şekilde; ~% 8, % 13, % 12, % 14, % 11, % 11, % 13, % 20, % 21, % 27 oranlarında anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi (Grafik 4.10).



Grafik 4.10. Artan Melatonin konsantrasyonlarında % hücre canlılık oranlarının K562 ve KD K562 hücre grupları arasında karşılaştırılması. Anlamlılık değeri $**p < 0.001$, $*p < 0,05$ 'dir. Ortalama±Standart Sapma (Ort±STD) (n=3).

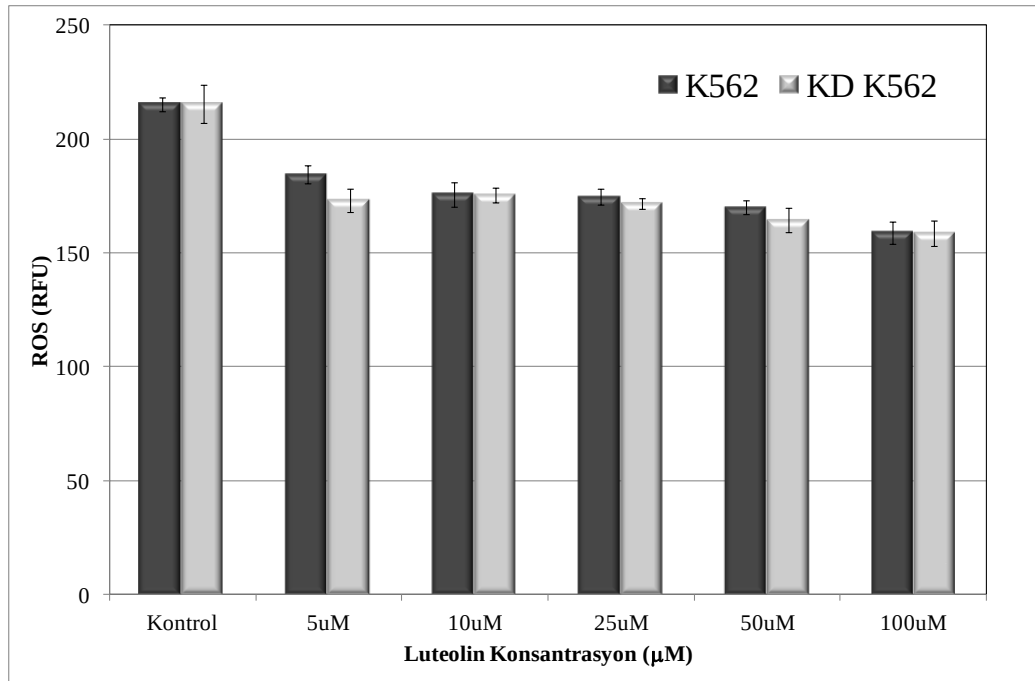
NQO₂ içeren K562 ve içermeyen KD K562 hücreleri aynı konsantrasyonların etkileri arasında fark olup olmadığını gözlemlemek üzere yapılan karşılaştırmada melatoninin % canlılık oranını doza bağlı olmayan bir şekilde düşürdüğü fakat hücre grupları arasında aynı konsantrasyonlar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü.

4.1.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Oluşumunun İncelenmesi

Fluorometrik yöntemlerden 2',7' DCFH-DA oksidasyonunun analizi son yıllarda biyolojik sistemlerde oksidan mekanizmaların etkilerini ortaya çıkaran tetkikler olduğundan, çalışmamızda melatonin, kamferol ve luteolinin K562 hücrelerinde oksidatif stres üzerine etkisi 2',7' DCFH-DA oksidasyonu ile değerlendirildi. Çeşitli oksidanların varlığında, floresan ışıma veren bir bileşik şekline dönen 2',7' DCFH-DA'nın oksidasyonu fluorometrik olarak değerlendirildi. Sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandı ve "Relatif Floresan Birimi" olarak tanımlanan RFU (Relative Fluorescence Unit) floresan ışıma değeri üzerinden değerlendirildi.

K562 Hücre Kültüründe Luteolinin Hücre İçi Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

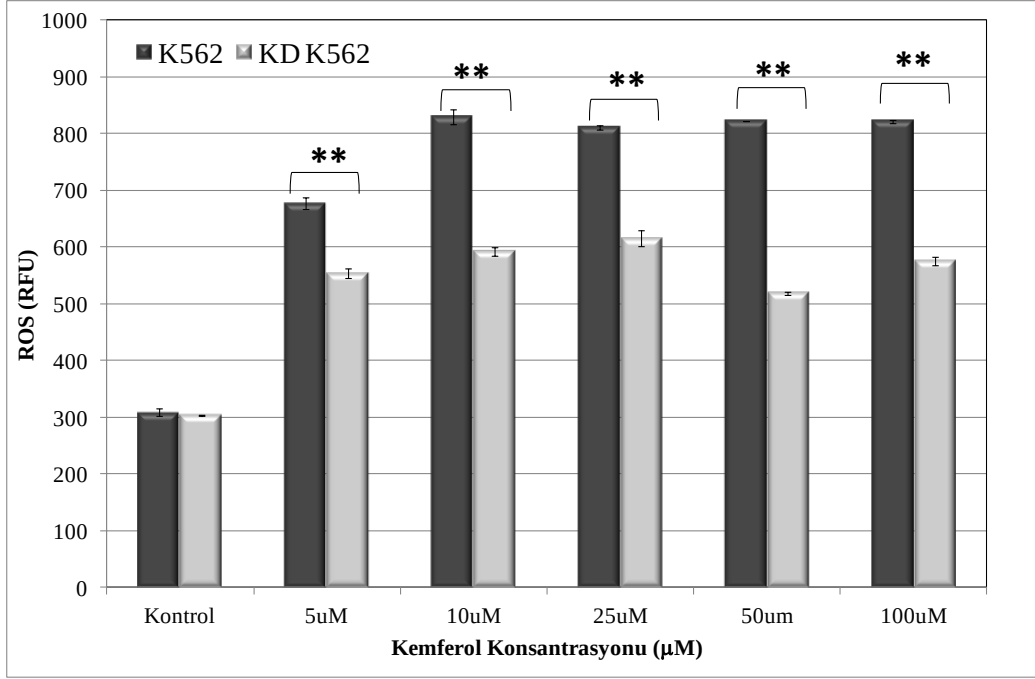
Luteolinin değişen konsantrasyonları (5, 10, 25, 50, 100 μ M) ile inkübe edilen hem K562 hem de KD K562 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla 2',7' DCFH-DA oksidasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi. Luteolin ile inkübe edilen iki hücre tipi kıyaslandığında ROS oluşumu oranları arasında anlamlı bir fark oluşmadığı tespit edildi. Luteolinin her iki hücre tipi içinde antioksidan etkisi gözlemlendi. (Grafik 4.11).



Grafik 4.11. K562 ve KD K562 hücrelerinin farklı Luteolin konsantrasyonlarında ROS oluşumlarının karşılaştırılması.

K562 Hücre Kültüründe Kemferolün Hücre İçi Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

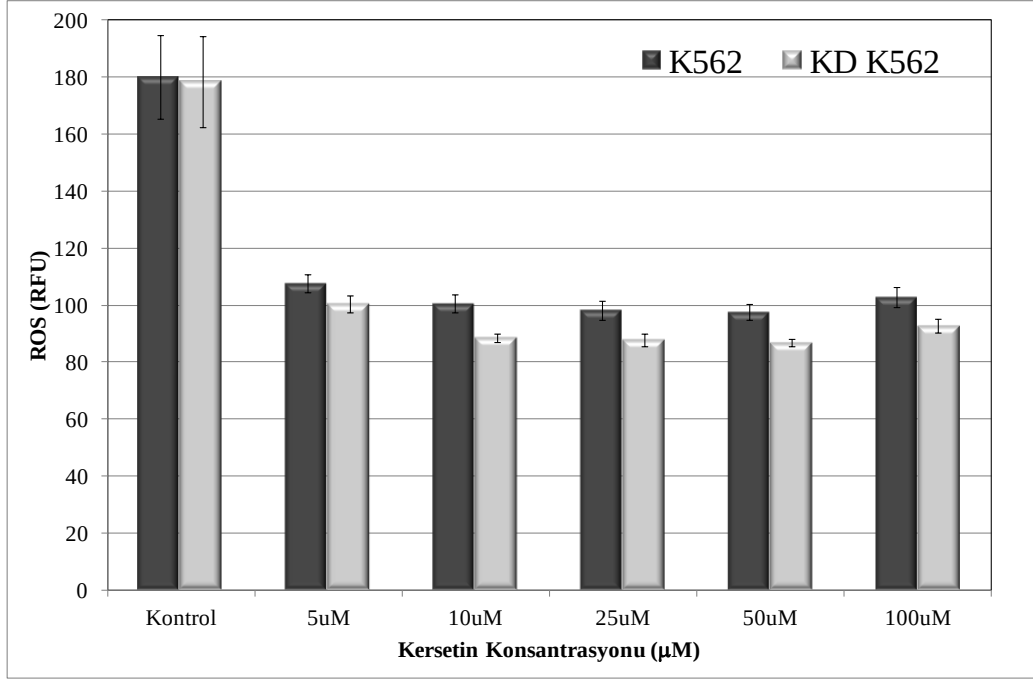
Kemferolün değişen konsantrasyonları (5, 10, 25, 50, 100 μ M) ile inkübe edilen hem K562 hemde KD K562 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla 2',7' DCFH-DA oksidasyonunu anlamlı bir şekilde artırdığı tespit edildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kemferolün artan konsantrasyonlarında hücre içinde oluşan ROS miktarının K562 ve KD K562 hücrelerinde arttığı fakat NQO₂ içeren K562 hücrelerinde artışın KD K562 hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu ve iki hücre arasındaki farkın bütün konsantrasyonlarda anlamlı ($p < 0,001$) olduğu sonucuna varıldı (Grafik 4.12).



Grafik 4.12. K562 ve KD K562 hücrelerinin farklı kemferol konsantrasyonlarında ROS oluşumlarının her bir doz için karşılaştırılması. Oluşan ROS miktarları RFU±S.D. olarak ifade edildi. **p<0,001

K562 Hücre Kültüründe Kersetinin Hücre İçi Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

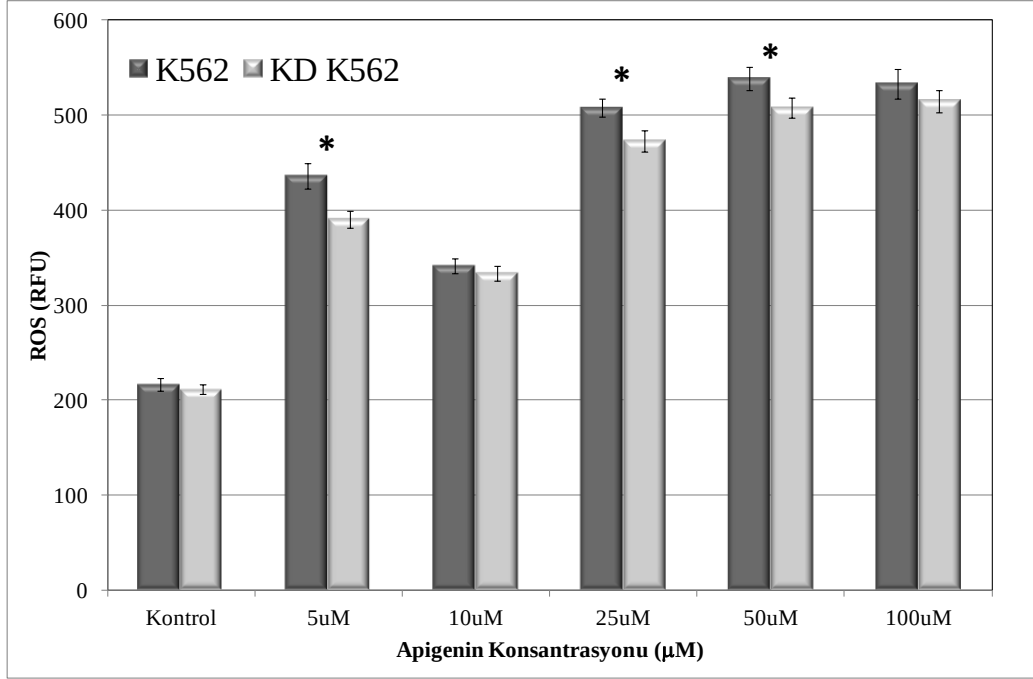
Kersetinin değişen konsantrasyonları (5, 10, 25, 50, 100μM) ile inkübe edilen hem K562 hem de KD K562 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla 2',7' DCFH-DA oksidasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi. (Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü, ANOVA testi posthoc test olarak Tukey ile yapıldı. $p<0,001$ ve $p<0,05$ istatistiksel anlamlı fark olarak kabul edildi). Kersetin ile inkübe edilen iki hücre tipi kıyaslandığında ROS oluşumu oranları arasında anlamlı bir fark oluşmadığı tespit edildi. Kersetinin her iki hücre tipi içinde antioksidan etkisi gözlemlendi. (Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü, T testi ile yapıldı (Grafik 4.13).



Grafik 4.13. K562 ve KD K562 hücrelerinin farklı kersetin konsantrasyonlarında ROS oluşumlarının karşılaştırılması.

K562 Hücre Kültüründe Apigenin Hücre İçi Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

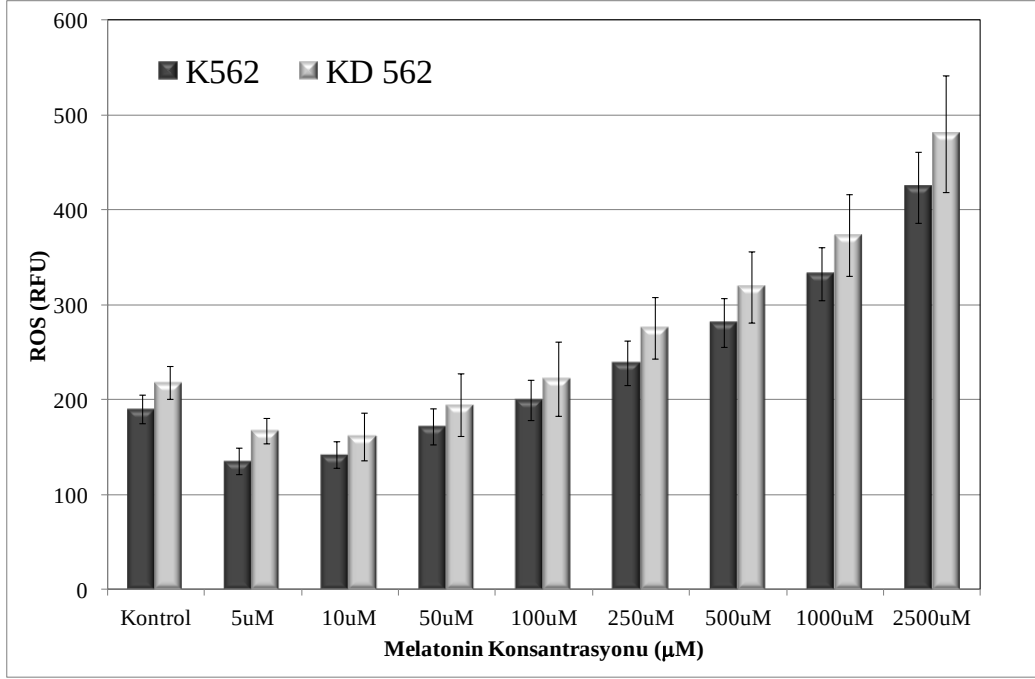
Apigeninin değişen konsantrasyonları (5, 10, 25, 50, 100 μM) ile inkübe edilen hem K562 hemde KD K562 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla 2',7' DCFH-DA oksidasyonunu anlamlı bir şekilde artırdığı tespit edildi (Grafik 4.15). (Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü, ANOVA testi posthoc test olarak Tukey ile yapıldı. $p < 0,001$ ve $p < 0,05$ istatistiksel anlamlı fark olarak kabul edildi). Yapılan ölçüm sonucunda apigeninin artan konsantrasyonlarında hücre içinde oluşan ROS miktarının K562 ve KD K562 hücrelerinde arttığı fakat NQO₂ içeren K562 hücrelerinde artışın KD K562 hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu ve iki hücre arasındaki farkın bütün konsantrasyonlarda anlamlı ($p < 0,001$) olduğu yapılan istatistiksel analizler sonucu görüldü (Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü, T testi ile yapıldı ve $p < 0,05$ istatistiksel anlamlı fark olarak kabul edildi. (Grafik 4.14).



Grafik 4.14. K562 ve KD K562 hücrelerinin farklı apigenin konsantrasyonlarında ROS oluşumlarının her bir doz için karşılaştırılması. Oluşan ROS miktarları RFU±S.D. olarak ifade edildi (**p<0,001).

K562 Hücre Kültüründe Melatoninin Hücre İçi Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Melatoninin değişen konsantrasyonları (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 μM) ile inkübe edilen hem K562 hemde KD K562 hücrelerinde kontrol grubuna 2',7' DCFH-DA oksidasyonunu 100 μM konsantrasyona kadar düşürdüğü, bu konsantrasyondan sonra K562 hücrelerinde 500, 1000 ve 2500 μM'lık konsantrasyonlarda, KD K562 hücrelerinde 1000 ve 2500μM'lık konsantrasyonlarda anlamlı bir şekilde artırdığı tespit edildi. Melatonin ile inkübe edilen iki hücre tipinde ROS oluşumu oranları arasında anlamlı bir fark oluşmadığı tespit edildi. Melatoninin her iki hücre tipi için de düşük konsantrasyonlarında antioksidan, yüksek konsantrasyonlarında prooksidan etki gözlemlendi (Grafik 4.15).



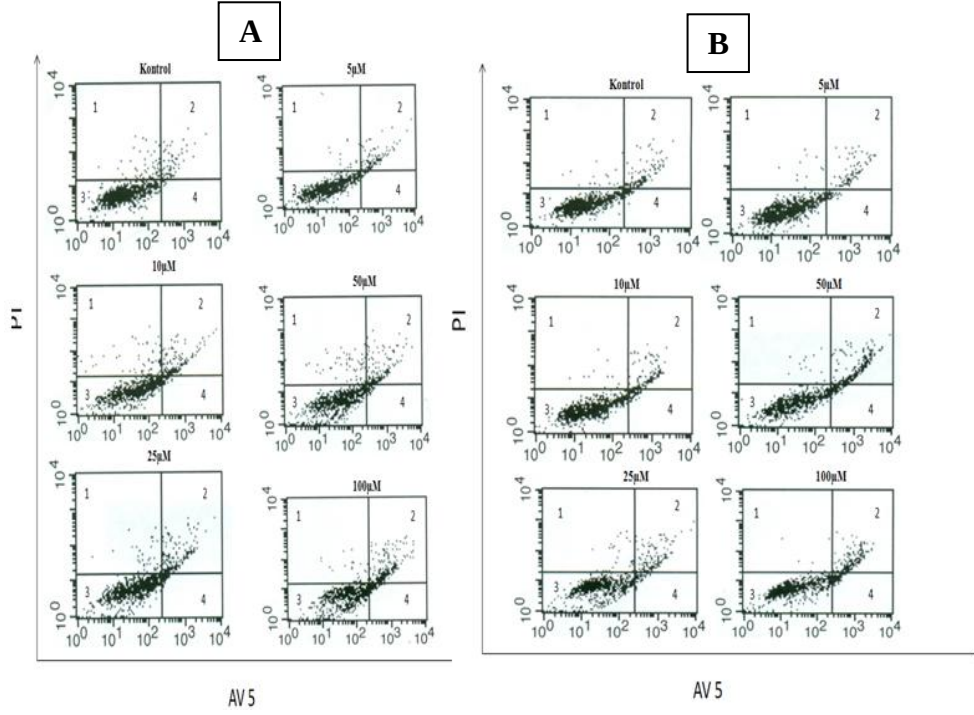
Grafik 4.15. K562 ve KD K562 hücrelerinin farklı melatonin konsantrasyonlarında ROS oluşumlarının her bir doz için karşılaştırılması.

