Protokatekuik Asitin Hücre Proliferasyonu ve Apoptoz Üzerindeki Etkilerinin Memeli Hücre Kültür Yöntemiyle İn Vitro Belirlenmesi

Emine İnan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mart 2014

Determination of Proliferative and Apoptotic Effects of Protocatechuic Acid with Mammalian Cell Culture Method In Vitro

Emine Inan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

March 2014

Protokatekuik Asitin Hücre Proliferasyonu ve Apoptoz Üzerindeki Etkilerinin Memeli Hücre Kültür Yöntemiyle İn Vitro Belirlenmesi

Emine İnan

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

Bu tez Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 201219A104 no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

MART 2014

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Emine İnan'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Protokatekuik Asitin Hücre Proliferasyonu ve Apoptoz Üzerindeki Etkilerinin Memeli Hücre Kültür Yöntemiyle İn Vitro Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

İkinci Danışman **:** -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ruhi UYAR

Üye: Doç. Dr. Mediha CANBEK

Üye: Doç. Dr. Selda KABADERE

Üye: Doç. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

Üye: Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

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

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, insan (T98G) ve sıçan glioma (C6) hücreleri üzerindeki protokatekuik asitin farklı dozlarının (0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM) hücre morfolojisi, çoğalması ve apoptotik-nekrotik etkileri zamana bağlı olarak incelenmiştir. Protokatekuik asitin hücre çoğalması üzerindeki etkileri 3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT) ve nötral kırmızısı (NR) yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Protokatekuik asitin, T98G hücrelerinde, hem hücre morfolojisi hem de çoğalması üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). C6 hücrelerinde ise 24 saatte 2 mM, 48 saatte ise 1,5 mM dozundan itibaren hücre morfolojisi üzerinde değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir. Hücre çoğalması üzerindeki baskılayıcı etkisi ise 24 saatte 2 mM ($p<0,001$); 48 saatte ise 1,5 mM ($p<0,001$) dozundan itibaren görülmeye başlanmıştır. MTT yöntemine göre 24 ve 48 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 2,79 ve 1,84 mM, NR yöntemine göre ise 2,67 ve 1,79 mM olarak hesaplanmıştır. Seçilen protokatekuik asit dozlarının C6 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir nekrotik etkiye neden olmazken ($p>0,05$), apoptotik etkiyi artırdığı belirlenmiştir ($p<0,001$). Elde edilen tüm veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, protokatekuik asitin doza ve zamana bağlı olarak hücre morfolojisi, çoğalması ve apoptotik ve/veya nekrotik etkileri T98G ve C6 glioma hücreleri üzerinde ilk defa incelenmiştir. Protokatekuik asitin, doza ve zamana bağlı olarak T98G hücrelerinde, hem hücre morfolojisi hem de çoğalması üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı buna rağmen, C6 hücrelerinde hücre morfolojisini etkilediği, hücre çoğalmasını baskıladığı ve apoptotik etkiyi arttırdığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Protokatekuik asit, glioma, sitotoksisite, apoptoz

SUMMARY

In this study, cell morphology, cell proliferation, apoptotic and necrotic effects of different doses of protocatechuic acid (0.5; 0.75; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5 mM) on human (T98G) and rat glioma (C6) cells time dependent manner are investigated. The effects of protocatechuic acid on cell proliferation are evaluated with 3 - (4,5-Dimetiltriazol-2-yl) -2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) and neutral red (NR) methods. It is determined that protocatechuic acid hasn't any effect on both morphological and proliferation on T98G cell ($p>0.05$). It is observed that protocatechuic acid cause cell morphological changes in C6 cells as beginning from dosage of 2 mM at 24 hr and 1.5 mM at 48 hr. Its effect on cell viability is observed as beginning from doses 2 mM at 24 hr ($p<0.001$) and 1.5 mM at 48 hr ($p<0.001$). While IC_{50} values are calculated as 2.79 and 1.84 mM for 24 and 48 hr respectively according to MTT method; these values are calculated as 2.67 and 1.79 mM according to NR method. It is observed that chosen doses of protocatechuic acid do not cause significantly any necrotic effect on C6 cells depending on dose and time($p>0.05$); on the other hand, increase apoptotic effect ($p<0.001$). Obtained all data evaluated as statistically, with one way analysis of variance (ANOVA) and then Tukey's multiple comparison tests.

As a result; cell morphology, cell proliferation, apoptotic and necrotic effects of protocatechuic acid by depending on doses and time are researched on T98G and C6 cell lines for the first time. Protocatechuic acid dose and time dependent in T98G cells, has no effect on cell morphology and also on the proliferation of cells any significantly, although on C6 cells, effects cell morphology, inhibits cell proliferation and increases apoptotic effects was determined.

Key Words: Protocatechuic acid, glioma, cytotoxicity, apoptosis

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini, yardımlarını ve deneyimlerini benden esirgemeyen, ilerlediğim bu yolda beni her türlü konuda aydınlatan değerli danışmanım Doç. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gerek laboratuvar çalışmalarım sırasında gerekse eğitim alanında kendimi geliştirmem de büyük katkıları olan saygın hocalarım Prof. Dr. Ruhi UYAR, Doç. Dr. Mediha CANBEK, Doç. Dr. Selda KABADERE, Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Gökhan KUŞ' a ve beni yetiştiren bölümümün tüm hocalarına teşekkürü borç bilirim.

Çalışmamda 201219A104 nolu projeyle gereken finansal desteği sağlayan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederim.

Ayrıca aynı laboratuvar ortamında çalışmaktan mutluluk duyduğum ve çalışmalarım sırasında desteklerini benden eksik etmeyen arkadaşlarım Melek GÜNİNDİ ve Fulya PAK' a teşekkür ederim.

Son olarak ise tüm hayatım boyunca bana her türlü maddi ve manevi desteklerini sağlayan, yaşamımın her anında sevgilerini benden hiç eksik etmeyen babam ve annem Recep-Gülever UYARBAŞLAR, eşim Kamil İNAN ve ablalarım Serpil TUNA, Sibel KUM' a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **v**
SUMMARY ..... **vi**
TEŞEKKÜR ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Hücre Döngüsü 3
2.2. Hücre Ölümü 4
2.2.1. Nekroz 4
2.2.2. Apoptoz 5
2.2.3. Otofaji 10
2.3. Kanser ve Apoptozdan Kaçış 11
2.4. Protokatekuik Asit 13

3. MATERYAL ve METOD **15**
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler 15
3.2. Hücre Hatlarının Temini ve Kültüre Alınması 17
3.3. Hücrelerin Sayımı. 17
3.4. Hücrelerin Ekilmesi ve Protokatekuik Asit Dozlarının Hazırlanması 18
3.5. Hücrelerin Morfolojik Görüntülenmesi 18
3.6. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Hücre Çoğalmasının Belirlenmesi. 19
3.7. Lizozomal Aktiviteye Dayalı Hücre Çoğalmasının Belirlenmesi 20

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.8. Hücre Ölümünün ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi. 21
3.9. İstatistiksel Analizler 22

4. BULGULAR 23
4.1. Protokatekuik Asitin Glioma Hücre Dizileri Üzerindeki Morfolojik Etkilerinin Belirlenmesi 23
4.2. Protokatekuik Asitin Glioma Hücre Dizileri Üzerindeki Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Çoğalmayı Baskılayıcı Etkilerinin Belirlenmesi 31
4.3. Protokatekuik Asitin Glioma Hücre Dizileri Üzerindeki Lizozomal Aktiviteye Dayalı Çoğalmayı Baskılayıcı Etkilerinin Belirlenmesi 33
4.4. Protokatekuik Asitin Glioma Hücre Dizileri Üzerindeki Apoptotik ve/veya Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi 35