4.1.5. Apoptotik Etkinin İncelenmesi

Flavonoitler ve melatonin ile 24 saat inkübe edilen K562 ve KD K562 hücre hatları Anneksin V (AV) ve Propidyum İyodür (PI) ile boyanarak akım sitometre cihazında okundu. 24 saat sonunda hücrelerin canlılık, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları akım sitometre cihazı tarafından oluşturulan diyagramda görüntülendi. Diyagramdan elde edilen erken apoptoz ve geç apoptoz yüzdeleri toplanarak toplam apoptotik hücre yüzdesi hesaplandı.

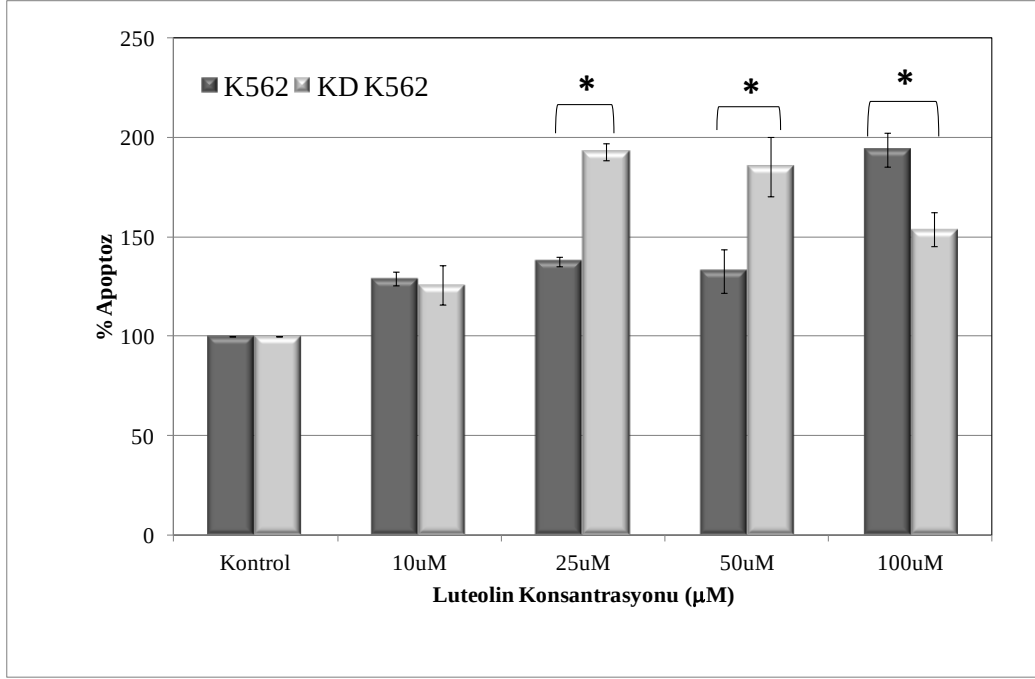
Luteolinin Apoptotik Etkisinin İncelenmesi

K562 ve KD K562 hücrelerinin artan luteolin konsantrasyonları (5, 10, 25, 50, 100 µM) ile 24 saat inkübasyonu sonrası elde edilen akım sitometre sonuçları Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Sonuçlar erken apoptotik hücre yüzdeleri ve apoptotik hücre yüzdelerinin toplanması sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre K562 hücreleri için % apoptotik hücre sayısı 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarında sırasıyla % 29, 38, 33, 94 oranında artarken, KD K562 hücrelerinde % 26, 93, 85, 54 oranında artmıştır (Grafik 4.16).



Şekil 4.4. Luteolin konsantrasyonlarının (5, 10, 25, 50, 100 μ M) A) K562 ve B) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları. 3 nolu alan canlı hücre, 4 nolu alan erken apoptotik hücre, 2 nolu alan geç apoptotik hücre ve 1 nolu alan ise nekrotik hücre sayılarını yüzde olarak belirtmektedir. Toplam apoptotik hücre yüzdesi 2. ve 4. bölgenin toplamından elde edilir.

İki hücre tipi kıyaslandığında 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlar arasında sırasıyla % 55, 52, 40 oranında anlamlı fark oluşmuştur ($p < 0,05$). Ancak 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarda KD K562 hücrelerinde luteolinin indüklediği apoptotik etki K562 hücrelerinden daha fazladır. Diğer bir ifade ile, KD K562 hücrelerinin apoptoz yüzde oranı daha fazladır. 100 μ M konsantrasyonda ise KD K652 hücrelerinde apoptoz yüzdesi K562 hücrelerinin apoptoz yüzdesinden daha düşüktür.

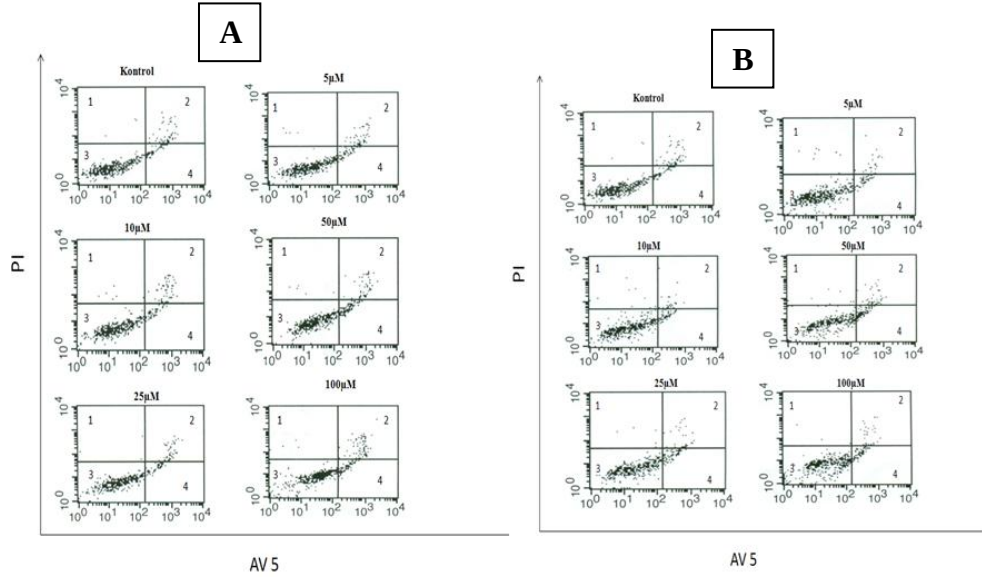


Grafik 4.16. Luteolin konsantrasyonlarının (10, 25, 50, 100 µM) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometre sonuç grafiği (Anlamlılık değeri * $p < 0,05$ 'dir. $n=3$, Ort $\pm$ STD).

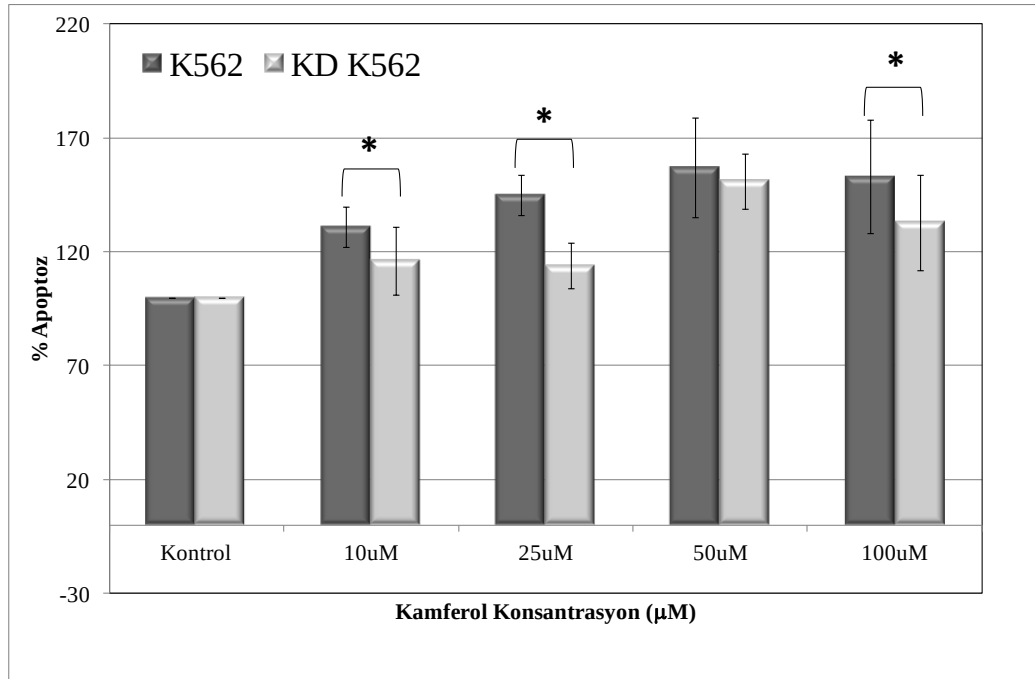
Kemferolün Apoptotik Etkisinin İncelenmesi

K562 ve KD K562 hücrelerinin artan kemferol konsantrasyonları (5, 10, 25, 50, 100 µM) ile 24 saat inkübasyonu sonrası elde edilen akım sitometre sonuçları Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Sonuçlar erken apoptotik hücre yüzdeleri ve apoptotik hücre yüzdelerinin toplanması sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre K562 hücreleri için % apoptotik hücre sayısı 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarında sırasıyla % 15, 31, 45, 57, 53 oranında artarken, KD K562 hücrelerinde % 12, 16, 14, 51, 33 oranında artmıştır (Grafik 4.17).

İki hücre tipi kıyaslandığında 10, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlar arasında sırasıyla % 15, 31, 6, 20 oranında anlamlı fark oluşmuştur ($p < 0,05$). Yalnız 50 µM konsantrasyonda iki hücre tipi arasında anlamlı fark oluşmamış, bu konsantrasyon için yakın değerler elde edilmiştir. Ancak bütün konsantrasyonlar da K562 hücrelerinde kamferolün indüklediği apoptotik etki KD K562 hücrelerinden daha fazladır.



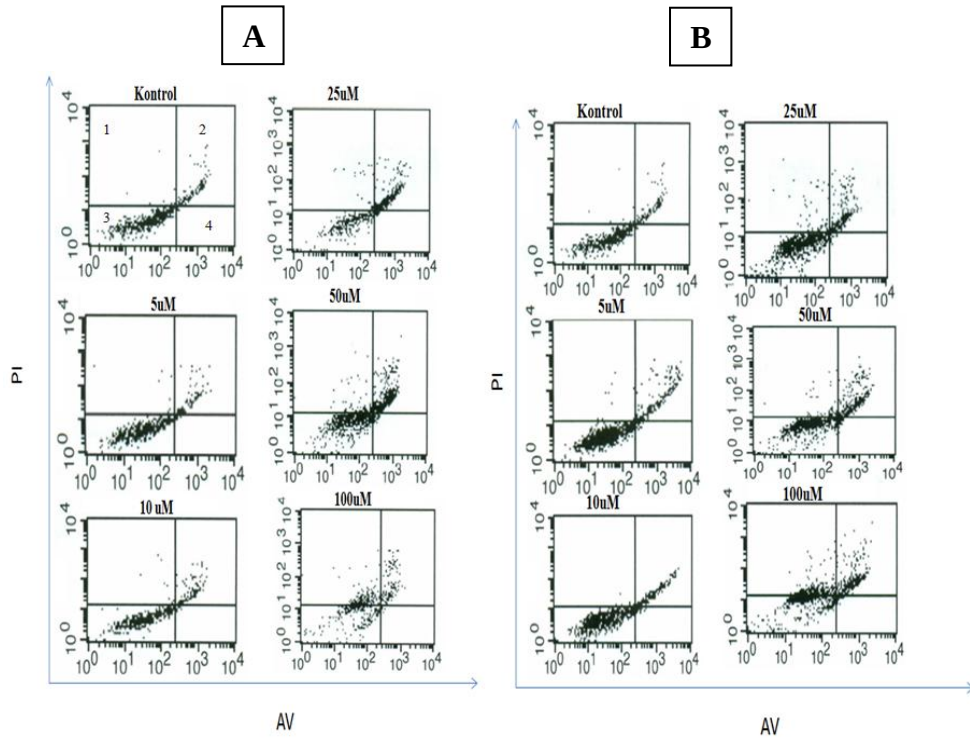
Şekil 4.5. Kamferol konsantrasyonlarının (5, 10, 25, 50, 100 μ M) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları. 3 nolu alan canlı hücre, 4 nolu alan erken apoptotik hücre, 2 nolu alan geç apoptotik hücre ve 1 nolu alan ise nekrotik hücre sayılarını yüzde olarak belirtmektedir. Toplam apoptotik hücre yüzdesi 2. ve 4. bölgenin toplamından elde edilir.



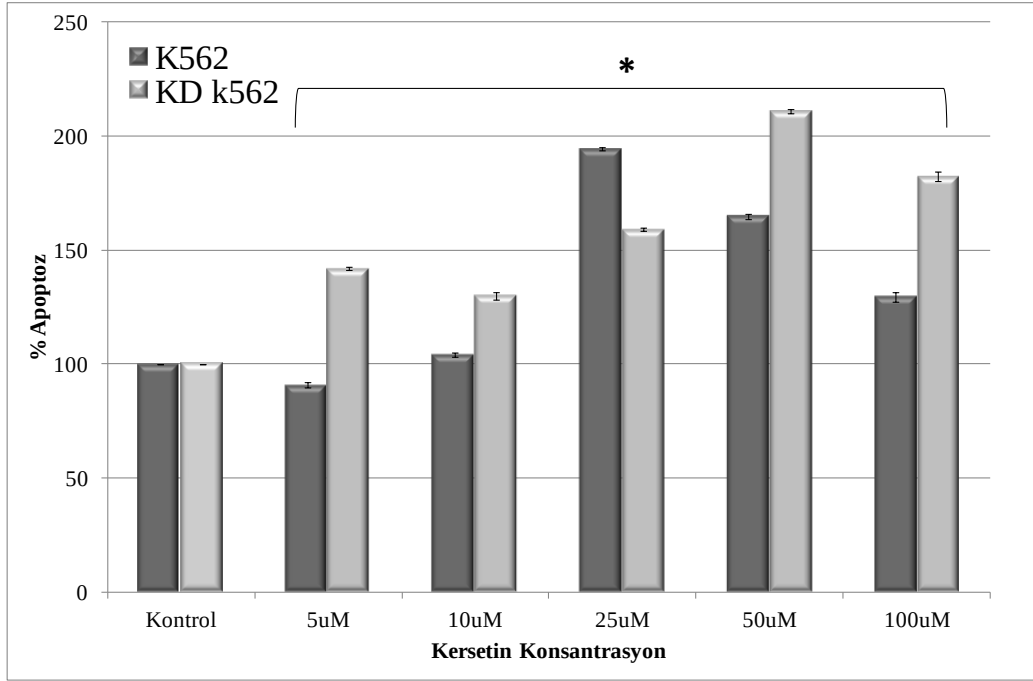
Grafik 4.17. Kemferol konsantrasyonlarının (10, 25, 50, 100 μ M) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometre sonuç grafiği (Anlamlılık değeri *p<0,05'dir. n=3, Ort±STD).

Kersetinin Apoptotik Etkisinin İncelenmesi

K562 ve KD K562 hücrelerinin artan kersetin konsantrasyonları (5, 10, 25, 50, 100 μM) ile 24 saat inkübasyonu sonrası elde edilen akım sitometre sonuçları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Sonuçlar erken apoptotik hücre yüzdeleri ve apoptotik hücre yüzdelerinin toplanması sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre K562 hücreleri için % apoptotik hücre sayısı 5 μM için % 10 oranında azalmışken, 10, 25, 50, 100 μM konsantrasyonlarında sırasıyla % 4, 94, 64, 29 oranında artarken, KD K562 hücrelerinde % 41, 30, 59, 111, 82 oranında artmıştır (Grafik 4.18).



Şekil 4.6. Kersetin konsantrasyonlarının (5, 10, 25, 50, 100 μM) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları. 3 nolu alan canlı hücre, 4 nolu alan erken apoptotik hücre, 2 nolu alan geç apoptotik hücre ve 1 nolu alan ise nekrotik hücre sayılarını yüzde olarak belirtmektedir. Toplam apoptotik hücre yüzdesi 2. ve 4. bölgenin toplamından elde edilir.



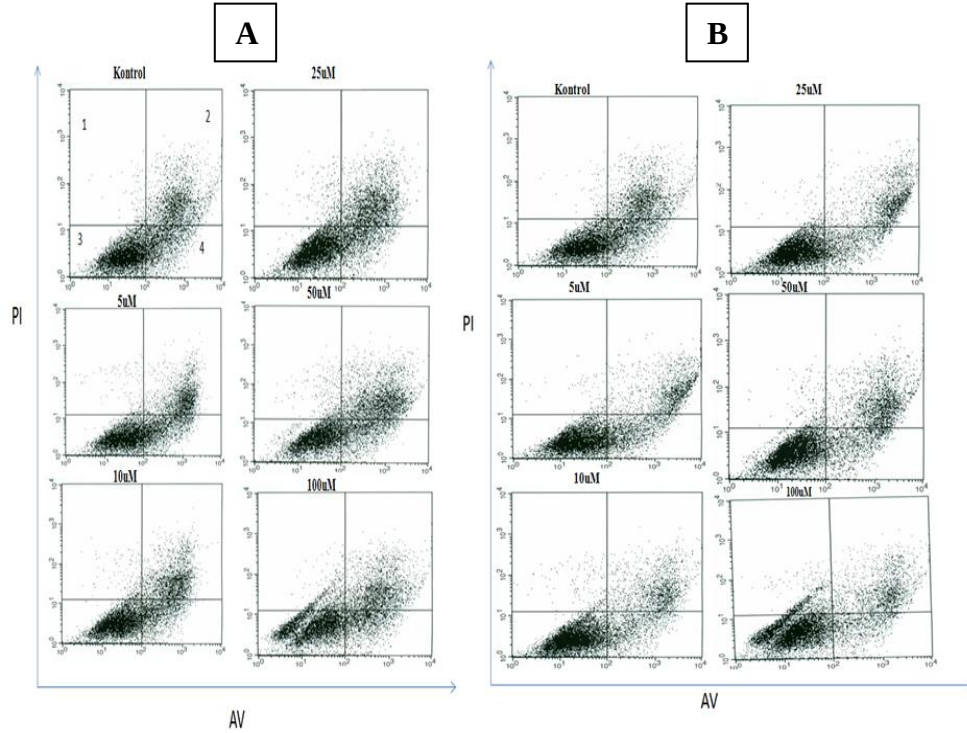
Grafik 4.18. Kersetin konsantrasyonlarının (10, 25, 50, 100 μ M) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometre sonuç grafiği (Anlamlılık değeri $*p<0,05$ 'dir. $n=3$, Ort $\pm$ STD).