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER 37

KAYNAKLAR DİZİNİ 44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Normal ve apoptoza uğramış hücrelerin morfolojik görüntüleri 6
Şekil 2.2. Apoptoz sırasında meydana gelen olaylar 7
Şekil 2.3. Ölüm reseptörleri 8
Şekil 2.4. Nekroz ve Apoptoz arasındaki morfolojik değişiklikler 10
Şekil 2.5. Otofajik, apoptotik ve nekrotik hücre morfolojileri 11
Şekil 2.6. Protokatekuik asitin kimyasal yapısı 13
Şekil 3.1. MTT'nin kimyasal yapısı ve formazana dönüşmesi 19
Şekil 4.1. Kontrol grubu olan C6 hücrelerinin 24 saat sonraki değişikliklerinin görüntülenmesi 24
Şekil 4.2. Protokatekuik asitin 1,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi 24
Şekil 4.3. Protokatekuik asitin 2 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi 25
Şekil 4.4. Protokatekuik asitin 2,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. 25
Şekil 4.5. Protokatekuik asitin 3 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi 26
Şekil 4.6. Protokatekuik asitin 3,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi 26
Şekil 4.7. Kontrol grubu olan C6 hücrelerinin 48 saat sonraki değişikliklerinin görüntülenmesi. 28
Şekil 4.8. Protokatekuik asitin 1,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. 28
Şekil 4.9. Protokatekuik asitin 2 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi 29

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.10. Protokatekuik asitin 2,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi 29
Şekil 4.11. Protokatekuik asitin 3 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. 30
Şekil 4.12. Protokatekuik asitin 3,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. 30
Şekil 4.13. Protokatekuik asit dozları ile 24 saat muamele edilen C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi 32
Şekil 4.14. Protokatekuik asit dozları ile 48 saat muamele edilen C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi 32
Şekil 4.15. Protokatekuik asit dozları ile 24 saat muamele edilen C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin lizozomal aktivite bakımından değerlendirilmesi..... 34
Şekil 4.16. Protokatekuik asit dozları ile 48 saat muamele edilen C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin lizozomal aktivite bakımından değerlendirilmesi 34
Şekil 4.17. Protokatekuik asitin uygulandığı C6 hücrelerinin 24 saatteki apoptotik ve nekrotik etki yüzdeleri 36
Şekil 4.18. Protokatekuik asitin uygulandığı C6 hücrelerinin 48 saatteki apoptotik ve nekrotik etki yüzdeleri 36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Nekroz ile Apoptozun Karşılaştırılması 9
Çizelge 3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler 15
Çizelge 3.2. Deneylerde Kullanılan Sarf Malzemeler 16

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
˚C	Celcius degree (Santigrat derece)
µL	mikrolitre (10^{-6}litre)
µm	mikrometre (10^{-6} metre)
µM	mikromolar (10^{-6} molar)
cm^2	santimetrekare
dk	dakika
g	gram
mL	mililitre (10^{-3} litre)
mM	milimolar (10^{-3} molar)
nm	nanometre

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklamalar
A549	İnsan akciğer karsinomu hücre dizisi
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit)
AGS	İnsan gastrik kanser
AIF	Apoptoz uyarıcı faktör
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B hücre lenfoma
$C_2H_4O_2$	Glasiyal asetik asit
C_2H_5OH	Etanol
C6	Sıçan glioma hücre dizisi
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
CAL27	İnsan squamöz karsinom hücre dizisi
CDI	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri
CDK	Siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar
CH_2O	Formaldehit
CL	İnsan normal karaciğer hücre dizisi
DAPI	4 ',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco’s modified eagle’s medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FBS	Fetal bovine serum (Fetal dana serumu)
GBM	Glioblastoma multiforme
HBSS	Hank’s Balance Salt Solution (Hank'ın dengelenmiş tuz solüsyonu)
HeLa	İnsan serviks karsinom hücre dizisi
Hep3B	İnsan hepatosellüler karsinom hücre dizisi
HepG2	İnsan hepatosellüler karsinom hücre dizisi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklamalar
HL-60	İnsan lösemi kanser hücresi hücre dizisi
HSC-2	İnsan squamöz karsinom hücre dizisi
HSG_1	İnsan tükürük bezi karsinom hücre dizisi
HT29	İnsan kolorektal karsinom hücre dizisi
IC_{50}	Hücrelerin %50'sini öldüren doz
LNCaP	İnsan prostat karsinom hücre dizisi
MCF7	İnsan meme karsinom hücre dizisi
MKN45	İnsan gastrik karsinom hücre dizisi
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
NR	Nötral red (nötral kırmızısı)
PBS	Fosfat buffer saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
PCA	Protokatekuik asit
Rb	Retinablastoma
SPSS	Statistics program for social and science
T98G	İnsan glioblastoma multiforme hücre dizisi
TNF	Tümör nekroz faktör
vd.	Ve diğerleri

1. GİRİŞ

Hücrelerin kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalması olarak tanımlanan kanser, tüm teknolojik gelişmelere rağmen günümüzde hala ölümle sonuçlanan hastalıklar arasında ikinci sırada yer almaktadır (Cooper ve Hausman, 2006). Ayrıca, gün geçtikçe kanser vakalarının sayısındaki artış ise bilim adamlarını endişelendirmektedir.

Glioblastoma multiforme (GBM) glial hücrelerden köken alan, kötü huylu bir beyin tümörü çeşididir (Karmakar, et al., 2006). Tümörün tedavisinde kullanılan radyoterapinin beyinde hasar oluşturması, cerrahi müdahale ile tümörün tam temizlenememesi ve kullanılan kemoterapötik ilaç sayısının sınırlı olmasıyla birlikte kanserli hücrelerin kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirmesi bu hastalığın tedavisini güçleştirmektedir (Das, et al., 2008; Reithmeier, et al., 2010). Bu nedenle hastalığın tedavisinde yan etkileri az, fakat daha etkili yeni kimyasal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin, farklı kanser hücrelerinde çoğalmayı baskılayıcı etkilerinin olduğu yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla belirlenmiştir (Nandi, et al., 2007; Oztopcu-Vatan, et al., 2009; Uyar, vd., 2013). Protokatekuik asit de, bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bir bileşiktir. Yapılan çalışmalarda farklı kanser hücrelerinde çoğalmayı baskılayıcı ve apoptozu indükleyici etkisinin olduğu belirlenmiştir (Tanaka, et al., 2011). Aynı zamanda normal hücrelerde toksik bir etki göstermemesi bilim adamlarının ilgisini bu madde üzerine çekmektedir (Yin, et al., 2009).

Bu çalışmada ilk olarak protokatekuik asitin insan glioblastoma multiforme (T98G) ve sıçan glioma (C6) hücre morfolojisi üzerindeki olası etkilerinin incelenmesi planlanmıştır. Doza ve zamana bağlı olarak hücre çoğalması üzerindeki etkileri ise mitokondriyal aktiviteye dayalı 3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT) ve lizozomal aktiviteye dayalı nötral kırmızısı (NR) yöntemleri kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Son olarak hücre ölümü çeşidinin (nekroz ve/veya

apoptoz) belirlenmesi amacıyla da hücre ölümü belirleme kitinin kullanılması hedeflenmiştir.

Bölümlere göre ele alınan konular şu şekildedir. Bölüm 2' de hücre çoğalması, hücre ölüm tipleri, kanser, glioblastoma multiforme ve protokatekuik asit ile ilgili bilgiler verilmiş; Bölüm 3'de protokatekuik asitin glioma hücre morfolojisi üzerindeki etkileri, hücre çoğalmasını baskılayıcı etkileri ve aktive ettiği hücre ölüm çeşidi farklı yöntemlerle belirlenmiş; Bölüm 4'de ise bu yöntemler sonucunda elde edilen bulgular açıklanmış son bölümde de diğer yapılan çalışmalar ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Döngüsü

Bedenimizdeki dokuların pek çoğu, ihtiyaç halinde yenilerini oluşturabilmek için bölünebilen hücrelerden oluşmaktadır (Alberts, vd., 2008). Hücre döngüsü, çoğalmak için uyarılmış bir hücrede gerçekleşen bir dizi geçici biyokimyasal aktivite ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü süreç olarak tanımlanabilir (Cooper ve Hausman, 2006).

Ökaryotik hücreler, bölünme sinyali almadıkları sürece istirahat fazı denilen G_0 evresinde bölünmeden beklerler. Hücre bölünmesini uyaran sinyaller (büyüme faktörleri, sitokinler vb.) alındığında ise hücre bölünmeye sevk edilir. Hücreler önce interfaz adı verilen bir hazırlık evresi geçirir. Bu hazırlık evresinde genellikle hücre hacim olarak büyür, DNA replikasyonu gerçekleşir, bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler ve moleküller sentezlenir. İnterfaz, kendi içinde G_1, S, ve G_2 olmak üzere üç evreden oluşur.