İki hücre tipi içinde apoptoz tetiklenmiştir. İki hücre kıyaslandığında NQO2 içermeyen KD K562 hücrelerinde 5, 10, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlar da daha fazla apoptotik etki görülmüş iki hücre arasında sırasıyla % 51, 26, 47, 53 oranında anlamlı fark oluşmuştur ($p<0,05$). Ancak 25 μ M konsantrasyonlarda K562 hücrelerinde kersetinin indüklediği apoptotik etki KD K562 hücrelerinden %35 oranında daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre KD K562 hücrelerinin apoptoz yüzde oranı daha fazladır. 25 μ M konsantrasyonda ise KD K652 hücrelerinde apoptoz yüzdesi K562 hücrelerinin apoptoz yüzdesinden daha düşüktür.

Apigeninin Apoptotik Etkisinin İncelenmesi:

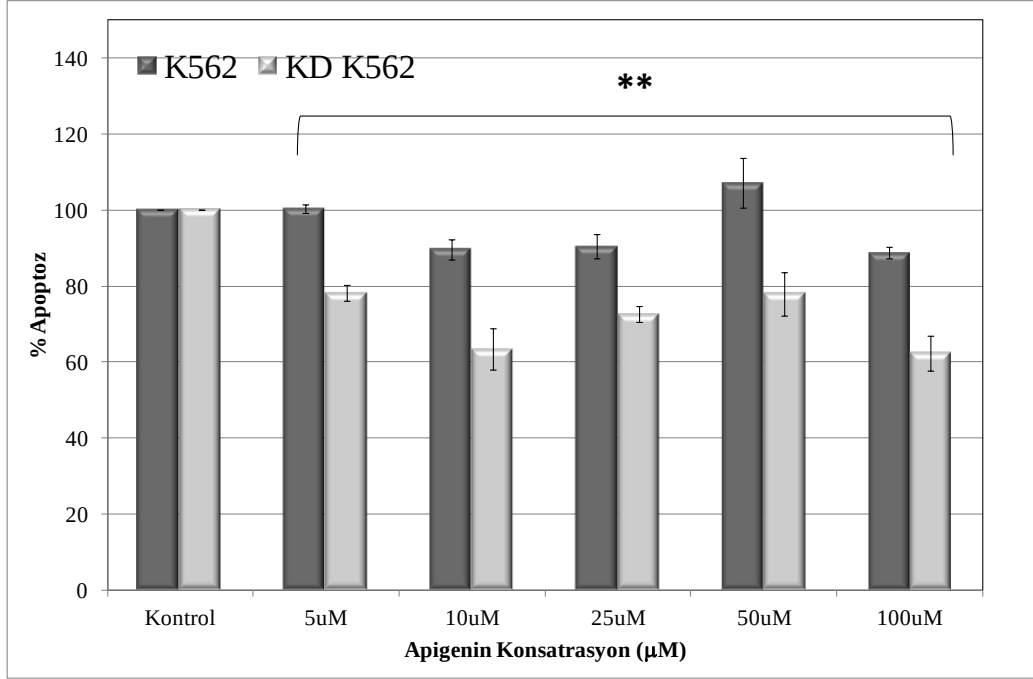
K562 ve KD K562 hücrelerinin artan kamferol konsantrasyonları (5, 10, 25, 50, 100 μ M) ile 24 saat inkübasyonu sonrası elde edilen akım sitometre sonuçları Şekil.....'de gösterilmiştir. Sonuçlar erken apoptotik hücre yüzdeleri ve apoptotik hücre yüzdelерinin toplanması sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre K562 hücreleri için % apoptotik hücre

sayısı 10, 25, 50, 100 μM konsantrasyonlarında sırasıyla % 15, 31, 45, 57, 53 oranında artarken, KD K562 hücrelerinde % 12, 16, 14, 51, 33 oranında artmıştır (Grafik...).



Şekil 4.7. Apigenin konsantrasyonlarının (5, 10, 25, 50, 100 μM) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları. 3 nolu alan canlı hücre, 4 nolu alan erken apoptotik hücre, 2 nolu alan geç apoptotik hücre ve 1 nolu alan ise nekrotik hücre sayılarını yüzde olarak belirtmektedir. Toplam apoptotik hücre yüzdesi 2. ve 4. bölgenin toplamından elde edilir.

İki hücre tipi kıyaslandığında 5, 10, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlar arasında sırasıyla % 22, 26, 17, 29, 26 oranında anlamlı fark oluşmuştur ($p < 0,001$). Ancak bütün konsantrasyonlar için iki hücre tipinde de apigenin antiapoptotik etki oluşturmuştur. KD K562 hücrelerinde antiapoptotik etki daha kuvvetliken sadece 50 μM konsantrasyon için K562 hücrelerinde apoptotik etki tespit edilmiştir.

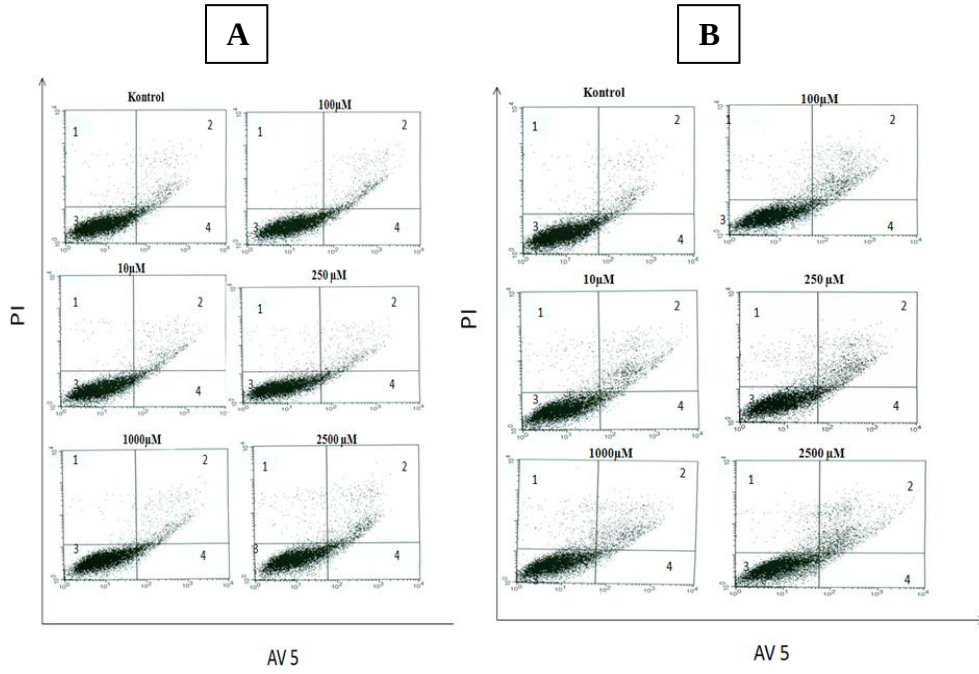


Grafik 4.19. Apigenin konsantrasyonlarının (5, 10, 25, 50, 100 µM) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometre sonuç grafiği (Anlamlılık değeri $**p<0,001$ 'dir. $n=3$, Ort±STD).

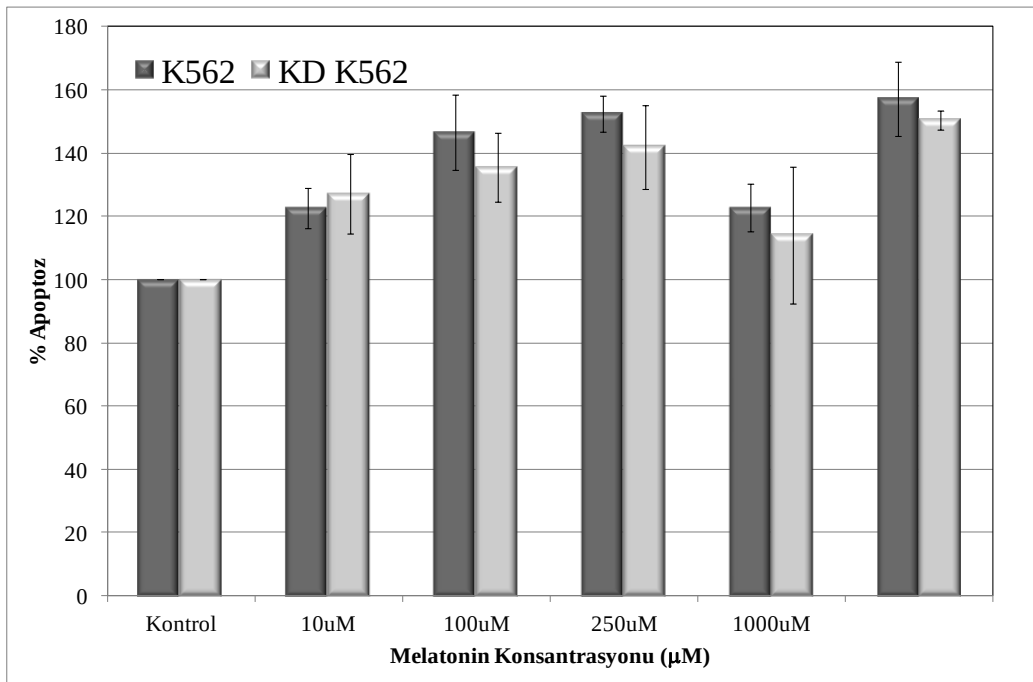
Melatoninin Apoptotik Etkisinin İncelenmesi

K562 ve KD K562 hücrelerinin artan melatonin konsantrasyonları (5, 10, 100, 250, 1000, 2500 µM) ile 24 saat inkübasyonu sonrası elde edilen akım sitometre sonuçları Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Sonuçlar erken apoptotik hücre yüzdeleri ve apoptotik hücre yüzdelerinin toplanması sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre K562 hücreleri için % apoptotik hücre sayısı 10, 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarında sırasıyla % 23, 47, 53, 23, 57 oranında artarken, KD K562 hücrelerinde % 27, 35, 42, 14, 50 oranında artmıştır (Grafik 4.20).

İki hücre tipi kıyaslandığında K562 hücrelerinde bir miktar daha yüksek apoptotik etki görülmüş, konsantrasyonlar arasında sırasıyla % 4, 11, 10, 9, 7 oranında fark bulunmuştur. Fakat iki hücre iki hücre arasında oluşan bu farklar anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.8. Melatonin konsantrasyonlarının (10, 100, 250, 1000, 2500 µM) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometri sonuçları. 3 nolu alan canlı hücre, 4 nolu alan erken apoptotik hücre, 2 nolu alan geç apoptotik hücre ve 1 nolu alan ise nekrotik hücre sayılarını yüzde olarak belirtmektedir. Toplam apoptotik hücre yüzdesi 2. ve 4. bölgenin toplamından elde edilir.



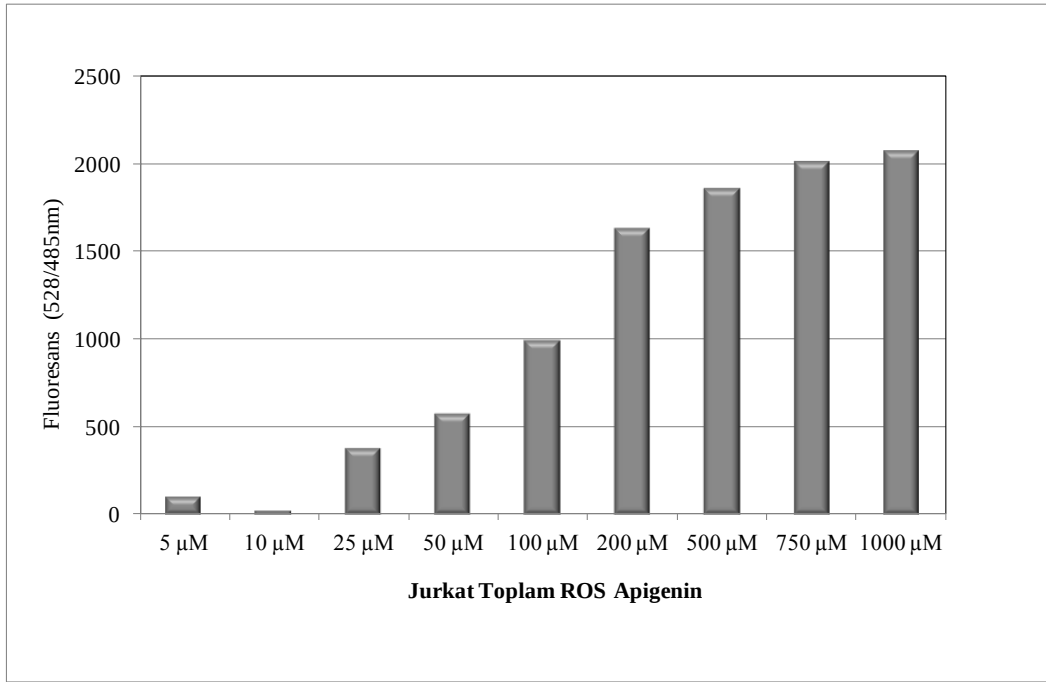
Grafik 4.20. Melatonin konsantrasyonlarının (10, 100, 250, 1000, 2500 µM) a) K562 ve b) KD K562 hücreleri ile 24 saat inkübasyonu sonrası gözlenen akım sitometre sonuç grafiği (Anlamlılık değeri * $p < 0,05$ 'dir. $n = 3$, Ort $\pm$ STD).

4.2. JURKAT, MCF7 VE HEPG2 HÜZRELERİ İLE YAPILAN DENEYLER

4.2.1. Toplam ROS Deneyleri

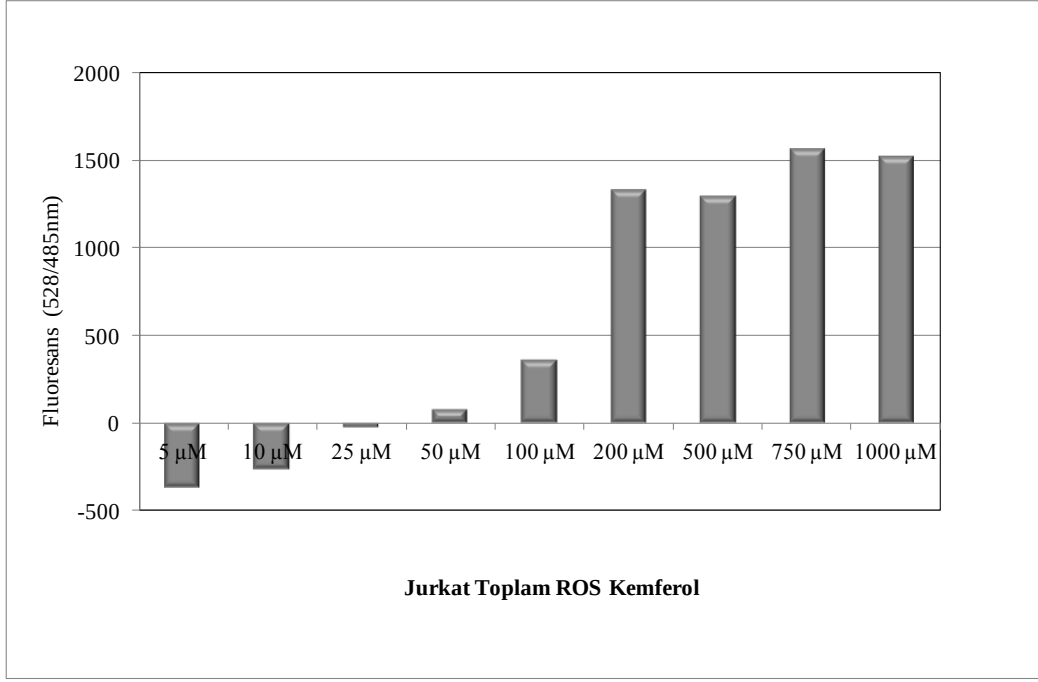
Jurkat Toplam ROS

Apigenin'in IC₅₀ değeri yapılan MTT deneyi sonucunda 140 µM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında apigeninin toplam ROS miktarını 100-500 µM dozda arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.21).

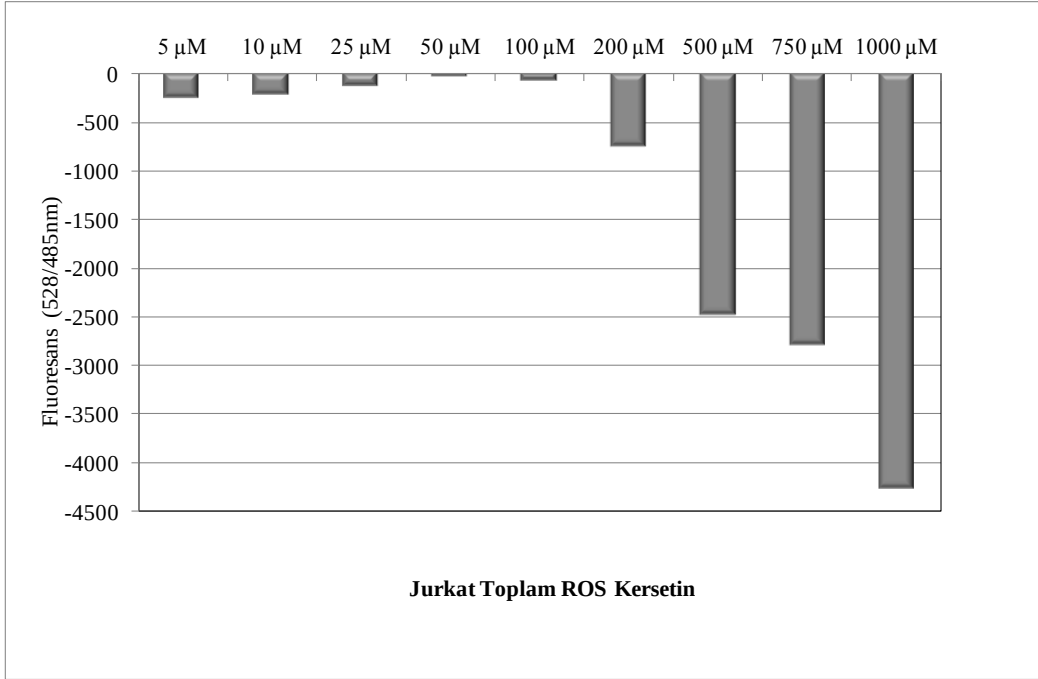


Grafik 4.21. Jurkat hücre serisinde apigeninin toplam ROS değerleri

Kemferol'ün IC₅₀ değeri yapılan MTT deneyi sonucunda 40 mM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında kemferolün toplam ROS miktarını 100-500 µM dozda arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.22).