G_1 evresinde bulunan bir hücre metabolik olarak aktiftir ve hücre bölünmesinde görev alacak olan çeşitli proteinlerin sentezini gerçekleştirmeye başlar. Bir sonraki evre olan S evresinde ise DNA eşleşmesi gerçekleşir. G_2 evresinde ise hücrenin hacimce büyümesi devam eder ve mitoz için gerekli proteinlerin sentezi giderek azalmaya başlar. Hücre interfaz safhasını tamamladıktan sonra profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez evrelerini içeren mitoz evresine girer (Garrett, 2001).

Hücre döngüsü, G_1-S, G_2-M ve M fazındaki çeşitli geçiş noktalarında döngüye özgü proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CDI'lerinin düzeyleri hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça karmaşık bir düzen içinde döngünün ilerlemesini düzenlerler (Vermeulen,et al., 2003; Cabadak, 2008).

2.2. Hücre Ölümü

İnsan vücudunda gelişen tüm doku ve organlar tek bir hücreden meydana gelmektedir. Embriyonik ve fetal gelişim sürecinde yeni oluşan hücreler hızla bölünerek çeşitli doku ve organları oluşturmaktadır. Bu süreçte hücre farklılaşması ya da organizmanın bütününün oluşmasını sağlayabilmek için bazı hücrelerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Bu sayede organizmada belli bir homeostaz sağlanmış olur (Hengartner, 2000) Ayrıca çeşitli nedenlerle hasara uğramış hücrelerin de organizmaya zarar vermemeleri için ortadan kaldırılmaları gerekmektedir. Hücrelerin ortadan kaldırılması sürecine hücre ölümü adı verilir (Yıldırım vd., 2007; Altunkaynak ve Özbek, 2008). Genel olarak, biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik olarak ele alındığında hücre ölümünün farklı sebeplerle ortaya çıkabilen ve birbirinden farklı mekanizmalara sahip olan üç farklı türü olduğu bilinmektedir. Bunlar nekroz, programlı hücre ölümü (apoptoz) ve otofaji'dir (Kroemer, 2009).

2.2.1. Nekroz

Nekroz, hücrelerin genellikle olumsuz fiziksel ya da kimyasal şartlar sonrasında yaralanması ve bunun sonucunda da şişip, patlayarak ölmesi olarak tanımlanabilir. Nekroza uğrayan bir hücrede, zar bütünlüğü bozulduğu için hücrenin geçirgenliği artar. Hücre içine aşırı sıvı girmesinden dolayı hücreler şişer (Kumar, vd., 2002; Altunkaynak ve Özbek, 2008). Artan zar geçirgenliğinin sonucunda ise hücre ve organel parçalanması ve bu içeriğin hücreler arası boşluğa salınması gerçekleşir. Bu olay da iltihaplanmaya (inflamasyon) neden olmaktadır. Bu nedenle iltihaplanma nekrozun en önemli işaretlerinden birisidir (Proskuryakov, et al., 2003; Festjens, et al., 2006).

Nekrozun gerçekleşmesine neden olan çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler vardır. Fiziksel etkenlerin içerisinde nekroza neden olan en önemli faktör oksijen yetersizliği anlamına gelen hipoksidir. Ayrıca travmatik durumlarda, yüksek dozda radyasyona maruz kalınması da nekrozla sonuçlanmaktadır. Siyanid, arsenik gibi toksik

kimyasal maddelerinde nekroza neden olduğu bilinmektedir (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

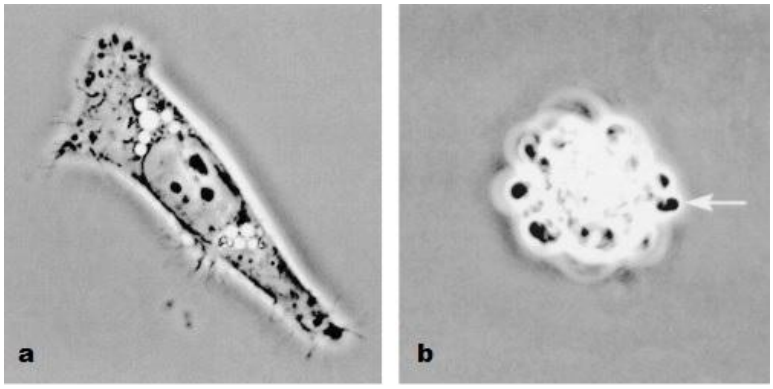
2.2.2. Apoptoz

Programlı hücre ölümü (apoptoz), embriyogenez döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca organizmanın şekillenmesi, hücreler arasındaki homeostazinin sağlanması ve savunmasında oldukça etkili olan karmaşık fizyolojik bir süreçtir (Tosun, vd., 2002). Hücresel veya çeşitli dış kaynaklarla aktive edilip genetik faktörler ile kontrol edilen bir seri protein ve molekülün iş gördüğü esas olarak fizyolojik koşullarda çalışan bir ölüm mekanizmasıdır. Hücrenin intiharı olarak da tanımlanabilir (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

Apoptoz terimi ilk olarak 1972'de Kerr ve arkadaşları tarafından nekrozdan farklı bir ölüm şekli için tanımlanmıştır (Kerr, et al., 1972). Bedenimizdeki her hücre belli bir süre yaşar ve zamanı gelince ölür. Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır (Alenzi, 2004). Apoptoz organizmanın normal gelişimi sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında görülebilen doğal bir fizyolojik süreçtir (Edinger and Thompson, 2004). Bu sayede canlılarda bulunan hücrelerin sayısı dengelenerek normal hücre homeostazisi sağlamaktadır. Örneğin; kurbağalarda metamorfoz sırasında kuyruğun kaybolması, insan embriyosundaki el parmakları arasında bulunan perdelerin yok olması apoptozla gerçekleşir. Ayrıca kemik iliğinde günlük $5x10^{11}$ kadar üretilen kan hücrelerinin sayısının dengelenmesi de apoptoz ile gerçekleşir (Cooper ve Hausman, 2006; Gültekin, vd., 2008).

Ayrıca, eğer bir organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, ya da hücre zarar görmüşse iç ve/veya dış faktörlerle uyarılarak o hücrenin intihar süreci başlatılır (Güleş ve Eren, 2008). Bu tip uyarıları alan hücrelerde uyarı sonrasında kimyasal ve morfolojik değişimler gözlenir. Öncellikle apoptoz sürecine giren hücreler

şekillerini kaybederek büzülmeye başlar. Daha sonra hücre zarında kabarcıklanmalar (blebbing) gözlenmeye başlanır. Hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir (Şekil 2.1). Kromatinler yoğunlaşır ve çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır (Collins, et al., 1997; Willingham, 1999; Nicotera and Melino, 2004). Son olarak hücrelerin etrafında farklı miktarlarda çekirdek veya diğer hücre içi yapıları içeren membranla çevrili 'apoptotik cisimcikler' adı verilen yapılar oluşur (Edinger and Thompson, 2004; Koçyiğit ve Çevik, 2011).

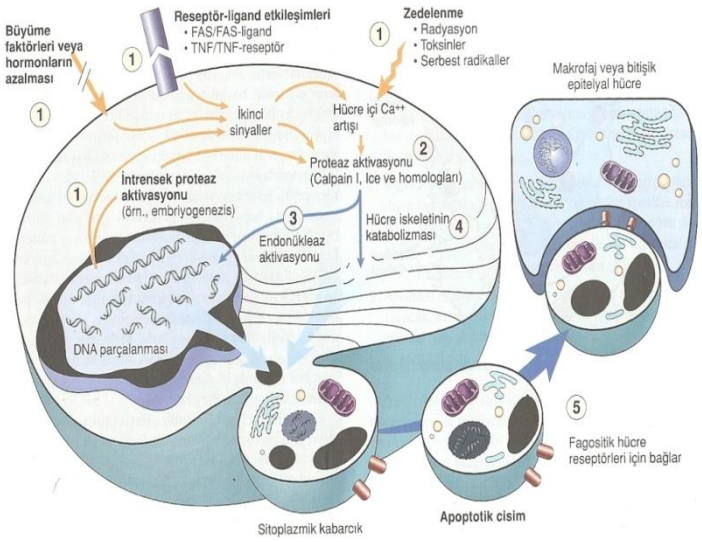


Şekil 2.1. Normal ve apoptoza uğramış hücrelerin morfolojik görüntüleri. a: normal hücre. b: apoptoza uğramış hücreler, ⟹ hücre zarındaki kabarcıklanmalar (blebbing) (Willingham, 1999).

Apoptoz mekanizmasında birbirini izleyen dört ana basamak vardır.

1. Hücrenin iç ve/veya dış faktörlerle uyarılarak hücre ölümü için programlanması,
2. *Kaspazlar* olarak adlandırılan hücre içi proteazların aktive edilmesiyle hücre ölümünün başlaması,
3. Makrofajlar tarafından apoptotik cisimlerin fagositoz edilmesi,
4. Apoptotik cisimlerin lizozomlarda yıkılması (Şekil 2.2) (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

Kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptit bağını kıran proteaz enzimlerin genel ismidir. Aktif merkezlerinde sistein amino asidi bulunmaktadır. Hücrede, normal koşullarda inaktif olarak bulunurlar. Apoptotik süreçte proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir şelale (kaskad) şeklinde birbirlerini aktive ederek çalışırlar (Koçyiğit ve Çevik, 2011).

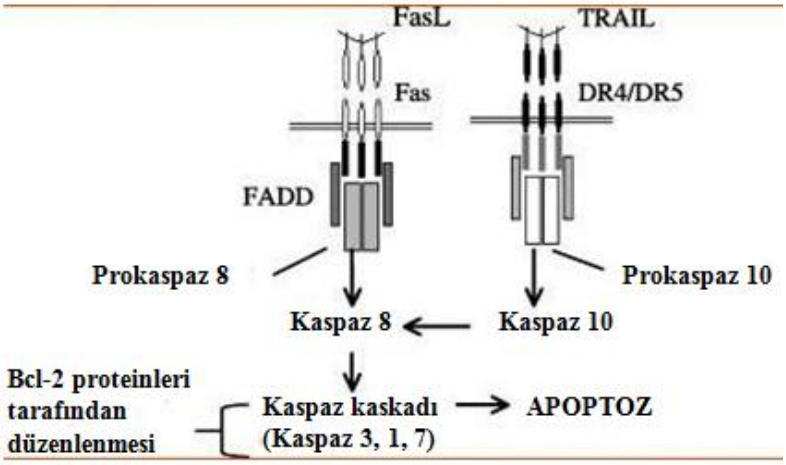


Şekil 2.2. Apoptoz sırasında meydana gelen olaylar (Kumar, vd., 2000).

Apoptotik hücre ölümünün iki ana mekanizması tanımlanmıştır. Bunlar dış yolak (ölüm reseptörleri) ve iç yolak (mitokondriyal) olarak adlandırılır. Bu iki yolağın birbirleriyle bağlantılı olduğu ve bir yolakta yer alan molekülün diğerini etkilediği belirtilmiştir (Wong, 2011).

Dış yolağın (ölüm reseptörleri) aktive edilmesinde hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri görev alır. Tümör nekroz faktör (TNF), DR4 ve DR5 veya Fas olarak isimlendirilen çeşitli ölüm reseptörlerine uygun olan ligantların bağlanmasıyla apoptoz süreci başlatılır (Şekil 2.3). Hücre yüzeyinde gerçekleşen bu bağlanmalar sonucunda, hücre içerisine iletilen sinyaller sayesinde kaspaz-8 veya -10'un reseptör aracılı

aktivasyonu ve onu izleyen kaspaz-3 ve -7 aktivasyonu ile apoptoz süreci ilerler (Ghobrial, et al., 2005 ;Yazıcı, vd., 2009; Wong, 2011).



Şekil 2.3. Ölüm reseptörleri (Fountoulakis and Tsatsoulis, 2004).

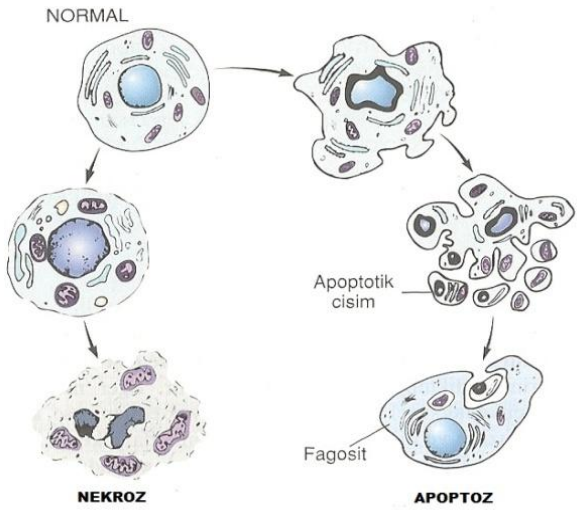
İç yolağın (mitokondriyal) aktivasyonunda ise B hücre lenfoma-2 (Bcl-2) gen ailesi önemli rol oynamaktadır (Dewson and Kluck, 2010). Bcl-2 ailesi pro-apoptotik (apoptozu indükleyici) ve anti-apoptotik (apoptozu baskılayıcı) üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede önemli role sahip olan bir gen grubudur (Verma, et al., 2006).

Bu ailenin 20'den fazla üyesi insanda saptanmıştır. Pro-apoptotik genler Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bim, Bcl-Xs, Krk, Mtd, Nip3, Nix, Nora, Bcl-B ve anti-apoptotik genler ise Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl/A1, Bcl-W, Bcl-G dir (Rastogi, et al., 2009; Taylor, et al., 2008). Hücrede pro-apoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza eğilimlidir. Anti-apoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza eğilimli değildir. Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-c gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir (Tsujimoto, 1998). Bax ya da Bak gibi pro-apoptotik üyeler heterodimerizasyon yoluyla kaspaz serbestleşmesini uyarır ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom-c'yi serbestleştirir. Dolayısıyla kaspazların aktivasyonuna yol açar (Tsujimoto, 1998; Taneja, et al, 2001).

Hem nekroz hem de apoptoz, hücre ölüm çeşitlerinden olmasına rağmen her ikisi arasında da biyokimyasal ve morfolojik farklılıklar görülmektedir. Nekrotik hücrelerde şişme, sitoplazma organellerinin dağılması, hücre membranının bozulması ve patlaması gerçekleşir. Bu patlama sonucunda ise hücre içeriği dış ortama salınır ve inflamasyon oluşur (Proskuryakov, 2003). Apoptozda ise kromatin materyalinin kondensasyonu ile ilişkili olarak çekirdeğin küçülmesi ve bunun sonucunda da sitoplazmik hacmin azalması gerçekleşir. Böylelikle hücrelerde de küçülme görülür. Bunun yanı sıra ise apoptotik hücreler küçük apoptotik cisimciklere parçalanır (Şekil 2.4) (Kam and Ferch, 2000). Nekrotik süreçte hücre enerjiye ihtiyaç duymaz, fakat apoptoz da ise mutlaka enerji kullanılmasına ihtiyaç vardır. Nekroz ile apoptoz arasındaki farklılıklar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Nekroz ile Apoptozun Karşılaştırılması (Çalışkan, 2000; Altunkaynak ve Özbek, 2008;).