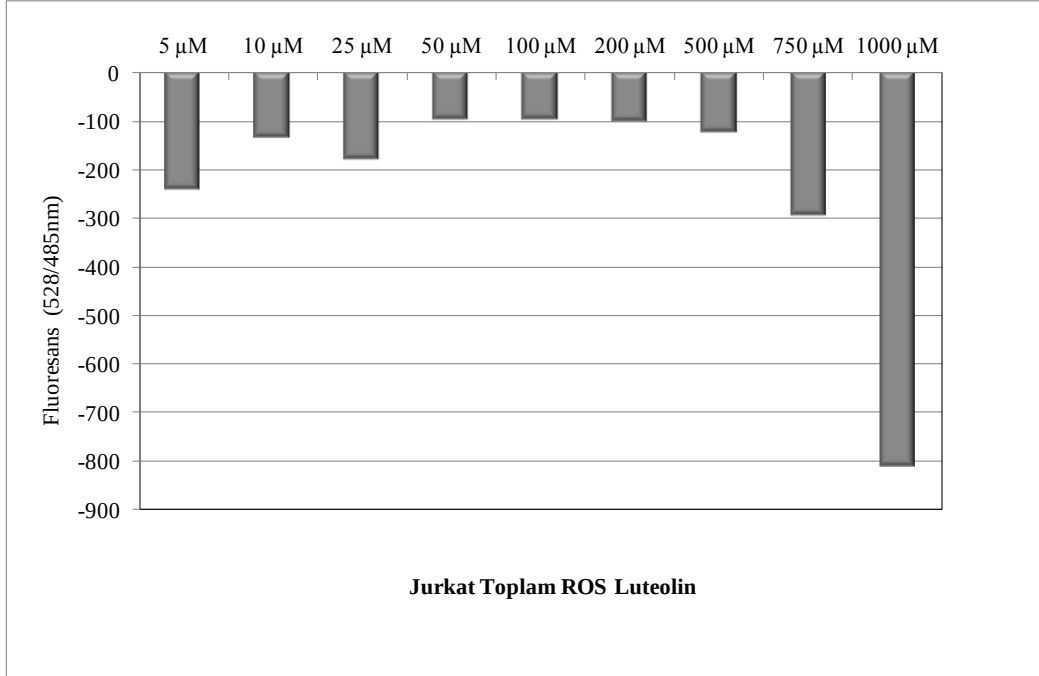


Grafik 4.22. Jurkat hücre serisinde kemferolün toplam ROS değeri



Grafik 4.23. Jurkat hücre serisinde kersetinin toplam ROS değeri

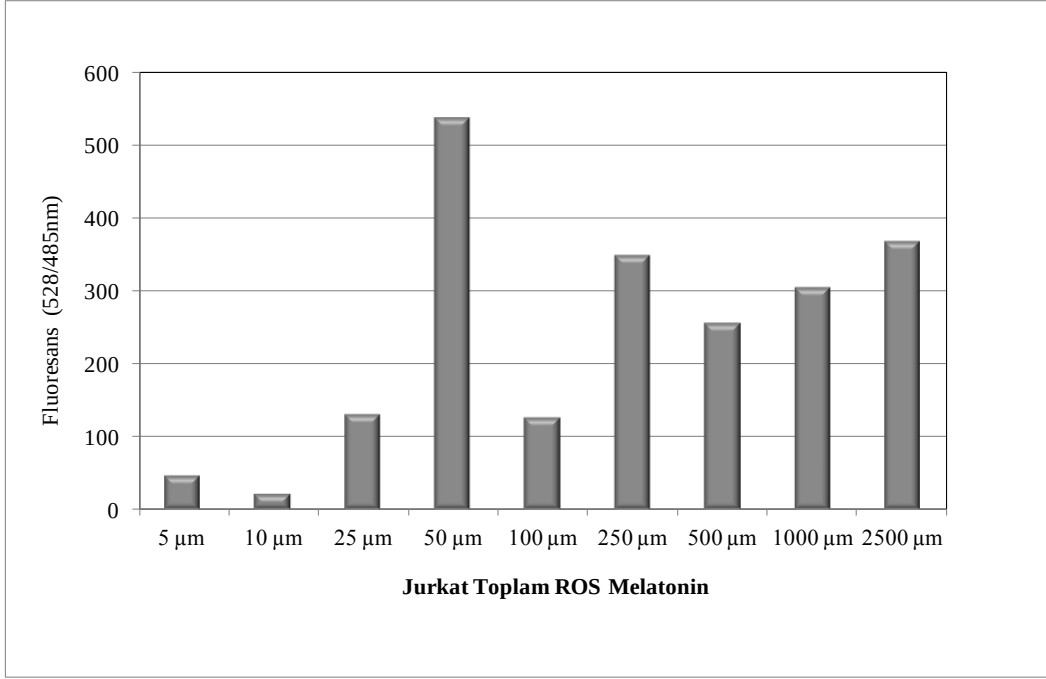
Kersetin’de IC₅₀ değeri yapılan MTT deneyi sonucunda 10 µM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında kersetinin toplam ROS miktarını doza bağlı olarak azalttığı görülmüştür (Grafik 4.23).



Grafik 4.24. Jurkat hücre serisinde luteolinin toplam ROS değerleri

Luteolin’in IC₅₀ değeri yapılan MTT deneyi sonucunda 50 µM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında luteolinin toplam ROS miktarını doza bağlı olarak azalttığı görülmüştür (Grafik 4.24).

Melatonin’in yapılan MTT deneyi sonucunda IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır. Bu nedenle çalışmalarda grafikte görüldüğü gibi 5-2500 µM geniş bir konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Melatoninin bu aralıkta toplam ROS miktarını arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.25).

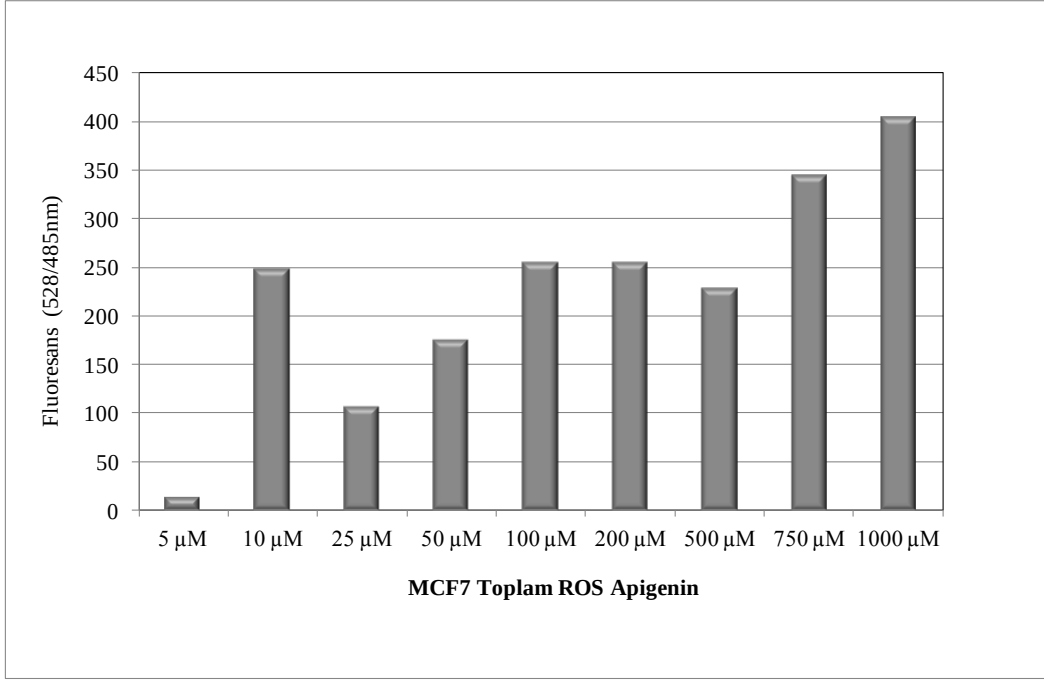


Grafik 4.25. Jurkat hücre serisinde meletoninin toplam ROS değerleri

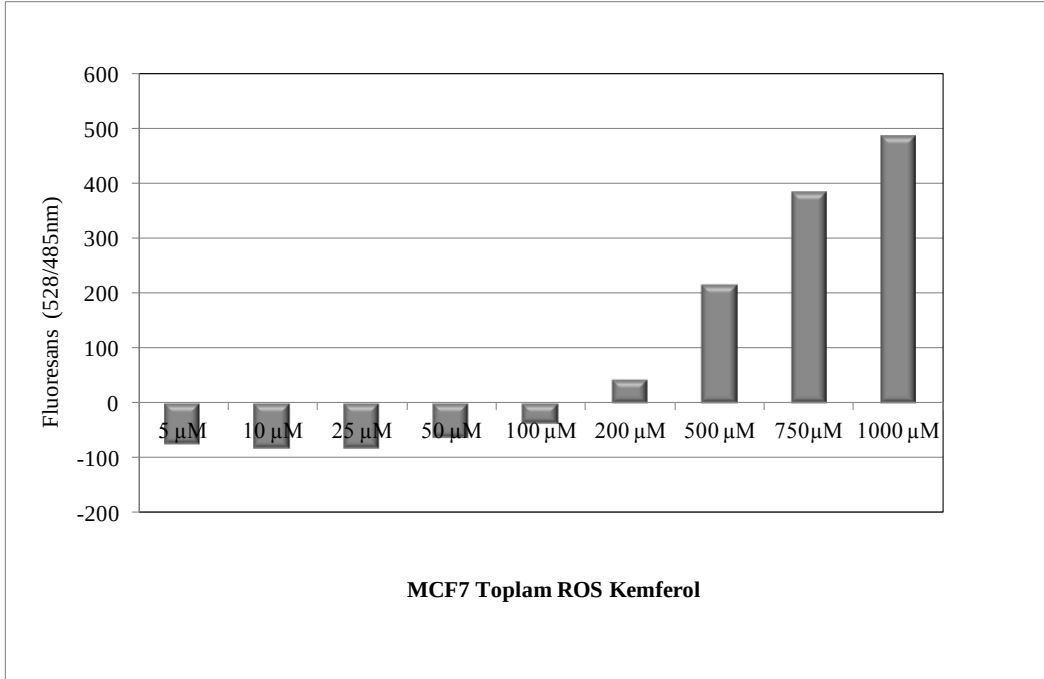
MCF7 Toplam ROS

Apigenin'in IC_{50} değeri, yapılan MTT deneyi sonucunda 50 mM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında Apigeninin toplam ROS miktarını doza bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.26).

Kemferol'ün IC_{50} değeri yapılan MTT deneyi sonucunda 100 mM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında kemferolün toplam ROS miktarını 5-100 mM dozda azalttığı, 100 mM dan itibaren doza bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.27).

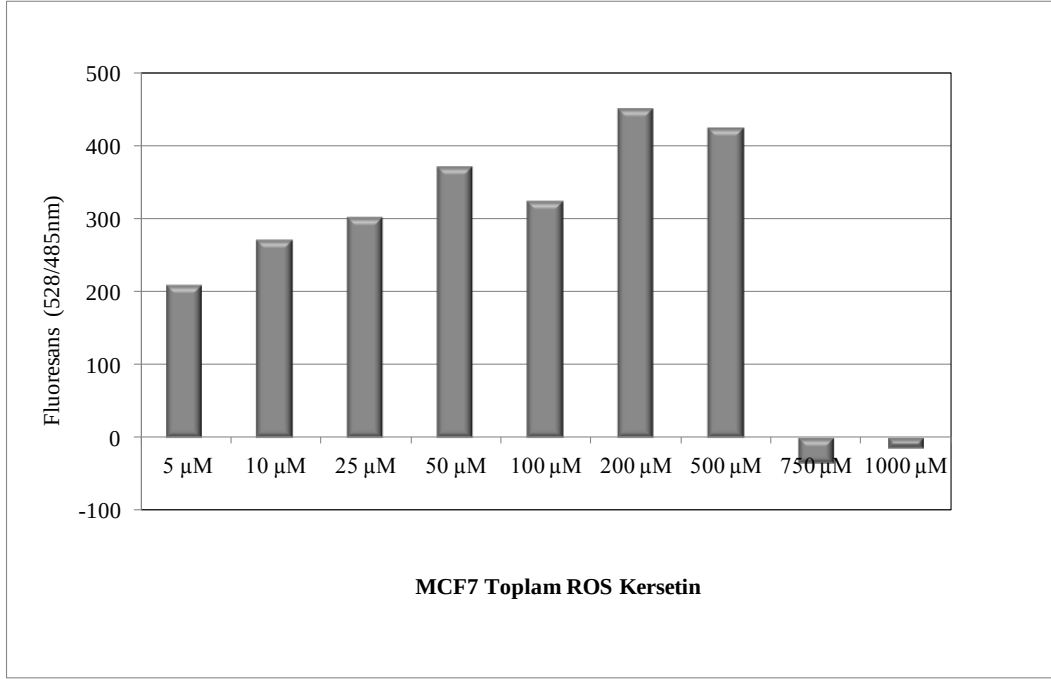


Grafik 4.26. MCF7 hücre serisinde apigeninin toplam ROS değerleri



Grafik 4.27. MCF7 hücre serisinde kemferolün toplam ROS değerleri

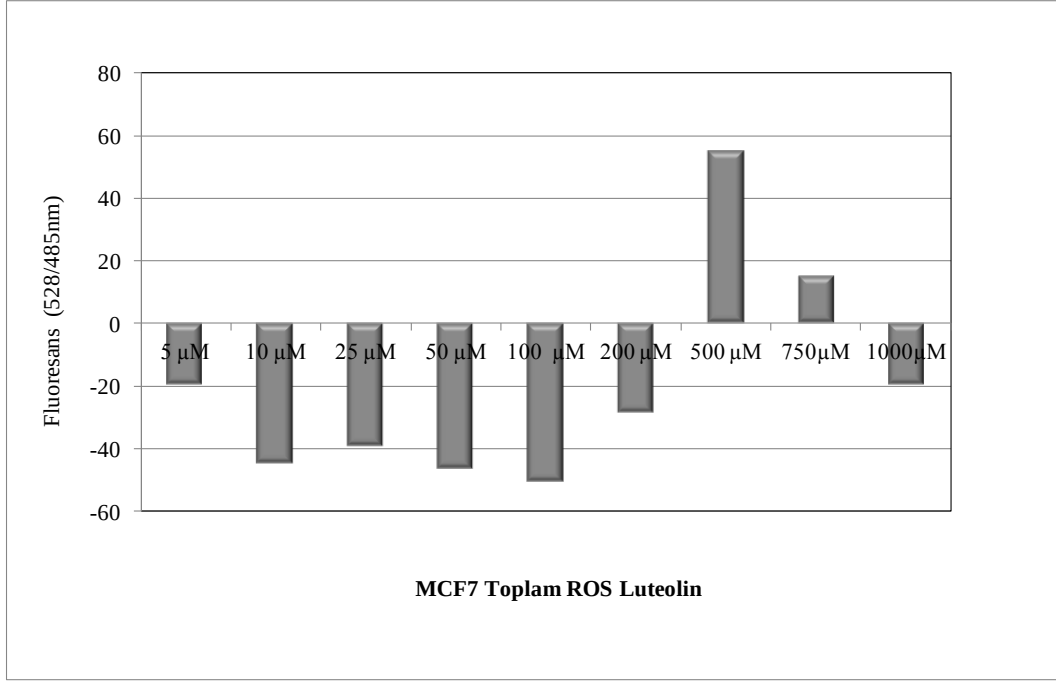
Kersetin'in IC_{50} değeri yapılan MTT deneyi sonucunda 60 mM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında kersetinin toplam ROS miktarını 5-500 mM dozda arttırdığı, 500 mM dan itibaren ise azalttığı görülmüştür (Grafik 4.28).



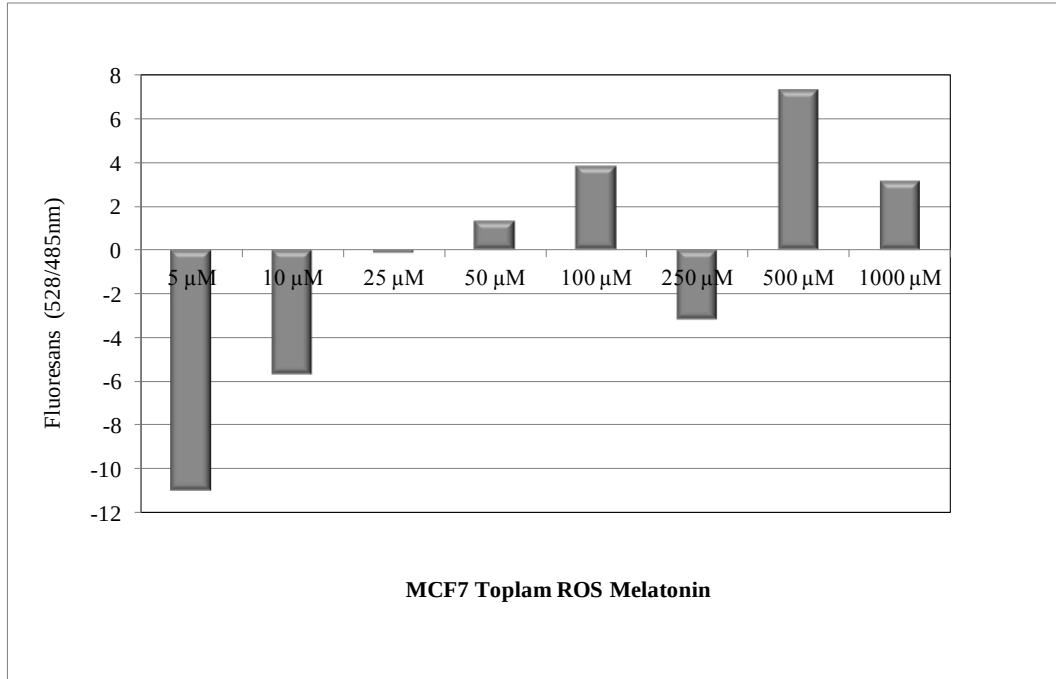
Grafik 4.28. MCF7 hücre serisinde kersetinin toplam ROS değerleri

Luteolin'in IC_{50} değeri yapılan MTT deneyi sonucunda 60 mM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında luteolinin toplam ROS miktarını 5-200 mM dozda azalttığı, 200 mM dan itibaren doza bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.29).

Melatonin'in IC_{50} değeri yapılan MTT deneyi sonucunda 50 mM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında melatoninin toplam ROS miktarını 5-50 mM dozda azalttığı, 50 mM dan itibaren doza bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.30).