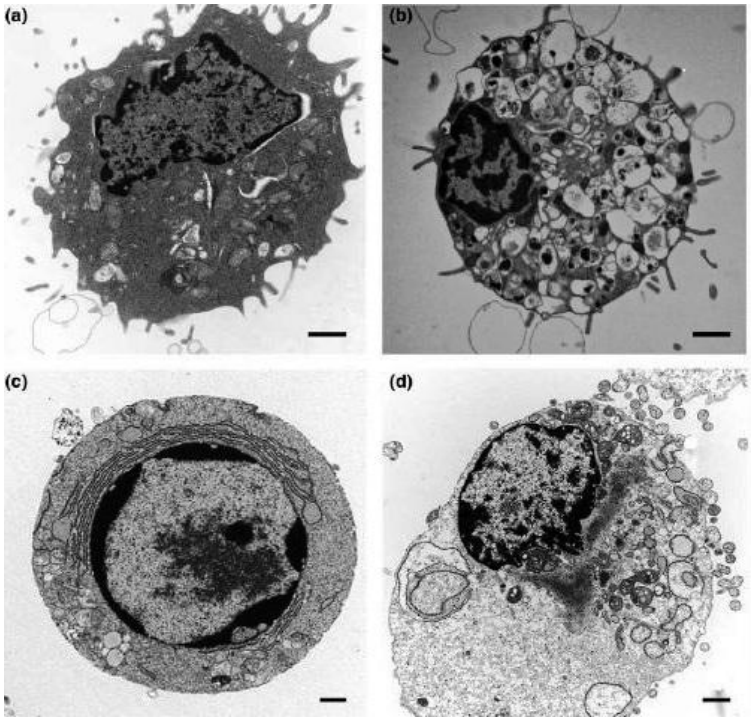
Nekroz	Apoptoz
Morfolojik Değişiklikler -Hücre membran bütünlüğü bozulmuştur. -Hücreler büyür ve şişer. -Hücre lizisi gerçekleşir. -Kromatin yoğunlaşması olmaz.	**Morfolojik Değişiklikler** -Hücre membranı sağlamdır. -Hücreler küçülür. -Organeller parçalanır. -Apoptotik cisimcikler oluşur. -Kromatin yoğunlaşması olur.
Biyokimyasal Özellikleri -İyon dengesi bozulur. -ATP gerekmez. -DNA rastgele parçalanır.	**Biyokimyasal Özellikleri** -İyon dengesi kontrollüdür. -ATP gerekir. -DNA kırıkları belirli baz sayısında kırılır.
Diğer Özellikler -Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. -Hücreler grup halinde ölürler. -Lizozomal enzimler sayesinde uzaklaştırılır. -İnflamasyon görülür.	**Diğer Özellikler** -Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. -Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür. -Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler. -İnflamasyon görülmez.



Şekil 2.4. Nekroz ve apoptoz arasındaki morfolojik değişiklikler (Kumar vd., 2000).

2.2.3. Otofaji

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomlarla birleşerek burada parçalanması ile gerçekleşen bir hücre ölümü çeşididir. Hücrelerin oksidatif stres, açlık ve büyüme faktörü yokluğu gibi çeşitli fizyolojik durumlar ile karşılaştığında hücre içi moleküllerin geri dönüşümü otofaji ile sağlanır (Şekil 2.5). Bu sayede hücre içi organellerin otofaji ile parçalanması sonucunda oluşan yapı taşları (örn. amino asitler) hücrenin kullanımı için yeniden kazandırılır (Öz Arslan, vd., 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise otofaji'nin metabolizmanın düzenlenmesi, hücre farklılaşması, hücre ölümü, yaşlanma ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojen yıkımında da etkili bir rol oynadığı belirlenmiştir (Edinger and Thompson, 2004; Gozuacık and Kimchi, 2004)



Şekil 2.5. Otofajik, apoptotik ve nekrotik hücre morfolojileri. a: normal hücre, b: otofajik hücre, c: apoptotik hücre, d: nekrotik hücre. Ölçü birimi 1µm (Edinger and Thompson, 2004).

2.3. Kanser ve Apoptozdan Kaçış

Canlı bir organizmada sağlıklı bir fizyolojik süreç için hücre çoğalması ile hücre ölümü arasında bir denge olmalıdır (Alenzi, 2004). Bu dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkabilecek en tehlikeli hastalıklardan birisi kanserdir. Kanser karmaşık bir hastalık olup 100'den fazla çeşidi bulunmaktadır (Cooper ve Hausman, 2006). Dünyada, kardiovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra, ölümlerin en sık ikinci nedenidir (Ölgen, vd., 2002).

Tarihçesi oldukça eski olan bu hastalık hakkındaki ilk bilgilere, Mısır papirüsleri, Babil çivi yazısı tabletleri ve eski Hint yazmalarında rastlanılmaktadır. Kanser ifadesi ilk olarak Hipokrat tarafından Yunanca *'karkinos'* (yengeç) kelimesinden türetilmiştir. Bu ismin vermesinin en önemli sebepleri kanserli doku etrafında oluşan

kan damarlarının (anjiyogenez) yengeç kıskaçlarına benzetilmesi ve kanser ağrısının, yengeç ısırması ile oluşan, ortadan çevreye doğru yayılan kemirici tarzdaki ağrıya benzerlik göstermesi nedeniyledir (Atıcı, 2007).

Kanser köken aldığı dokuya göre *karsinom, sarkom* ve *lösemi* (*lenfoma)* olmak üzere 3 ana grupta toplanmaktadır. Kanser hücrelerinin % 90'ını epitel kökenli olup '*karsinom'* olarak adlandırılmaktadır. Kas, kemik, kıkırdak gibi bağ dokudan gelişen tümörlere '*sarkom'* denilirken, kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişen tümörlere ise '*lösemi'* veya *'lenfoma'* denilmekte olup insan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturmaktadır (Cooper ve Hausman, 2006).

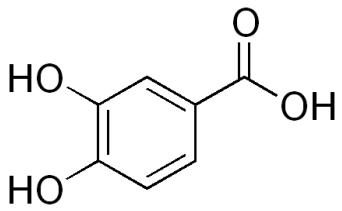
Eğer bir hücre çeşitli sebeplerden dolayı hasar görürse apoptoz süreci başlatılarak hücre yok edilir. Böylelikle diğer sağlıklı hücrelere zarar vermesi engellenmiş olur. Fakat yapılan çalışmalarda kanserleşen hücrelerin apoptoz sürecinden kaçtıkları ve apoptoza girmeyerek kontrolsüz olarak çoğalmaya başladıkları belirlenmiştir. Yetersiz olan apoptoza pro-apoptotik genlerdeki inaktive edici mutasyonlar ve/veya anti-apoptotik proteinlerin artan sentezinin neden olduğu belirlenmiştir (Atmaca, 2008*).*

Glioblastoma multiforme, astrositomalar içinde beyin dokusuna hızla yayılan ve onu yıkıma uğratan, sinir sisteminde görülme sıklığı yüksek, oldukça tehlikeli bir beyin tümörü çeşididir (Collet, et al., 2011). Bu hücreler, oldukça hızlı yayılım yeteneğine sahiptir (Coşar, vd., 2004). Bilinen iyileştirici (küratif) tedavisi olmamakla birlikte standart tedavisi cerrahi müdahale, radyasyon ve kemoterapiyi içermektedir (Zanotto-Filho, et al., 2011). Beynin en malign tümörü olan glioblastomalar için kullanılan kemoterapötik ilaçların kan-beyin engelini geçememesi, tümör çeşidinin kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirmesi ve normal hücreler üzerinde bu ilaçların toksik etkilerinin olmasından dolayı kemoterapide kullanılan ilaçların sayısı sınırlıdır (Reithmeier, et al., 2010). Tüm bu nedenlerden dolayı tanı konulduktan sonra bile hastaların yaşam süresi sıklıkla 1 yıldan daha az olmaktadır (Karmakar, et al., 2006). Glioblastoma hastalarının tedavisi için birçok klinik çalışma olmasına rağmen hedef hücrelerin yok edilmesinde yeni kemoterapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Özellikle son dönemde yapılan çalışmaların apoptozu uyarma yeteneğine sahip ajanların belirlenmesi yönünde yoğunlaştığı gözlenmektedir (Das,et al., 2008).

2.4. Protokatekuik Asit (3,4 - Dihidroksibenzoik asit, PCA)

Fenolik bileşikler, bitkilerde üretilen sekonder metabolitlerin bir sınıfıdır (Weng and Yen, 2012). Protokatekuik asit (3,4 dihidroksibenzoik asit, PCA) doğada yaygın olarak bulunan basit bir doğal fenolik bileşiktir (Tanaka, et al., 2011). Moleküler ağırlığı 154 g/mol olup, erime noktası 194-196 ^{o}C'dir. Beyaz kristal görünüme sahip olan bu maddenin kapalı kimyasal formülü $C_7H_6O_4$ şeklindedir (Chen, et al., 2008). Protokatekuik asitin açık kimyasal yapısı Şekil 2.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Protokatekuik asitin kimyasal yapısı (Fabiani,et al., 2011).

Protokatekuik asit günlük hayatta tükettiğimiz pek çok bitkinin içerisinde bulunmaktadır. Örneğin bu bileşik; üzüm, erik, badem, fındık, ceviz, soğan, zeytin, siyah pirinç, zeytinyağı, beyaz ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır. Ayrıca melisa, anason ve biberiye gibi çeşitli baharatlarda da bulunur (Krajka-Ku´zniak, et al., 2004; Ban, et al., 2007; Tanaka, et al., 2011). Çin' de, hipertansiyon ve karaciğerde görülen hastalıkların tedavisinde uzun zamandır doğal ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir (Liu, et al., 2002;Tanaka, et al., 2011). Protokatekuik asitin, anti-oksidan (Liu, et al., 2002; Liu, et al., 2008), anti-atheroskleroz (Wang, et al., 2011), anti-inflamatuar (Min, et al., 2010; Wang, et al., 2011,), kanser oluşumunu önleyici (kemopreventif) (Kawamori, et al.,1994; Tanaka, et al., 1995) gibi çeşitli biyolojik

aktivitelere sahip olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Bununla beraber, protokatekuik asitin farklı dozlarının doza ve zamana bağlı olarak karaciğer, mide, prostat, meme, lösemi gibi çeşitli kanser hücre dizileri üzerinde hücre çoğalmasını baskılayıcı etki gösterdiği yapılan *in vitro* çalışmalarda belirlenmiştir (Tseng,et al., 2000; Yip, et al., 2006; Lin, et al., 2007; Yin, et al., 2009; Anter, et al., 2011; Lin, et al., 2011). Protokatekuik asitin, normal karaciğer, akciğer, meme ve prostat hücre dizilerinde herhangi bir toksik etki göstermediğinin belirlenmesi maddenin en önemli avantajlarından birisidir (Lin, et al., 2007; Yin, et al., 2009).

Protokatekuik asitin, kanser hücrelerinin çoğalmasını hangi mekanizma ile engellediği hala tam olarak belirlenememiştir. Bu nedenle günümüzde etki mekanizması ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda kanserli hücrelerde, genel olarak hücre döngüsünü durdurarak ve/veya değişik sinyal yolakları üzerinden apoptoz mekanizmasını tetikleyerek hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (Tseng, et al., 2000; Yip, et al., 2006; Lin, et al., 2011). Ayrıca *in vitro* gen ekspresyonu ve *in vivo* metastaz modellerinde yapılan çalışmalarda hücrelerin göçünü engellediği, matriks bozulmasını azaltması sayesinde metastazı engellediği gösterilmiştir (Lin, et al., 2011).

Pek çok kanser hücresinde protokatekuik asitin etkisi çalışılmış olmasına rağmen, yapılan literatür taramasında protokatekuik asitin glioma hücreleri üzerindeki etkisi hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, T98G ve C6 glioma hücre dizileri üzerinde protokatekuik asitin farklı dozlarının hücre morfolojisi, çoğalması ve apoptoz ve/veya nekroz üzerindeki olası etkilerinin zamana bağlı olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

Deneysel çalışmamızın tamamı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Hücresel Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Deneylerde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler Çizelge 3.1 ve 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma
Fetal Bovine Serum (Fetal Dana Serumu, FBS)	Sigma
Penisilin-Streptomisin Çözeltisi	Lonza
Tripsin-EDTA Çözeltisi	Sigma
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Carlo Erba
Tripan Mavisi	Sigma
Hank's Balanced Salt Solution (Hank'ın Dengelenmiş Tuz Çözeltisi, HBSS)	Sigma
Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi, PBS)	Sigma
Protokatekuik Asit (3,4 Dihidroksibenzoik asit, PCA)	Sigma
3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5difeniltetrazolium bromid (MTT)	Sigma

Nötral Red (Nötral kırmızısı, NR)	Sigma
Hücre Ölümünü Belirleme Kiti	Roche
Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
%99.8'lik Etanol (C_2H_5OH)	Riedel de Haen
Formaldehit (CH_2O)	Riedel de Haen
Glasiyal Asetik Asit ($C_2H_4O_2$)	Riedel de Haen
Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$)	Sigma

Çizelge 3.2. Deneylerde Kullanılan Sarf Malzemeler.

25 cm^2'lik Kültür Kapları	Greiner Bio-One
75 cm^2'lik Kültür Kapları	Sarstedt
96 Kuyucuklu Kültür Kapları	Sarstedt
Tek Kullanımlık Serolojik Pipetler	Ratiolab
Steril Santrifüj Tüpleri	Corning
Steril Tek Kullanımlık Filtreler	Sartorius

Deneylerde kullanılan cam malzemeler kuru hava sterilizatöründe 120 ˚C'de 90 dk. tutularak, sıvı maddeler ise 0,2 μm'lik steril, tek kullanımlık filtrelerden geçirilerek kullanılmıştır.

3.2. Hücre Hatlarının Temini ve Kültüre Alınması

Deneylerde, Amerikan Kültür Koleksiyonu'ndan satın alınan ve daha önceden dondurularak -196 ˚C'de sıvı nitrojen tankında saklanan insan glioblastoma multiforme (T98G) ve sıçan glioma (C6) hücre hatları kullanılmıştır.

Hücre kültür işlemleri steril kabin altında gerçekleştirilmiş olup, her çalışmadan önce 15 dakika ultraviyole lamba ile ortam steril edildikten sonra, %70'lik alkol ile silinmiştir. Hücreler, oda sıcaklığında çözüldükten sonra 15 mL'lik santrifüj tüpüne, %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besi yeri içine aktarıldı ve 1200 devir/dakika 4 ˚C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstteki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan hücreler 5 mL besiyeri içeren 25 cm^2'lik kültür kaplarına ekilerek 37 ˚C' de, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren inkübatörde çoğaltılmıştır.

Hücreler yaklaşık olarak % 80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra 2 mL % 0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek inkübatöre kaldırıldı. 5 dakikalık bekleme süresi sonunda tabandan ayrılan hücreler, mikroskop altında kontrol edilerek 9 mL besi ortamı bulunan santrifüj tüpüne alınarak 1200 devir/dakika, 4 ˚C' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Dipte 2 mL kalacak şekilde üstteki sıvı alınarak ortamdan uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücreler pipet yardımıyla homojen hale getirildikten sonra 10 mL besi yeri içeren 75 cm^2'lik kültür kabına aktarılarak inkübatöre kaldırılmıştır. Kültür kaplarındaki hücreler, ters ışık mikroskobu kullanılarak canlılık, çoğalma ve kontaminasyon bakımından günlük olarak takip edilmiştir. Hücrelerin besi ortamı ise 2 gün de bir değiştirildi.

3.3. Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımı için tripan mavisi boyası kullanılmıştır. Bu yöntem temeli, canlı hücreler içlerine boyayı almazlar. Fakat ölü hücrelerde hücre zarı bütünlüğü bozulduğu için kontrolsüz bir şekilde boyar maddenin hücre içine girişi gerçekleşmektedir. Bu

nedenle tripan mavisi boyası sadece ölü hücrelerin zarından geçtiği için onları boyayarak görünür hale getirebilmektedir (Uliasz and Hewett, 2000).

Hücrelerin tabandan ayrılması için kültür kapları, 3 mL % 0,25'lik Tripsin-EDTA ile 5 dakika muamele edilmiştir. Tabandan ayrılan hücreler, içinde 9 mL besi yeri bulunan santrifüj tüpüne aktarılarak 1200 devir/dakika, 4 ˚C'de, 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda dipte 2 mL kalacak şekilde süpernatant atılmıştır. Homojenize hale getirilen hücreler, tripan mavisi ile oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra 10 µL alınarak hücre sayım cihazında (Cedex XS, Innovatis) sayılmıştır.