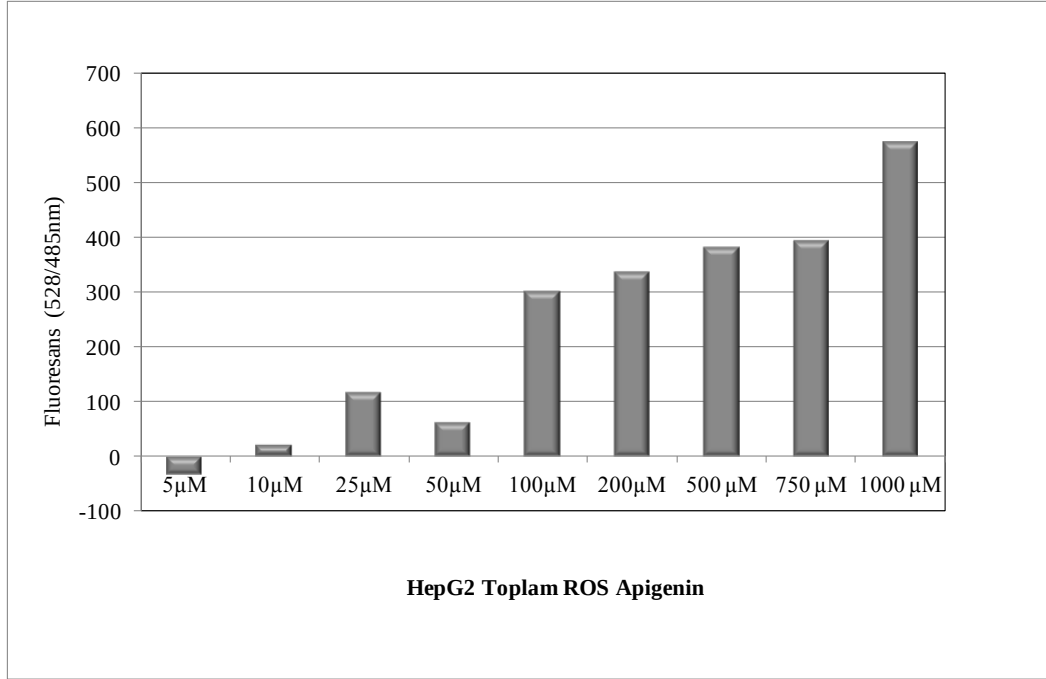


Grafik 4.29. MCF7 hücre serisinde luteolinin toplam ROS değerleri



Grafik 4.30. MCF7 hücre serisinde melatoninin toplam ROS değerleri

HepG2 Toplam ROS

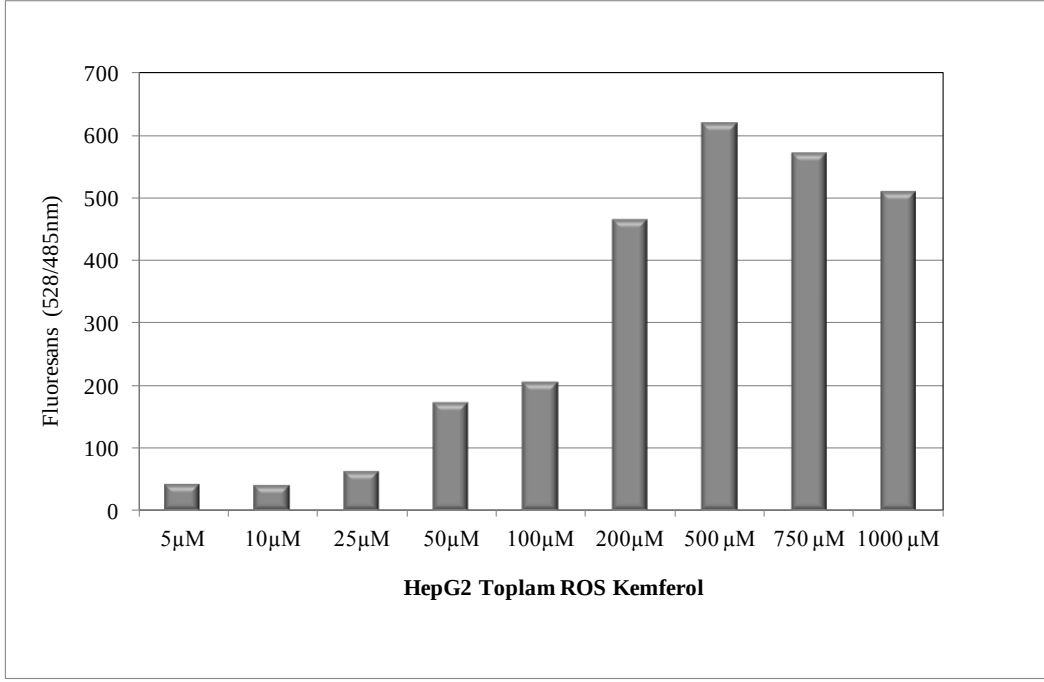


Grafik 4.31. HepG2 hücre serisinde apigeninin toplam ROS değerleri

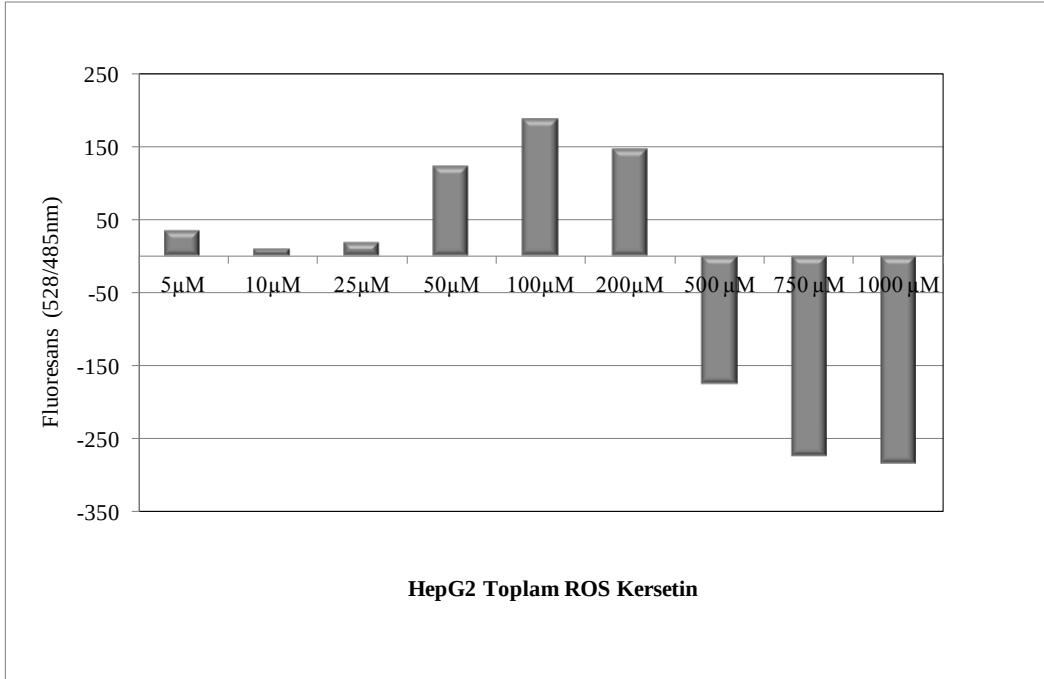
Apigenin'in IC_{50} değeri, yapılan MTT deneyi sonucunda 50 mM olarak bulunmuştur. Apigeninin toplam ROS miktarını doza bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.31).

Kemferol'ün IC_{50} değeri, yapılan MTT deneyi sonucunda 400 mM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında Kemferolün toplam ROS miktarını doza bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.32).

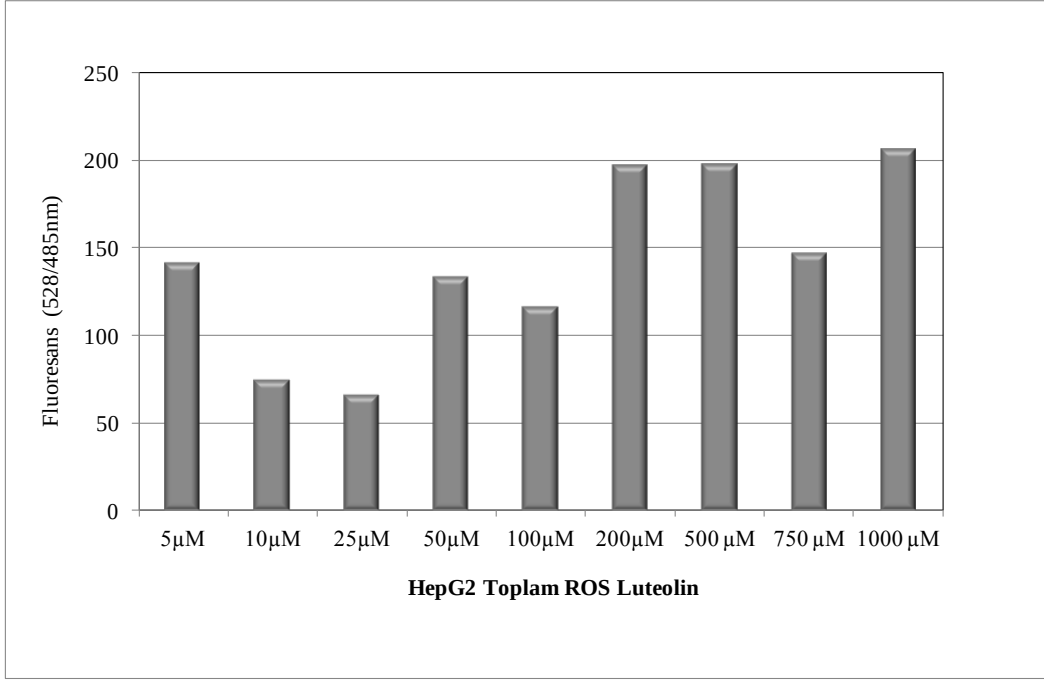
Kersetinin IC_{50} değeri yapılan MTT deneyi sonucunda 50 mM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında kersetinin toplam ROS miktarını 5-200 mM dozda artırdığı, 500 mM dan itibaren doza bağımlı olarak azalttığı görülmüştür. Kersetin HEPG2 hücrelerinde düşük dozlarda prooksidan yüksek dozlarda antioksidan etkinliğe sahiptir (Grafik 4.33).



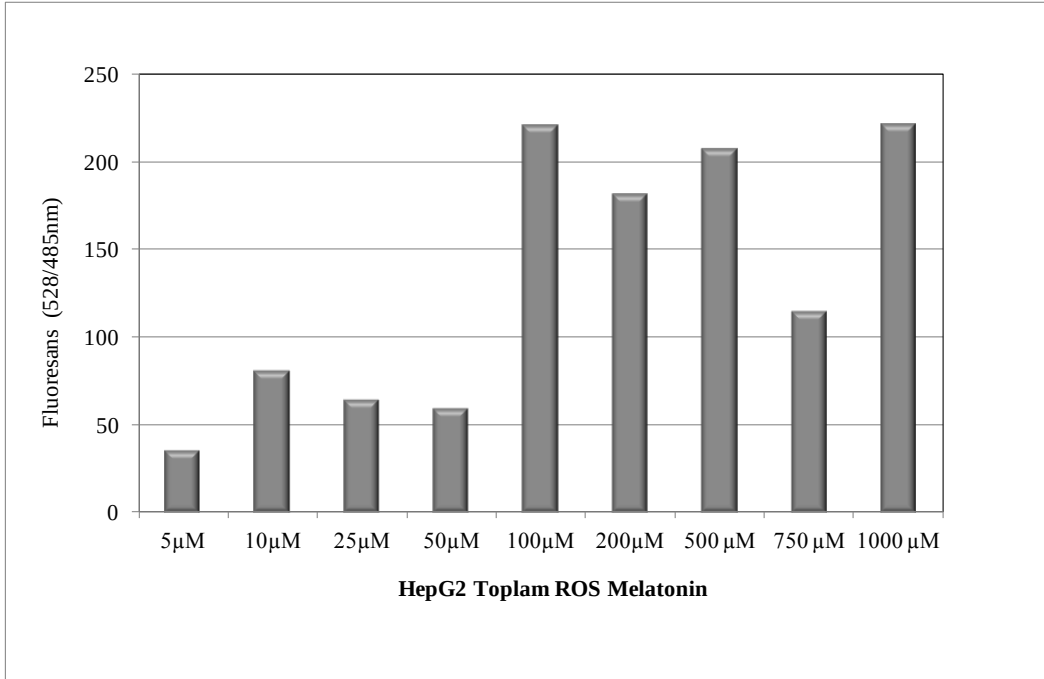
Grafik 4.32. HepG2 hücre serisinde kemferolün toplam ROS değerleri



Grafik 4.33. HepG2 hücre serisinde kersetinin toplam ROS değerleri



Grafik 4.34. HepG2 hücre serisinde luteolinin toplam ROS değerleri



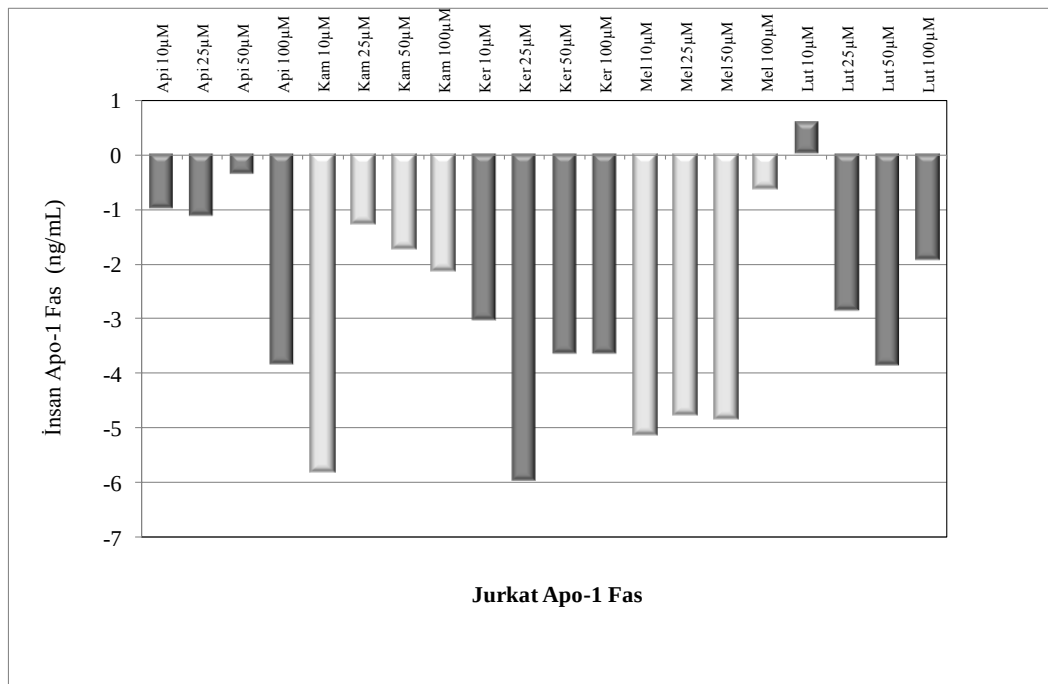
Grafik 4.35. HepG2 hücre serisinde melatoninin toplam ROS değerleri

Luteolin'in IC_{50} değeri, yapılan MTT deneyi sonucunda 75mM olarak bulunmuştur. Bu konsantrasyon dikkate alındığında Luteolin'in toplam ROS miktarını doza bağımlı olarak arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.34).

Melatonin'in IC_{50} değeri, yapılan MTT deneyi sonucunda 750 mM olarak bulunmuştur. Melatoninin toplam ROS miktarını arttırdığı görülmüştür (Grafik 4.35).

4.2.2. APO-1/FAS/CD95 Yolağı Deneyleri

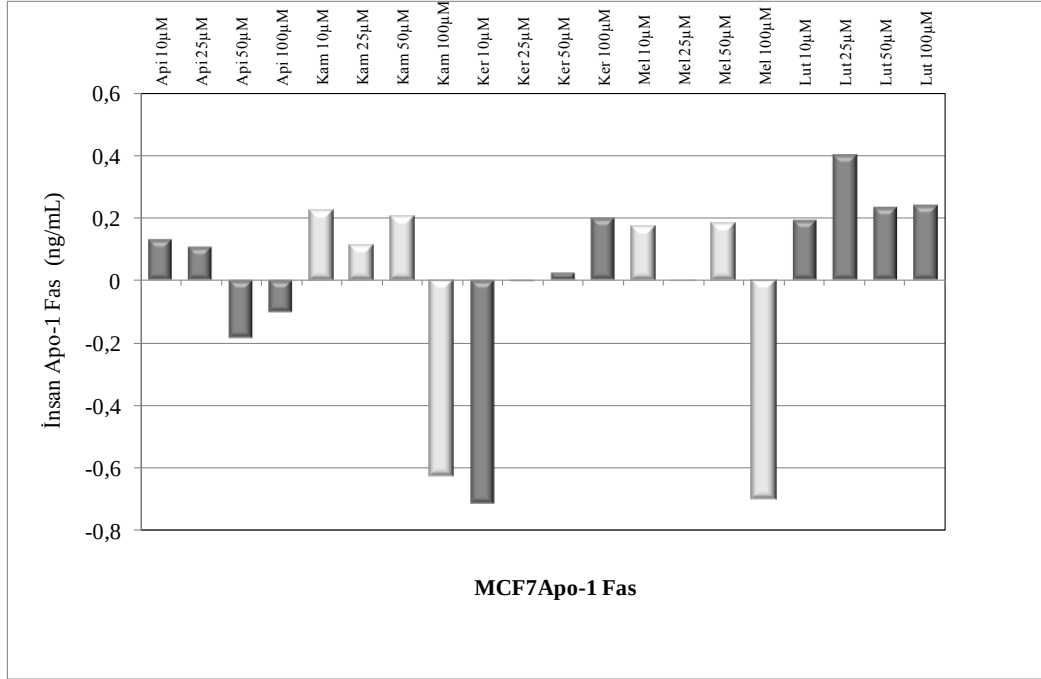
Jurkat APO-1/FAS/CD95 Yolağı Deneyleri



Grafik 4.36. Jurkat hücre serisinde insan APO-1/Fas/CD95 yolağının inhibisyonuna ait değerleri

Jurkat hücrelerinde Apo-1/Fas/CD95 yolağına ait yapılan ölçümlerde çalışılan tüm maddelerin apoptozu azalttığı belirlenmiştir. Kemferol 10 mM da ve kersetin ise 25 mM da en yüksek anti-apoptotik etkinliğe sahiptir. Çalışılan maddeler ve dozlar arasında bu hücre serisinde sadece luteolinin 10 mM dozda apoptozu arttırdığı gözlenmiştir (Grafik 4.36).

MCF7 APO-1/FAS/CD95 Yolağı Deneyleri

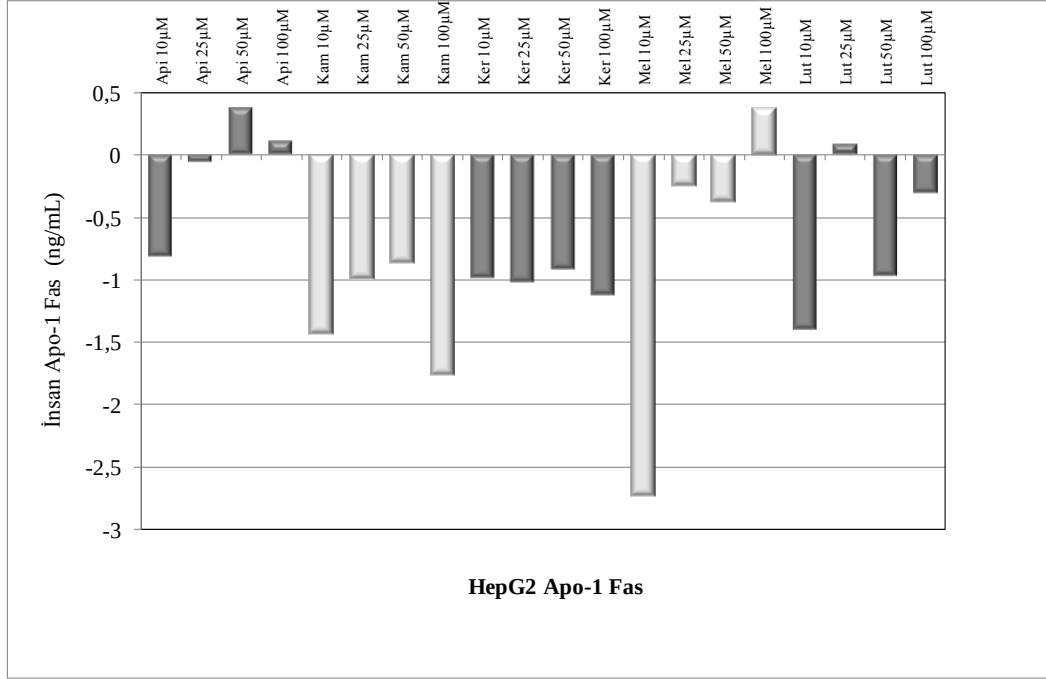


Grafik 4.37. MCF7 hücre serisinde insan APO-1/Fas/CD95 yolağının inhibisyonuna ait değerleri

MCF7 hücrelerinde gerçekleştirilen Apo-1/Fas/CD95 yolağına ait yapılan ölçümlerde luteolin tüm denenen dozlarda, apigenin, kemferol ve melatonin düşük dozlarda, kersetin ise yüksek dozlarda apoptozu tetiklemiştir (Grafik 4.37).

HEPG2 APO-1/FAS/CD95 Yolağı Deneyleri

HepG2 hücrelerinde Apo-1/Fas/CD95 yolağına ait yapılan ölçümlerde Kemferol, kersetin ve luteolinin tüm dozlarda apoptozu azalttığı belirlenmiştir. Apigeninin ise 50 ve 100 mM dozlarda ve melatoninin ise 100 mM dozda apoptozu arttırdığı gözlenmiştir. Bu hücre serisinde melatonin 10 mM dozda en etkili anti-apoptotik madde olarak tespit edilmiştir (Grafik 4.38).

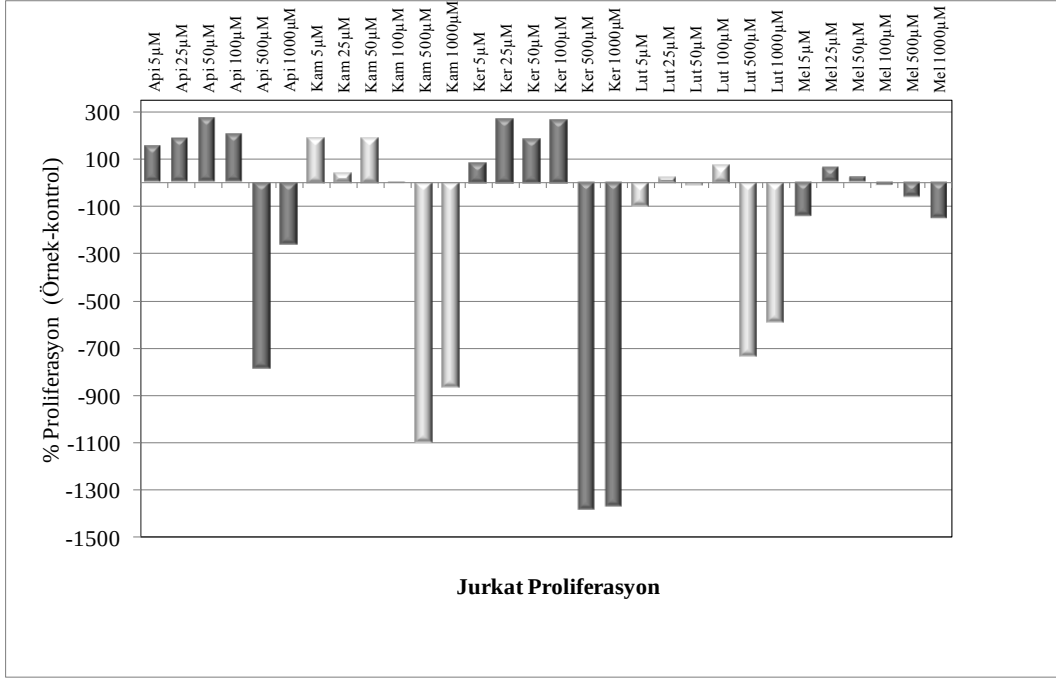


Grafik 4.38. HepG2 hücre serisinde insan APO-1/Fas/CD95 yolağının inhibisyonuna ait değerleri

4.2.3. Hücre Çoğalmasına ait Deneyler

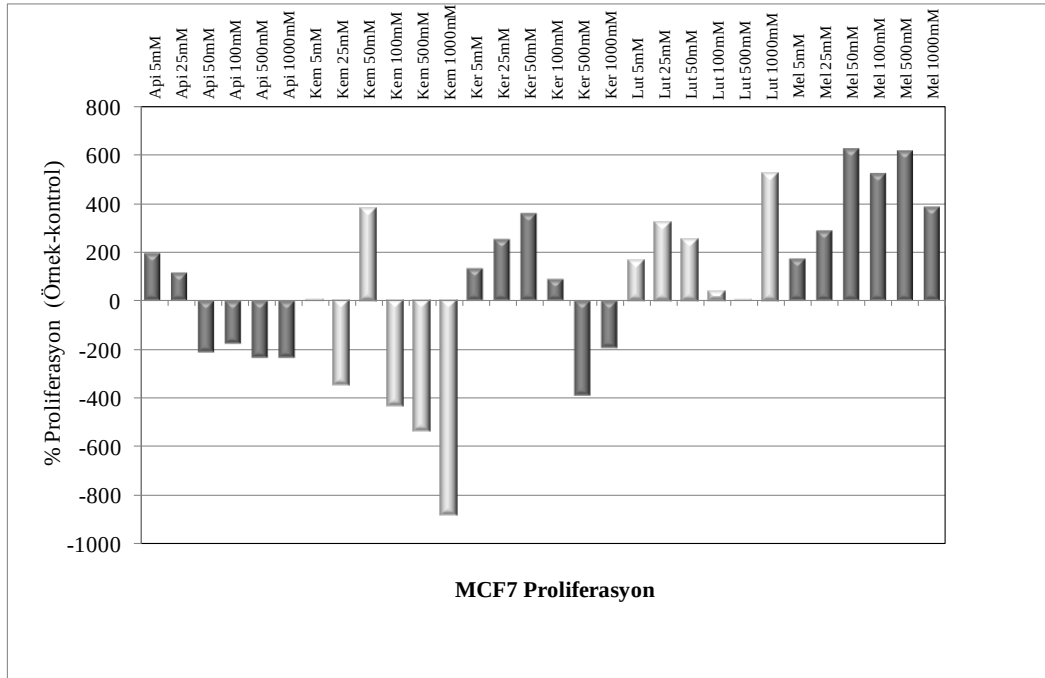
Jurkat Hücre Çoğalması Deneyleri

Jurkat hücrelerinde hücre çoğalması üzerine yapılan deneylerde genel olarak tüm maddelerin düşük dozlarında çoğalmayı arttırdığı yüksek dozlarda ise azalttığı belirlenmiştir. En etkili madde olarak kersetin (500 ve 1000 mM) ve kemferol (500 ve 1000 mM) bulunmuştur (Grafik 4.39).



Grafik 4.39. Jurkat hücre serisinde hücre çoğalmasına ait değerleri

MCF7 Hücre Çoğalması Deneyleri

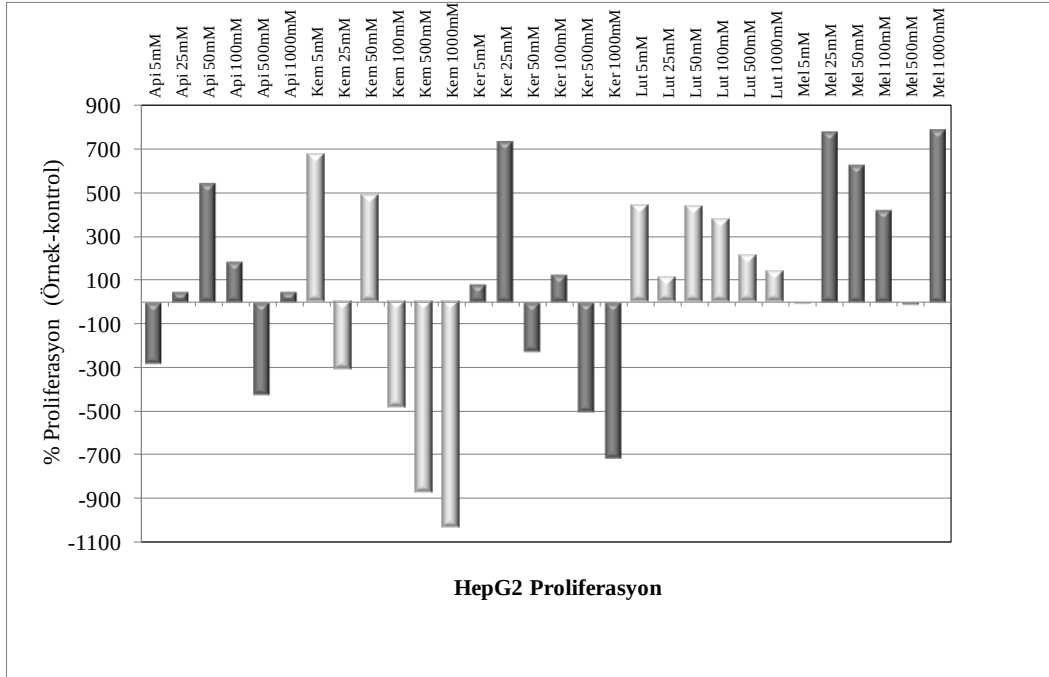


Grafik 4.40. MCF7 hücre serisinde hücre çoğalmasına ait değerleri

MCF7 hücrelerinde hücre çoğalması üzerine yapılan deneylerde luteolin ve melatoninin denenen tüm dozlarda çoğalmayı arttırdığı belirlenmiştir. Apigenin ve kersetin düşük dozlarda çoğalmayı arttırmış yüksek dozlarda ise azaltmıştır. En etkili madde olarak kemferol bulunmuştur (Grafik 4.40).

HEPG2 Hücre Çoğalması Deneyleri

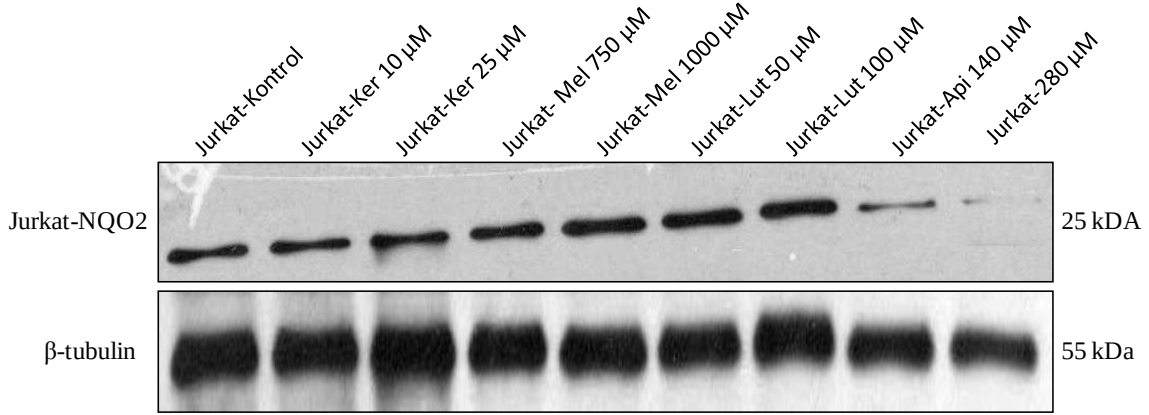
HepG2 hücrelerinde hücre çoğalması üzerine yapılan deneylerde luteolin ve melatoninin denenen tüm dozlarda çoğalmayı arttırdığı belirlenmiştir. Çoğalmayı durdurmak açısından en etkili madde olarak kemferol (100 - 1000 mM) ve kersetin (500-1000 mM) bulunmuştur (Grafik 4.41).



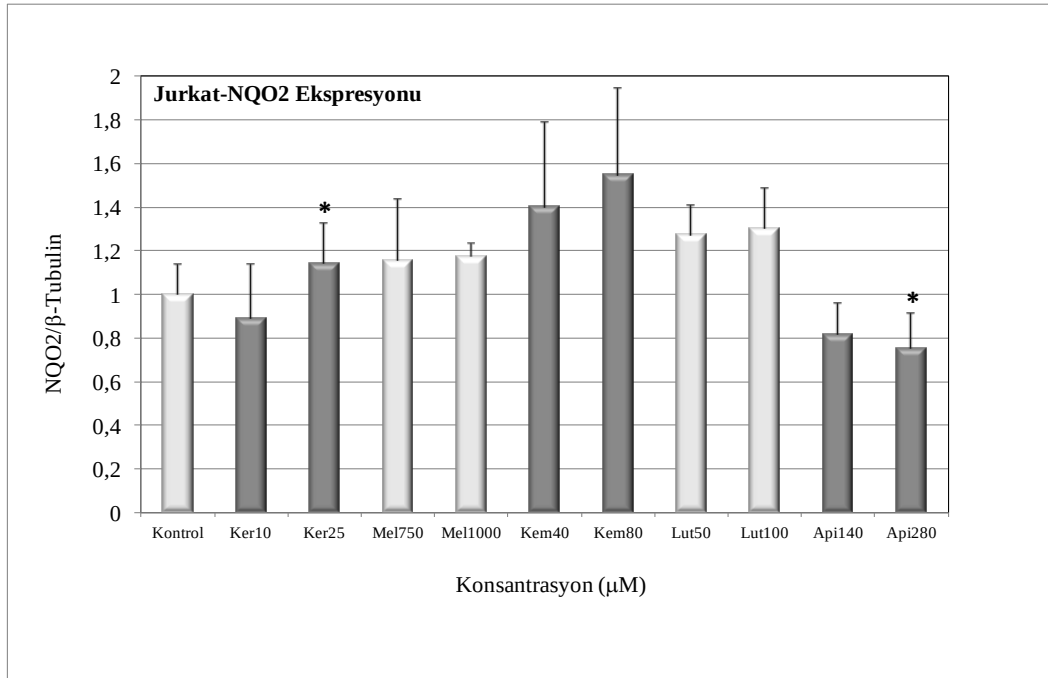
Grafik 4.41. HepG2 hücre serisinde hücre çoğalmasına ait değerleri

4.2.4. NQO2 Ekspresyonuna ait Deneyler

Jurkat NQO2 Ekspresyonu



Şekil 4.9. Jurkat hücre serisinde NQO2 ekspresyonuna ait Western Blot jel görüntüleri

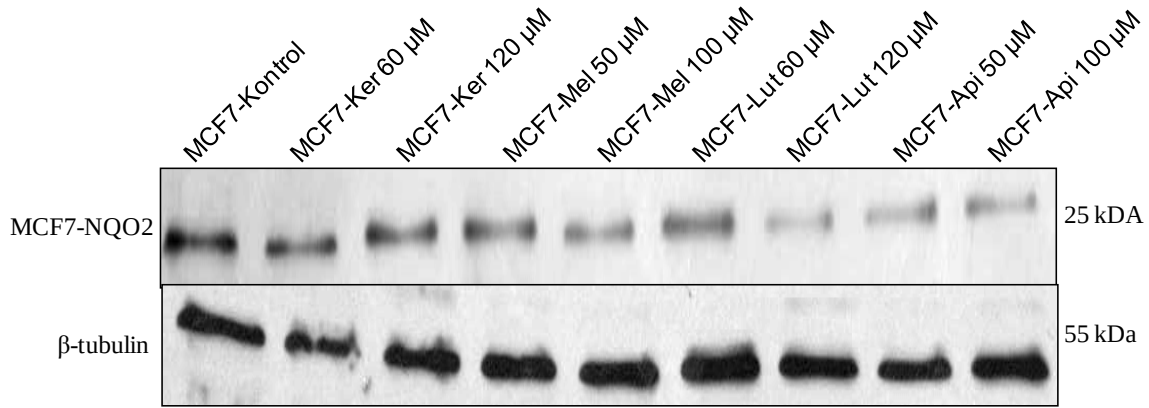


Grafik 4.42. Jurkat hücre serisinde NQO2 ekspresyonuna ait değerler

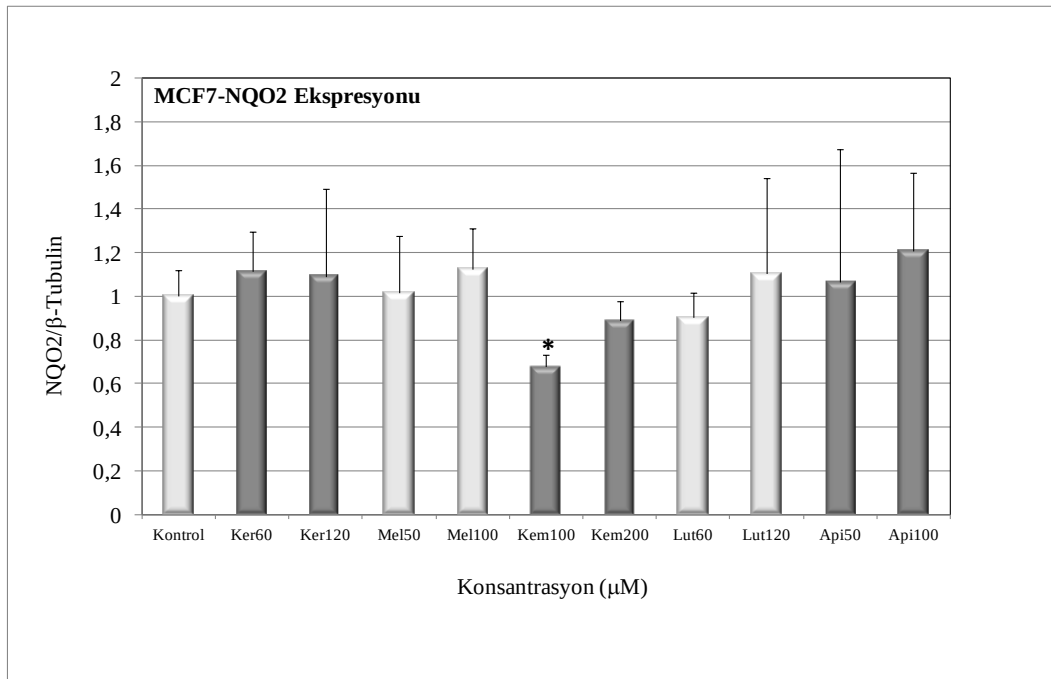
Jurkat hücre serisinde NQO2 ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda maddelerin IC₅₀ konsantrasyonları ve bunun iki katı konsantrasyonları kullanılmıştır.