3.4. Hücrelerin Ekilmesi ve Protokatekuik Asit Dozlarının Hazırlanması

Her bir kuyucukta 100 µL'de $1x10^4$ canlı hücre olacak şekilde ekim yapılan kültür kapları 37 ˚C' de ve % 5 CO_2 içeren inkübatör de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Toz halde alınan protokatekuik asit (Sigma), etanol içinde çözülerek 2 mM'lık stok solüsyonu hazırlanmıştır. Deneylerde 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM'lık protokatekuik asit dozları kullanılmıştır. Her bir deney için taze stok hazırlandı. 24 saatlik inkübasyon sonunda kuyucuklara 100 µL olacak şekilde dozlar ilave edilerek hücreler 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İlaç içermeyen kuyucuklara ise 100 µL besi yeri ilave edilerek kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her bir doz için en az 8 kuyucuk kullanılmıştır.

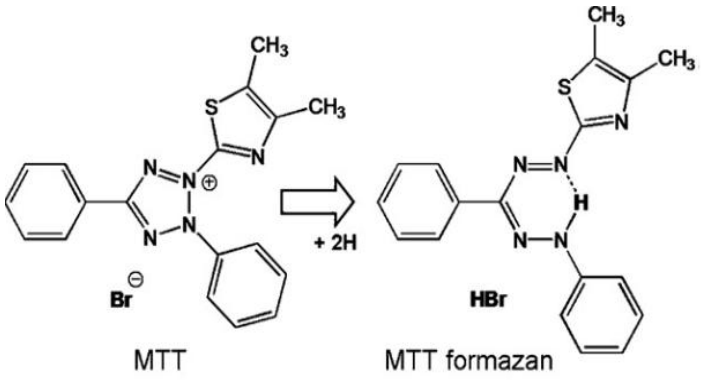
3.5. Hücrelerin Morfolojik Görüntülenmesi

Protokatekuik asitin farklı dozlarının uygulandığı T98G ve C6 hücre hatlarında doza ve zamana bağlı oluşan morfolojik değişimler ters ışık mikroskobunda (Nikon Eclipse, TC100) incelenmiştir. Doza ve zamana bağlı olarak oluşan hücresel değişiklikler Kameram 21 programı yardımıyla görüntülenmiştir.

3.6. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Hücre Çoğalmasının Belirlenmesi

Suda çözünebilen ve tetrazolyum tuzu olan 3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT) ilk olarak Mossmann tarafından tanımlanmış hücre çoğalmasını kantitatif ve kolorimetrik olarak ölçen bir yöntemdir (Mosmann, 1983). Bu yöntem genellikle hızlı çoğalan ve mitokondriyal aktivitesi yüksek olan hücre dizileri için uygundur (Alley, et al., 1988). Özellikle kanserli hücreler üzerinde yapılan ilaç denemelerinde ve doz ayarlanmasında hücre canlılığının tespit edimesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir (Abe and Matsuki, 2000).

Bu yöntem sayesinde, mitokondriyal redüktaz enzimi aracılığıyla canlı hücrelerin sarı renkli MTT boyasını, mor renkli formazana indirgenmesi spektrofotometrik olarak belirlemektedir (Şekil 3.1). Formazan, canlı hücrelerin zarından geçemediği için hücrelerin içinde birikir. Dimetil sülfoksit (DMSO) veya diğer uygun çözücü ilavesi ile formazanın serbest kalması kolorimetrik olarak tespit edilebilir. Hücrelerin MTT boyasını dönüştürme miktarı hücre canlılığının ölçüsü olarak alınabilir. Analiz sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile bir korelasyon göstermektedir (Fotakis and Timbrell, 2006).



Şekil 3.1. MTT'nin kimyasal yapısı ve formazana dönüşmesi (Stockert, et al., 2012).

Her deneyden önce 5 mg/mL MTT, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) içerisinde çözüldü ve 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek taze olarak hazırlanmıştır. Uygulama süreleri sonunda 20 µL MTT çözeltisi her bir kuyuya eklenerek 37 ˚C' de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, MTT boyası ortamdan pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırılmıştır. Canlı hücrelerce oluşturulan formazan tuzunun çözünmesi için her kuyucuğa 100 µL DMSO eklenerek karanlık ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Kültür kapları ELISA cihazında (BioTek, Powerwave XS) 550 nm dalga boyunda okutulmuştur.

MTT ürünü olan formazan yaşayan hücre sayısı ile doğrusal bir ilişki içinde olduğundan, ilaç uygulanan kuyucukların optik yoğunluğu, kontroldeki canlı hücrelerin yüzdesine göre hesaplanmıştır. Bu işlem için ilaç uygulanan her bir kuyudaki hücre absorbansı x 100 / kontrol kuyucuğunun absorbansı şeklinde formüle edilerek canlılık % olarak hesaplanmıştır.

3.7. Lizozomal Aktiviteye Dayalı Hücre Çoğalmasının Belirlenmesi

Kolorimetrik hücre canlılığı belirleme yöntemlerinden biri olan nötral kırmızısı (3-amino-7-dimetil-2-metilphenazin hidroklorid), canlı hücrelerin lizozomunda biriken suda çözünebilen katyonik bir boyadır (Borenfreund and Puerner, 1984; Popiolkiewicz, et al., 2005; Weyermann, et al., 2005). Nötral kırmızısının hücre içine alımı endositozla gerçekleşir (Putnam, et al., 2002). Hücrelerin lizozomal membranlarında oluşan hasar sonucunda, nötral kırmızısı boyasının membrana bağlanması zorlaşır. Böylelikle nötral kırmızısı boyasının lizozomlarda birikmesi gerçekleşmez. Bu nedenle de nötral kırmızısı yöntemi yaşayan-sağlıklı veya hasarlı-ölü hücrelerin boyayı almalarındaki farklılığa dayanır (Komissarova, et al., 2005).

Bu yöntemde farklı protokatekuik asit dozları ile uygulanan hücreler ilk olarak 37 ˚C'ye ısıtılmış phosphate buffered saline (PBS) ile yıkanmıştır. Toz haldeki nötral kırmızısı 1:100 oranında DMEM ile çözüldü ve her bir kuyucuğa 100 µL ilave edilerek 37 ˚C' de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür kaplarındaki

boyanın uzaklaştırılması için tüm kuyucuklar 100 µL PBS ile yıkandı ve kurutma kâğıdı üzerinde ters çevrilerek 1-2 dakika bekletilmiştir. Ardından taze hazırlanmış fiksatif solüsyonundan (1 mL formaldehit:1 mL kalsiyum klorür) 100 µL ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletilerek süre sonunda yine kültür kapları ters çevrilerek kurutma kâğıdı üzerinde 1-2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra taze hazırlanan okutma solüsyonundan (1 mL asetik asit:99 mL %50'lik etanol) 100 µL tüm kuyucuklara ilave edilerek oda ısısında 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda solüsyonun homojen hale gelmesi için 1 dakika çalkalandıktan sonra ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Nötral kırmızı boyası, ışıkta bozulduğu için aşamalar karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Nötral kırmızısı boyası yaşayan hücre sayısı ile doğrusal bir ilişki içinde olduğundan, ilaç uygulanan kuyucukların optik yoğunluğu, kontroldeki canlı hücrelerin yüzdesine göre hesaplanmıştır. Bu işlem için ilaç uygulanan her bir kuyudaki hücre absorbansı x 100 / kontrol kuyucuğunun absorbansı şeklinde formüle edilerek canlılık % olarak hesaplanmıştır.

3.8. Hücre Ölümünün ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Protokatekuik asitin, hücre canlılığı üzerinde etkili olduğu dozlar belirlendikten sonra bu etkinin apoptoza bağlı olup olmadığını belirlemek üzere Hücre Ölümü Belirleme Kiti (Cell Death Detection ELISA Plus Kit, Roche) kullanılmıştır.