Bu sonuçlara göre apigenin hücre kültüründe NQO2 ekspresyonunu azalttığı her iki dozda da belirlenmiştir. Kersetin ise 25 µM dozda anlamlı olarak ekspresyonu arttırmıştır (Şekil 4.9). Kemferol ve luteolin de çalışılan dozlarda ekspresyonu arttırmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Grafik 4.42).

MCF7 NQO2 Ekspresyonu Deneyleri



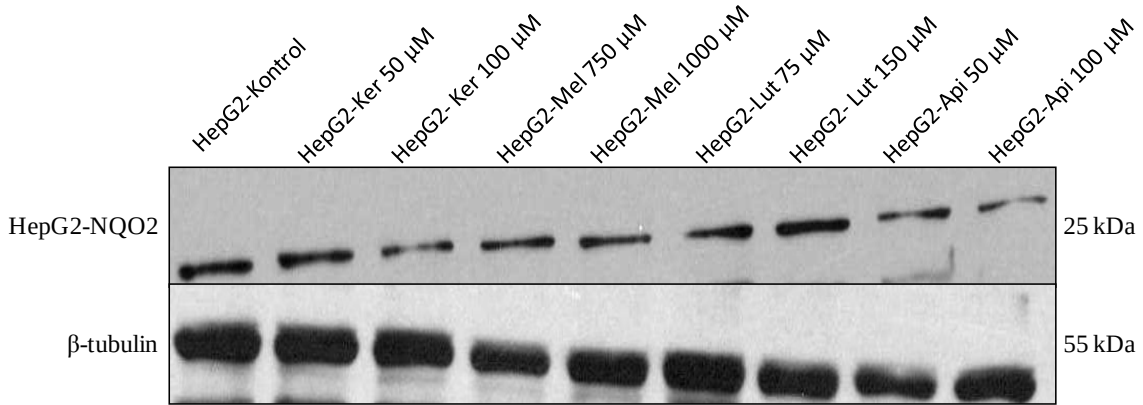
Şekil 4.10. MCF7 hücre serisinde NQO2 ekspresyonuna ait Western Blot jel görüntüleri



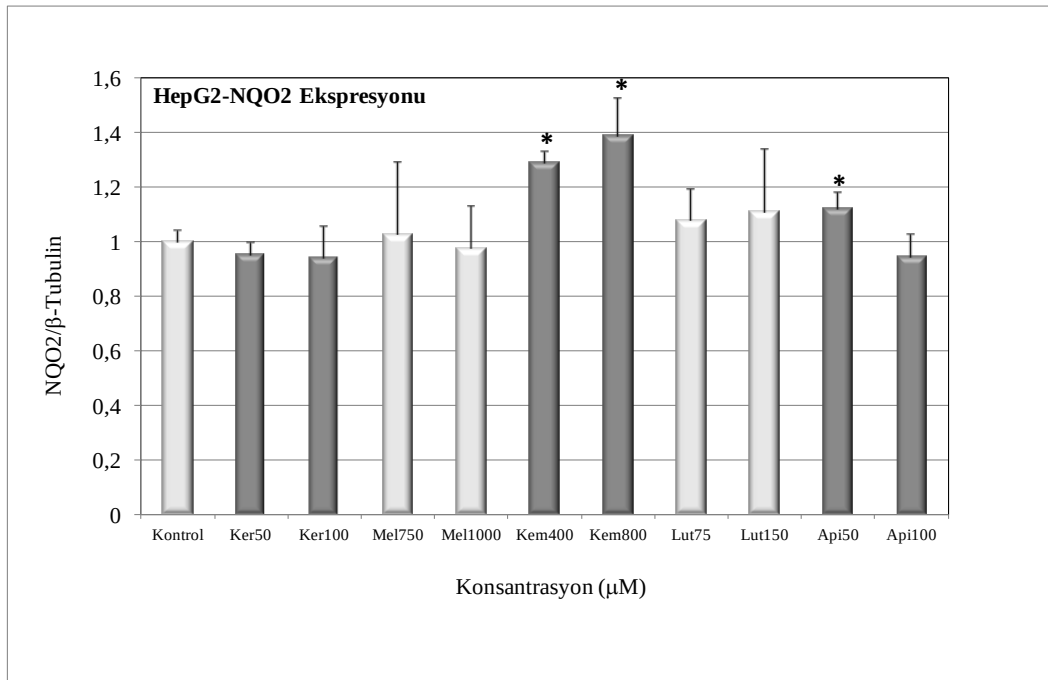
Grafik 4.43. MCF7 hücre serisinde NQO2 ekspresyonuna ait değerler

MCF7 hücre serisinde NQO2 ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda maddelerin IC50 konsantrasyonları ve bunun iki katı konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu sonuçlara göre Kemferol her iki dozda da NQO2 ekspresyonunu azalttığı (Şekil 4.10) ancak 100 mM dozda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Diğer maddelerin çalışılan dozlarda ekspresyon üzerine etkili olmadığı belirlenmiştir (Grafik 4.43).

HepG2 NQO2 Ekspresyonu Deneyleri

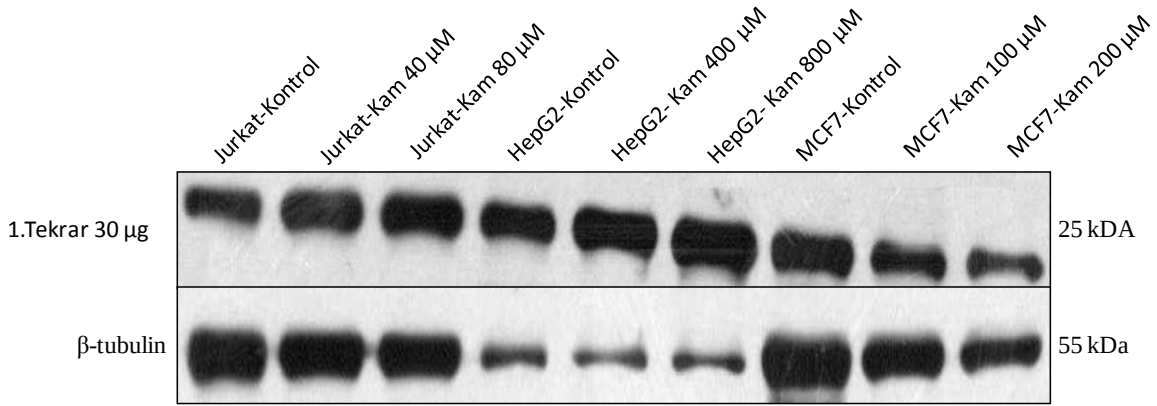


Şekil 4.11. HepG2 hücre serisinde NQO2 ekspresyonuna ait Western Blot jel görüntüleri



Grafik 4.44. HepG2 hücre serisinde NQO2 ekspresyonuna ait değerler

HepG2 hücre serisinde NQO2 ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda maddelerin IC₅₀ konsantrasyonları ve bunun iki katı konsantrasyonları kullanılmıştır. Bu sonuçlara göre hiçbir maddenin NQO2 ekspresyonunu hepatokarsinoma hücre kültüründe azaltmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.11, Grafik 4.44). Kemferol her iki dozda ve apigenin ise 50 mM dozda anlamlı olarak ekspresyonu arttırmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Kemferolün NQO2 ekspresyonuna ait Western Blot jel görüntüleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu proje kapsamında, benzopirenlerin detoksifikasyonunda rol alan NQO₂ enzim inhibitörlerinin (apigenin, kemferol, kersetin, luteolin, flavonoitlerin ve melatonin) kronik myeloid lösemi hücreleri başta olmak üzere çeşitli karsinoma hücreleri (hepatokarsinoma ve meme kanseri) üzerindeki antikanserojen etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Çalışmada öncelikle maddelerin NQO₂ enzimini inhibisyon şeklini belirlemek üzere yapılan enzim kinetiği deneylerinde tümünün kompetitif inhibitör oldukları belirlenmiş ve Ki değerleri hesaplanarak en güçlü inhibitörün apigenin (0.2506 nM) olduğu bulunmuştur. Bunu sırasıyla kemferol (0.5542 nM), kersetin (1.059 nM), luteolin (1.546+ nM) ve melatonin (544.9 nM) izlemektedir.

Kronik myeloid lösemi hücre serilerinden olan K562 hücrelerinde NQO₂'nin rolünü aydınlatabilmek amacıyla, NQO₂ KD K562 hücreleri elde edilmiş ve maddelerin inhibitör etkinliklerinin her iki hücre serisi üzerinde hücre canlılığı, toplam ROS ve apoptoz değerleri ile ilişkisi incelenmiştir. Bu sonuçlara göre K562 ve NQO₂ KD K562 hücre serilerinde tüm çalışılan maddelerin hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığı fakat bu azalmanın kersetin ve luteolinde daha fazla gerçekleştiği belirlenmiştir.

Hücrelerdeki toplam ROS miktarlarının ölçümü sonucunda kemferol, apigenin ve melatoninde doza bağlı olarak artmış, hücre canlılığı azalmış ve apoptoz artmıştır (apigenin dışında). Bunun sonucunda bu maddelerin prooksidan etki göstererek hücreler üzerinde sitotoksikite oluşturduğu düşünülmüştür. Luteolin ve kersetin ise toplam ROS miktarını azaltmış ancak hücre canlılığı ile apoptozu arttırmıştır.

Hücrelerdeki antioksidan bir enzim olan NQO₂ inhibe edildiğinde toplam ROS miktarının ve dolayısıyla hücre canlılığının azalması veya apoptozun tetiklenmesi beklenmektedir. Eğer apoptozda bir artış gözlenmiyor ve ROS artıyorsa oksidasyonun lipid peroksidasyonu v.b. farklı bir mekanizma üzerinden hücre canlılığını etkilediği söylenebilir. Apigenin dışında kalan tüm flavonoitlerde her iki hücre tipinde apoptoz doza bağlı olarak artmaktadır. Apigenin, kemferol ve melatoninde ise bu artışın KD K562 hücrelerinde daha az olduğu, fakat iki hücre arasındaki farkın konsantrasyona bağlı olarak azaldığı ve NQO₂ içeren K562 hücrelerinde apoptozu azaltarak KD K562 hücrelerine yaklaştırdığı belirlenmiştir. Luteolin ve kersetin ise KD K562 hücrelerinde apoptozu K562 hücrelerine göre daha fazla

oranda arttırmıştır. Bu nedenle hem ROS hem de apoptoz sonuçlarına bakıldığında, bu iki maddenin sitotoksik özelliğinin başka bir yolak üzerinden gerçekleştiği belirlenmiştir.

Jurkat, MCF7 ve HepG2 gibi farklı karsinoma hücre serilerinde apigenin, kemferol, kersetin, luteolin ve melatoninin toplam ROS, hücre çoğalması, apoptoz ve NQO2 ekspresyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir. Jurkat hücrelerinde melatonin ve apigenin toplam ROS miktarını doza bağımlı olarak arttırmış ve prooksidan etki göstermiştir. Kersetin ve luteolin antioksidan, kemferol ise düşük dozlarda antioksidan yüksek dozlarda prooksidan olarak belirlenmiştir. MCF7 hücrelerinde apigenin ve kersetin prooksidan, luteolin antioksidan ve kemferol ile melatonin ise düşük dozlarda antioksidan yüksek dozlarda prooksidan etki göstermiştir. HepG2 hücrelerinde ise apigenin, luteolin, kemferol, melatoninin toplam ROS düzeylerini doza bağımlı olarak artırdığı, kersetinin de düşük dozlarda prooksidan yüksek dozlarda antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Maddelerin hücre çoğalması üzerine etkileri incelendiğinde Jurkat hücrelerinde tüm maddelerin düşük dozlarında çoğalmayı arttırdığı yüksek dozlarda ise azalttığı belirlenmiştir. Çoğalmayı durdurmak açısından en etkili madde olarak kersetin (500 ve 1000 μM) ve kemferol (500 ve 1000 μM) bulunmuştur. MCF7 hücrelerinde ise luteolin ve melatoninin denenen tüm dozlarda çoğalmayı arttırdığı belirlenmiştir. Apigenin ve kersetin düşük dozlarda çoğalmayı arttırmış yüksek dozlarda ise azaltmıştır. En etkili madde olarak kemferol bulunmuştur. HepG2 hücrelerinde luteolin ve melatoninin denenen tüm dozlarda çoğalmayı arttırdığı belirlenmiştir. Çoğalmayı durdurmak açısından en etkili madde olarak kemferol (100 - 1000 mM) ve kersetin (500-1000 mM) bulunmuştur.

Apoptoz ile ilgili yapılan çalışmalarda Jurkat hücrelerinde tüm maddelerin apoptozu azalttığı belirlenmiştir. Kemferol 10 μM da ve kersetin ise 25 μM da en yüksek anti-apoptotik etkinliğe sahiptir. HepG2 hücrelerinde ise kemferol, kersetin ve luteolinin tüm dozlarda apoptozu azalttığı belirlenmiştir. Apigenin 50 ve 100 μM dozlarda ve melatoninin ise 100 μM dozda apoptozu arttırdığı gözlenmiştir. MCF7 hücrelerinde gerçekleştirilen Apo-1/Fas/CD95 yolağına ait yapılan ölçümlerde luteolin tüm denenen dozlarda, apigenin, kemferol ve melatonin düşük dozlarda, kersetin ise yüksek dozlarda apoptozu tetiklemiştir.

Western Blot yöntemiyle NQO2 ekspresyonu tüm hücrelerde IC_{50} konsantrasyonlarında ve iki katı konsantrasyonda ($n=3$) incelendiğinde Jurkat hücre serisinde apigeninin NQO2 ekspresyonunu azalttığı her iki dozda da belirlenmiştir. Kersetin ise 25 μM

dozda anlamlı olarak ekspresyonu arttırmıştır. Kemferol ve luteolin de çalışılan dozlarda ekspresyonu arttırmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. MCF7 hücre serisinde kemferolün her iki dozda da NQO2 ekspresyonunu azalttığı ancak 100 µM dozda istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Diğer maddelerin çalışılan dozlarda ekspresyon üzerine etkili olmadığı tespit edilmiştir. HepG2 hücre serisinde NQO2 ekspresyonunu maddelerin azaltmadığı belirlenmiştir. Kemferol her iki dozda ve apigenin ise 50 µM dozda anlamlı olarak ekspresyonu arttırmıştır.

Sonuç olarak; Jurkat hücre serisinde çalışılan maddeler arasında sadece apigenin NQO2 ekspresyonunu azaltmış ve benzer dozlarda toplam ROS'u arttırarak hücre çoğalmasını azaltmıştır. Bu nedenle apigeninin Jurkat hücrelerindeki sitotoksik etkisinin NQO2/ROS üzerinden yürüdüğü düşünülmektedir. MCF7 hücre serisinde ise benzer etkileri çalışılan maddeler arasında sadece kemferol göstermiştir. Bu nedenle kemferolün de MCF7 hücrelerindeki NQO2/ROS yolağını kullandığı sonucuna varılmıştır. HepG2 hücre serisinde kemferol ve apigeninin düşük dozu NQO2 ekspresyonunu ve ROS düzeylerini artırmış, özellikle kersetin ve kemferolün hücre çoğalmasını anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca HepG2 hücre serisinde kemferol, kersetin ve luteolinin tüm dozlarda apoptozu azalttığı belirlenmiştir. HepG2 hücrelerinde sadece apigeninin yüksek dozunun ve kersetinin NQO2 ekspresyonunu azalttığı ve bu nedenle NQO2-ROS ve sitotoksikite ilişkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer maddelerde ise farklı yolak veya farklı antioksidan mekanizmaların işleyebileceği düşünülmesi nedeniyle bundan sonraki çalışmalar bu yönde devam ettirilecektir.

6. KAYNAKLAR

- ARAUJO J.R., Goncalves P., Martel F., Chemopreventive Effect of Dietary Polyphenols in Colorectal Cancer Cell Lines, *Nutr. Res.*, 31, 77–87, (2011).
- BAGLI E., Stefaniotou M., Morbidelli L., Ziche M., Psillas K., Murphy C., Fotsis T., Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity, *Cancer Res.*, 64, 7936-46, (2004).
- BALIGA M.S., Katiyar S.K., Chemoprevention of Photocarcinogenesis by Selected Dietary Botanicals, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 5, 243–253, (2006).
- BAYSAL K., İleri Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri Eğitimi, Tübitak MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, 17, Kocaeli (2008).
- BENASSAYAG C., Perrot A M., Ferre F., Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 777, 233-48, (2002).
- BIRT D.F., Hendrich S., Wang W., Dietary Agents in Cancer Prevention: Flavonoids and Isoflavonoids, *Pharmacology & Therapeutics*, 90, 157-177, (2001).
- BIRT D.F., Mitchell D., Gold B., Pour P., Pinch H.C., Inhibition of Ultraviolet Light Induced Skin Carcinogenesis in Skh-1 Mice by Apigenin a Plant Flavonoid, *Anticancer Res.*, 17, 85–91, (1997).
- BISHAYEE K., Ghosh S., Mukherjee A., Sadhukhan R., Mondal J., Khuda-Bukhsh A.R., Quercetin Induces Cytochrome-C Release and ROS Accumulation to Promote Apoptosis and Arrest The Cell Cycle in G2/M, in Cervical Carcinoma: Signal Cascade and Drug-DNA Interaction, *Cell Prolif.*, 46, 153-63, (2013).
- BOOTS A.W., Haenen G.R., Bast A., Health Effects of Quercetin: From Antioxidant to Nutraceutical, *Eur. J. Pharmacol.*, 585, 325–337, (2008).
- BOUTIN J A., Audinot V., Ferry G., Delagrange P., Molecular tools to study melatonin pathways and actions, *Trends Pharmacol Sci.*, 26, 412-9, (2005).
- BROWN R J., Khodr H., Hider R C., Rice- Evans C A., Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties, *Biochem J.*, 330, 1173-8, (1998).
- BRUSSELMANS K., Vrolix R., Verhoeven G., Swinnen J V., Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem.*, 280, 5636-45, (2005).
- BURYANOVSKYY L., Fu Y., Boyd M., Ma T., Hsieh T., Wu J M., Zhang Z., Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol, *Biochemistry*, 43, 11417-26,

(2004).

CALDERÓN-MONTAÑO J M., Burgos-Morón E., Pérez-Guerrero C., López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol, *Mini Rev Med Chem.*, 11, 298-344, (2011).

CASAGRANDE F., Darbon J M., Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1, *Biochem Pharmacol.*, 61, 1205-15, (2001).

CEMELI E., Schmid T E., Anderson D., Modulation by flavonoids of DNA damage induced by estrogen-like compounds, *Environ Mol Mutagen.*, 44, 420-6, (2004).

CHENG A C., Huang T C., Lai C S., Pan M H., Induction of apoptosis by luteolin through cleavage of Bcl-2 family in human leukemia HL-60 cells, *Eur J Pharmacol.*, 509, 1-10, (2005).

CHOUDHURY D., Ganguli A., Dastidar D.G., Acharya B.R., Das A., Chakrabarti G., Apigenin Shows Synergistic Anticancer Activity with Curcumin by Binding at Different Sites of Tubulin, *Biochimie*, doi: 10.1016/j.biochi.2013.02.010, (2013).

CHROWDHURY A R., Sharma S., Mandal S., Goswami A., Mukhopadhyay S., Majumder H K., Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I, *Biochem J.*, 366, 653-61, (2002).

DE GROOT H., Rauen U., Tissue Injury by Reactive Oxygen Species and The Protective Effects of Flavonoids, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 12, 249–255, (1998).

DERİCİ E., Siklofosamid Kombinasyonlarının Çeşitli Tümör Hücre Serilerine Etkileri, (Doktora Tezi), Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı, Mersin (2007).

DIHAL A.A., de Boer V.C., van der Woude H., Tilburgs C., Bruijntjes J.P., Alink G.M., Rietjens I.M., Woutersen R.A., Stierum R.H., Quercetin, But Not Its Glycosidated Conjugate Rutin, Inhibits Azoxymethane-Induced Colorectal Carcinogenesis in F344 Rats, *J. Nutr.*, 136, 2862–2867, (2006).

DORONICHEVA N., Yasui H., Sakurai H., Chemical structure-dependent differential effects of flavonoids on the catalase activity as evaluated by a chemiluminescent method, *Biol Pharm Bull.*, 30, 213-7, (2007).

EKMEKÇİOĞLU C., Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance, *Biomed Pharmacother.*, 60, 97-108, (2006).

FOSTER C E., Bianchet M A., Talalay P., Zhao Q, Amzel L M., Crystal structure of human quinone reductase type 2 a metalloflavoprotein, *Biochemistry*, 38, 9881-6, (1999).

GARCIA-SANTOS G., Antolin I., Herrera F., Martin V., Rodriguez-Blanco1 J., Del Pilar Carrera Maria., Rodriguez C., Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer

cells, *J Pineal Res.*, 41, 130-5 (2006).

GIBELLINI L., Pinti M., Nasi M., Montagna J.P., De Biasi S., Roat E., Bertoncelli L., Cooper E.L., Cossarizza A., Quercetin and Cancer Chemoprevention, *Evid Based Complement Alternat. Med.*, 2011, Article ID 591356, 15 pages, (2011).

HAGGAG E.G., Abou-Moustafa M.A., Boucher W., Theoharides T.C., The Effect of a Herbal Water-Extract on Histamine Release from Mast Cells and on Allergic Asthma, *J. Herb. Pharmacother.*, 3, 41-54, (2003).

HE X., Liu R.H., Phytochemicals of Apple Peels: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidant Activities, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 9905–9910, (2008).

HELTON E S., Chen X., p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem.*, 100, 883-96, (2007).

HERTOG M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D., Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart Disease: The Zutphen Elderly Study, *Lancet*, 342, 1007-1011, (1993).

HOLLMAN P.C., Hertog M.G., Katan M.B., Role of Dietary Flavonoids in Protection Against Cancer and Coronary Heart Disease, *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 785–789, (1996).

HORINAKA M., Yoshida T., Shiraishi T., Nakata S., Wakada M., Nakanishi R., Nishino H., Matsui H., Sakai T., Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells, *Oncogene*, 24, 7180-7189, (2005).

HUANG W W., Chiu Y J., Fan M J., Lu H S., Yeh H F., Li K H., Chen P Y., Chung J G., Yang J S., Kaempferol induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathway in human osteosarcoma U-2 OS cells. *Mol Nutr Food Res.*, 54, 1585-95, (2010).

HUANG Y T., Hwang J J., Lee P P., Ke F C., Huang J H., Huang C J., Kandaswami C., Middleton Jr. E., Lee M T., Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor, *Br J Pharmacol.*, 128, 999-1010, (1999).

ISKANDER K., Paquet M., Brayton C., Jaiswal A K., Deficiency of NRH:quinone oxidoreductase 2 increases susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene-induced skin carcinogenesis, *Cancer Res.*, 64, 5925-8, (2004).

JAISWAL A K., Burnett P., Adesnik M., McBride O W., Nucleotide and deduced amino acid sequence of a human cDNA (NQO2) corresponding to a second member of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene family extensive polymorphism at the NQO2 gene locus on chromosome 6, *Biochemistry*, 29, 1899–1906, (1990).

JOUBERT E., Beelders T., de Beer D., Malherbe C.J., de Villiers A.J., Sigge G.O., Variation

in Phenolic Content and Antioxidant Activity of Fermented Rooibos Herbal Tea Infusions: Role of Production Season, *J. Agric. Food Chem.*, 60, 9171-9, (2012).

JOUSSEN A M., Rohrschneider K., Reichling J R., Kirchhof B., Kruse F E., Treatment of corneal neovascularization with dietary isoflavonoids and flavonoids, *Exp Eye Res.*, 71, 483-7, (2000).

JUNG B., Ahmad N., Melatonin in cancer management: progress and promise, *Cancer Res.*, 66, 9789-93, (2006).

KALE A., Gawande S., Kotwal S., Netke S., Roomi W., Ivanov V., Niedzwiecki A., Rath M., Studies on the Effects of Oral Administration of Nutrient Mixture, Quercetin and Red Onions on the Bioavailability of Epigallocatechin Gallate from Green Tea Extract, *Phytother. Res.*, 24, 48-55, (2010).

KAMPKÖTTER A., Gombitang Nkwonkam C., Zurawski RF, Timpel C., Chovolou Y., Wätjen W., Kahl R., Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*, *Arch Toxicol.*, 81, 849-58, (2007).

KANDERE-GRZYBOWSKA K., Kempuraj D., Cao J., Cetrulo C.L., Theoharides T.C., Regulation of IL-1-Induced Selective IL-6 Release From Human Mast Cells and Inhibition by Quercetin, *Br. J. Pharmacol.*, 148, 208–215, (2006).

KANG G Y., Lee E R., Kim J H., Jung J W., Lim J., Kim S K., Cho S G., Kim K P., Downregulation of PLK-1 expression in kaempferol-induced apoptosis of MCF-7 cells, *Eur J Pharmacol.*, 611, 17-21, (2009).

KANG J.T., Kwon D.K., Park S.J., Kim S.J., Moon J.H., Koo O.J., Jang G., Lee B.C., Quercetin Improves The *in vitro* Development of Porcine Oocytes by Decreasing Reactive Oxygen Species Levels, *J. Vet. Sci.*, 14, 15-20, (2013).

KHAN T.H., Sultana S., Apigenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells: Possible Role of TNF-Alpha and IFN-Gamma, *Toxicology*, 217, 206–212, (2006).

KIM J D., Liu L., Guo W., Meydani M., Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion, *J Nutr Biochem*, 17, 165-76, (2006).

KLESZCZNSKI K., Hardkop L H., Fischer TW., Differential effects of melatonin as a broad range UV-damage preventive dermato-endocrine regulator, *Dermatoendocrinol.*, 3, 27-31, (2011).

KNEKT P., Jarvinen R., Reunanen A., Maatela J., Flavonoid Intake and Coronary Mortality in Finland: A Cohort Study, *Br. Med. J.*, 312, 478-481, (1996).

KOBAYASHI T., Nakata T., Kuzumaki T., Effect of flavonoids on cell cycle progression in

prostate cancer cells, *Cancer Lett.*, 176, 17-23, (2002).

KUKONGVIRIYAPAN U., Sompamit K., Pannangpetch P., Kukongviriyapan V., Donpunha W., Preventive and Therapeutic Effects of Quercetin on Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress and Vascular Dysfunction in Mice, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 90, 1345-53, (2012).

LANOIX D, Lacasse AA, Reiter RJ, Vaillancourt C. Melatonin: the smart killer: the human trophoblast as a model, *Mol Cell Endocrinol.*, 348, 1-11 (2012).

LEE H J., Wang C J., Kuo H C., Chou F P., Jean L F., Tseng T H., Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 203, 124-31, (2005).

LEFORT ÉC., Blay J., Apigenin and its Impact on Gastrointestinal Cancers, *Mol Nutr Food Res.*, 57, 126-44, (2013).

LIN H Y., Juan S H., Shen S C., Hsu F L., Chen Y C., Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1, *Biochem Pharmacol.*, 66, 1821-32, (2003).

LONG D J 2nd., Iskander K., Gaikwad A., Arin M., Roop D. R., Knox R., Barrios R., Jaiswal A K., Disruption of dihydronicotinamide riboside:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) leads to myeloid hyperplasia of bone marrow and decreased sensitivity to menadione toxicity, *J Biol Chem.*, 277, 46131-9 (2002).

LOSI G., Puia G., Garzon G., de Vuono M.C., Baraldi M., Apigenin Modulates Gabaergic and Glutamatergic Transmission in Cultured Cortical Neurons, *Eur J Pharmacol.*, 502, 41-46, (2004).

MA Z.S., Huynh T.H., Ng C.P., Do P.T., Nguyen T.H., Huynh H., Reduction of CWR22 Prostate Tumor Xenograft Growth by Combined Tamoxifen-Quercetin Treatment is Associated with Inhibition of Angiogenesis and Cellular Proliferation, *Int. J. Oncol.*, 24, 1297–1304, (2004).

MANACH C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L., Polyphenols: Food Sources and Bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727–747, (2004).

MARFE G., Tafani M., Indelicato M., Sinibaldi-Salimei P., Reali V., Pucci B., Fini M., Russo M A., Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines via Aktinactivation, Bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction, *J Cell Biochem.*, 106, 643-50, (2009).

MATSUKAWA Y., Marui N., Sakai T., Satomi Y., Yoshida M., Matsumoto K., Nishino H., Aoike A., Genistein arrests cell cycle progression at G2-M, *Cancer Res.*, 53: 1328-31, (1993).

MORRISSEY C., O'Neill A., Spengler B., Christoffel V., Fitzpatrick J.M., Watson R.W., Apigenin Drives the Production of Reactive Oxygen Species and Initiates a Mitochondrial Mediated Cell Death Pathway in Prostate Epithelial Cells, *Prostat*, 63, 131–142, (2005).

MURPHY E.A., Davis J.M., McClellan J.L., Carmichael M.D., Quercetin's Effects on Intestinal Polyp Multiplicity and Macrophage Number in the Apc(Min/+) Mouse, *Nutr. Cancer*, 63, 421–426, (2011).

NAGAO A., Seki M., Kobayashi H., Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 63, 1787-90, (1999).

NOSJEAN O., Nicolas J P., Klupsch F., Delagrange P., Caneta E., Boutina J A., Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2, Tissue distribution of MT3/QR2, *Biochem Pharmacol.*, 61, 1369-79, (2001).

PANDI-PERUMAL S R., Trakht I., Srinivasan V., Spence D W., Maestroni G J M., Zisapel N., Cardinali D P., Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways, *Prog Neurobiol.*, 85, 335-53, (2008).

PIETTA P G., Flavonoids as antioxidants, *J Nat Prod.*, 63, 1035-42, (2000).

SANCHEZ- BARCELO E J., Cos S., Fernández R., Mediavilla M D., Melatonin and mammary cancer: a short review, *Endocr Relat Cancer.*, 10, 153-9, (2003).

SARAF S., Kaur C.D., Phytoconstituents as Photoprotective Novel Cosmetic Formulations, *Pharmacogn. Rev.*, 4, 1-11, (2010).

SCHINDLER R., Mentlein R., Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells, *J Nutr.*, 136, 1477-82 (2006).

SELVENDIRAN K., Koga H., Ueno T., Yoshida T., Maeyama M., Torimura T., Yano H., Kojiro M., Sata M., Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids, *Cancer Res.*, 66, 4826-34, (2006).

ŞENER G., Karanlığın Hormonu Melatonin, *Marmara Eczacılık Dergisi*, 14, 112-120, (2010).

SHUKLA S., Gupta S., Molecular Targets for Apigenin-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Prostate Cancer Cell Xenograft, *Mol. Cancer Ther.*, 5, 843–852, (2006).

SHUKLA S., Gupta S., Suppression of Constitutive and Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Nuclear Factor (NF)-kappaB Activation and Induction of Apoptosis by Apigenin in Human Prostate Carcinoma Pc-3 Cells: Correlation with Down-Regulation of Nf-Kappab-Responsive Genes, *Clin. Cancer Res.*, 10, 3169–3178, (2004).

TAN B.J., Liu Y., Chang K.L., Lim B.K., Chiu G.N., Perorally Active Nanomicellar Formulation of Quercetin in The Treatment of Lung Cancer, *Int. J. Nanomedicine*, 7, 651-61, (2012).

TAN D X., Manchester L C., Terron P M., Flores L J., Tamura H., Reiter RJ., Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2 the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance, *J Pineal Res.*, 43, 317-20, (2007).

TERAO J., Dietary Flavonoids as Antioxidants, *Forum Nutr.*, 61, 87–94, (2009).

UGUZ A C., Cig B., Espino J., Bejarano I., Naziroglu M., Ana B. Rodri'guez A B., Pariente J A., Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells, *J Pineal Res.*, 53, 91-8, (2012).

VARGAS A.J., Burd R., Hormesis and Synergy: Pathways and Mechanisms of Quercetin in Cancer Prevention and Management, *Nutr. Rev.*, 68, 418–428, (2010).

VELLA F., Ferry G., Delagrang P., Boutin J.A., NRH:quinone oxidoreductase 2: An enzyme of surprises and mysteries, *Biochem Pharmacol.*, 71, 1-12, (2005).

WACH A., Pyrzyńska K., Biesaga M., Quercetin Content in Some Food and Herbal Samples, *Food Chem.*, 100, 699-704, (2007).

WANG L., Tu Y C., Lian T W., Hung J T., Yen J H., W M J., Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols, *J Agric Food Chem.*, 54, 9798-804, (2006).

WAY T.D., Kao M.C., Lin J.K., Apigenin Induces Apoptosis Through Proteasomal Degradation of Her2/Neu in Her2/Neu-Overexpressing Breast Cancer Cells via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Dependent Pathway, *J. Biol. Chem.*, 279, 4479–4489, (2004).

WAY T.D., Kao M.C., Lin J.K., Degradation of HER2/neu by Apigenin Induces Apoptosis through Cytochrome c Release and Caspase-3 Activation in HER2/neu-Overexpressing Breast Cancer Cells, *FEBS Lett.*, 579, 145–152, (2005).

WENG Z., Zhang B., Asadi S., Sismanopoulos N., Butcher A., Fu X., Katsarou-Katsari A., Antoniou C., Theoharides T.C., Quercetin is More Effective Than Cromolyn in Blocking Human Mast Cell Cytokine Release and Inhibits Contact Dermatitis and Photosensitivity in Humans, *PLoS One*, 7, 3, e33805, doi: 10.1371/journal.pone.0033805, (2012).

WISEMAN H., Dietary Influences on Membrane Function: “Importance in Protection Against Oxidative Damage and Disease”, *J. Nutr. Biochem.*, 7, 2–15, (1996).

WU C., Chen F., Rushing J.W., Wang X., Kim H.J., Huang G., Haley-Zitlin V., He G., Antiproliferative Activities of Parthenolide and Golden Feverfew Extract Against Three Human Cancer Cell Lines, *J. Med. Food*, 9, 55-61, (2006).

YIN F., Giuliano A.E., Law R.E., Van Herle A.J., Apigenin Inhibits Growth and Induces G2/M Arrest by Modulating Cyclin-CDK Regulators and ERK MAP Kinase Activation in Breast Carcinoma Cells, *Anticancer Res.*, 21, 413–420, (2001).

YUAN Z., Long C., Junming T., Qihuan L., Youshun Z., Chan Z., Quercetin-Induced Apoptosis of HL-60 Cells by Reducing PI3K/Akt, *Mol. Biol. Rep.*, 39, 7785-93, (2012).

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: 110S085
Proje Başlığı: NQO₂'Yİ HEDEF ALAN MOLEKÜLLERİN KARSİNOMA ÜCRELERİNDE PROFLAKTİK/TERAPÖTİK ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. Mükerrrem Betül AYCAN, Prof. Dr. Müberra KOŞAR, Doç. Dr. Nefise Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 38039 Melikgazi, Kayseri
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:-
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15/10/2010 – 15/04/2013
Öz (en çok 70 kelime) Önerilen projenin üst şemsiye kuruluşu olan A.B.D. Colorado Denver Üniversitesi'nde bulunan araştırma ekibinin, kronik myeloid lösemi hücreleri üzerinde NQO ₂ inhibitörlerinin antikanserojen etkinlikleri ile ilgili NIH (National Institute of Health, USA) projesinin Türkiye kolu olarak gerçekleştirilen bu çalışmada özellikle NQO ₂ enziminin antikanserojen etkinlik ile ilişkisi NQO ₂ inhibitörleri (Kemferol, Apigenin, Luteolin, Kersetin ve Melatonin) üzerinden lösemi ile ilgili olan Jurkat hücrelerinde ve diğer farklı kanser hücrelerinde aydınlatılmaya çalışıldı.
Anahtar Kelimeler: NQO ₂ , melatonin, flavonoit, karsinoma
<u>Fikri Ürün Bildirim Formu</u> Sunuldu mu? Evet ☒ Gerekli Değil ☐ Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: Bildiriler: 1. Natural Anticancer Drugs 2013, Oloumoc, Çek Cumhuriyeti'nde "The anticancerogen effects of melatonin, quercetin and luteolin on HepG2 cell lines (Yerer-Aycan M: Betul, Aslan C, Imamoglu N, Koşar M.) isimli bildiri poster olarak sunulmuştur. 2. European Pharmacology Congress (EPHAR), 2013, Granada, İspanya toplantısında "Does melatonin exert its effect via the MT3 Receptor NQO₂?" (M Betul Yerer Aycan, C Aslan, E Demirpolat, M Kosar, N Imamoglu) isimli bildiri

poster olarak sunulmuştur.

3. European Pharmacology Congress (EPHAR), 2013, Granada, İspanya toplantısında “Does NQO₂ modulate the cellular effects of apigenin?” (M Betül Yerer Aycan, C Aslan, B Odabasi, M Kosar, N Imamoglu) isimli bildiri poster olarak sunulmuştur.

Doktora Tezi: Aşağıdaki Doktora Tezi projenin K562 hücre deneylerini içermektedir. Bu tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Doktora Tezi olarak (15 000 TL) desteklenmiştir.

“Kanser Hücrelerinde NQO₂’yi Hedef Alan Moleküllerin Etkilerinin İncelenmesi” Canan Aslan, Mayıs 2013 (Sınav tarihi). Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri

Ekte Bulunan “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”, “Kazanımlar” Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşıdığını Düşünüyorsanız “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”nu doldurunuz.