Apoptozu belirlemek için seçilen protokatekuik asit dozları uygulanan hücrelerin hücre lizatları kullanılırken, nekroz için ise bu kuyucuklardaki süpernatantlar kullanılmıştır. Protokatekuik asit uygulanan hücreler ise kontrol grubu olarak değerlendirilerek aynı işleme tabii tutulmuştur. Alınan 20 µL örnekler kitte bulunan streptavidin kaplı kültür kaplarına eklenmiştir. Üzerlerine histon proteinlerine ve DNA fragmentelerine karşı Anti- Histon Biotin ve Anti-DNA peroksidaz antikorları içeren reaktiften 80 µL eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalatılarak bekletilmiştir. Bu süre içinde Anti-Histon Biotin antikoru, nükleozomlardaki histonlara tutunurken

diğer taraftan da streptavidin kaplı plakalara tutunmaktadır. Anti DNA Peroksidaz da nükleozomlar arasındaki DNA'lara bağlanmaktadır. Kalan bileşenler ise yıkama basamaklarıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. İmmunokomplekslere tutunmuş olan peroksidazların ölçümleri 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit, (ABTS) substratı ile 405-490 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Kitin içerisinde bulunan %100 apoptotik veya nekrotik hücre lizatlarındaki histon ve DNA fragmentleri miktarındaki artış, denenen dozlardaki apoptoz miktarındaki artışla doğru orantılı olarak değerlendirilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analizler

Her bir deney birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrar edilmiştir. Deney grupları arasındaki farklılıklar, Statistics Program for Social and Science 12.0 (SPSS) programında, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle değerlendirilmiştir. Kontrole göre % 50 oranında hücre ölümüne neden olan doz hesaplanarak, IC_{50} değeri olarak kabul edilmiştir. $p<0.05$ düzeyindeki sonuçlar arasındaki farklılıklar, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, istatistiksel değerlendirmesi yapılmış olan verilerin grafiklerinin hazırlanmasında ise Microsoft Excel (Office 2007) programı kullanılmıştır. Çizilen grafiklerde istatistiksel anlamlılıklar uygun işaretler ile gösterilmiştir.

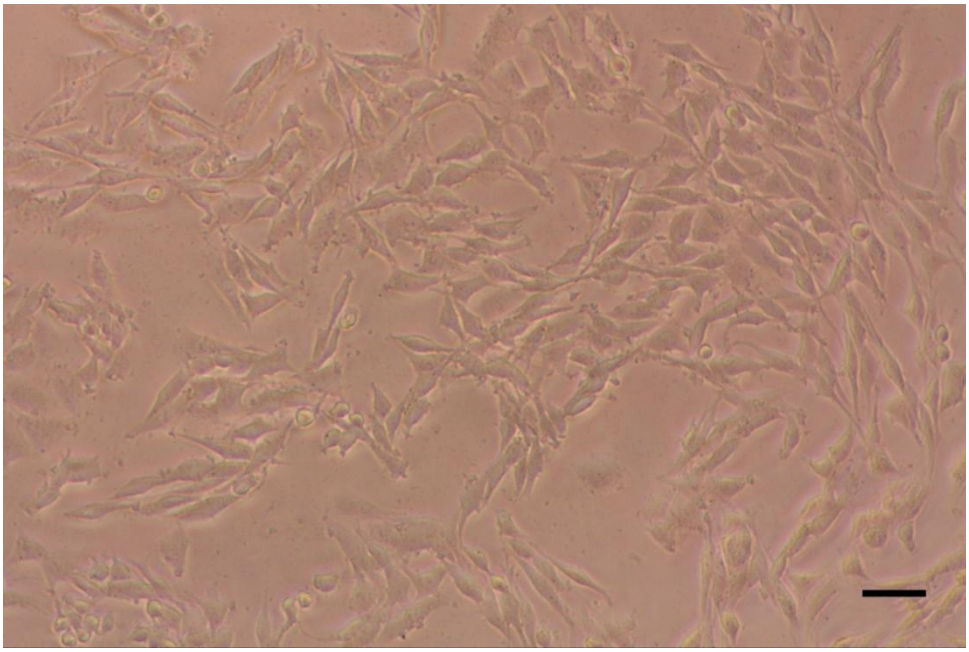
4. BULGULAR

4.1. Protokatekuik Asitin Glioma Hücre Dizileri Üzerindeki Morfolojik Etkilerinin Belirlenmesi

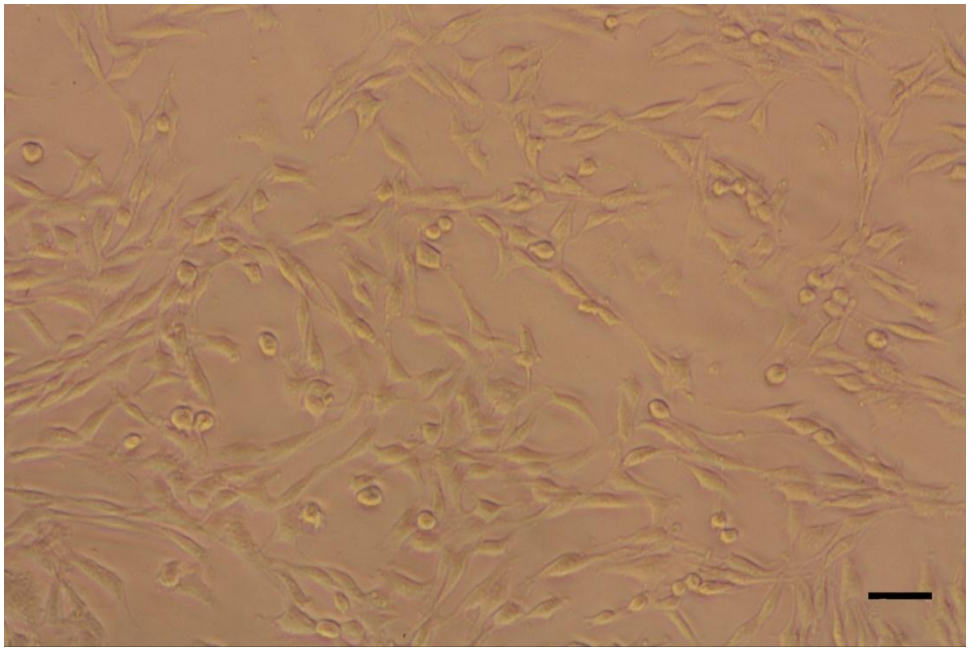
Çalışmada, denenen 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM protokatekuik asit dozlarının insan (T98G) ve sıçan glioma (C6) hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik morfolojik etkileri ters ışık mikroskobu yardımıyla incelenmiştir.

Protokatekuik asit dozları 24 saat sonra T98G hücrelerinde morfolojik olarak herhangi bir değişiklik yapmamıştır.

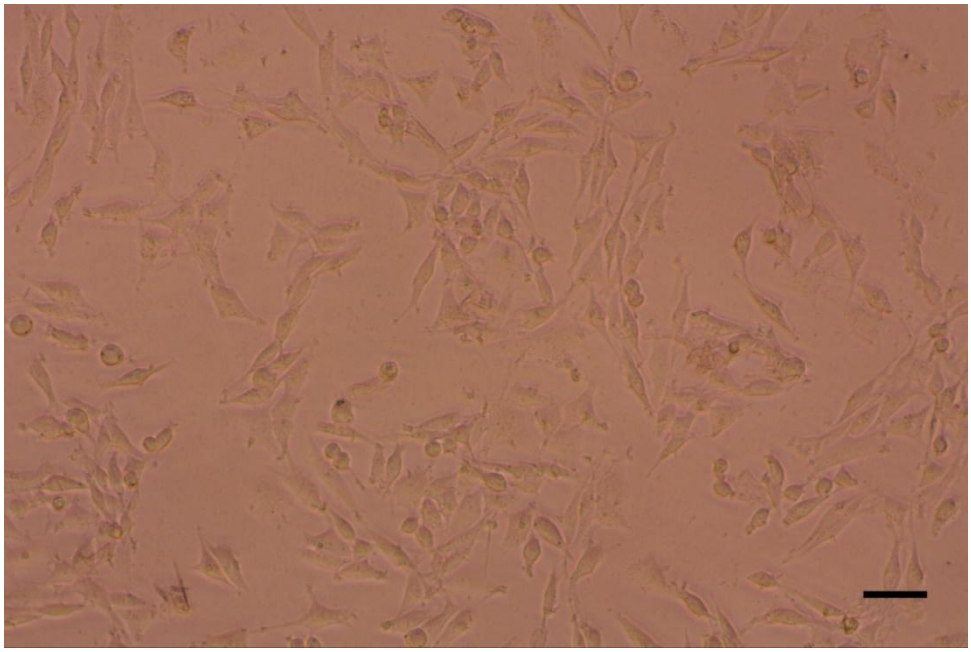
Protokatekuik asitin 0,5; 0,75; 1 ve 1,5 mM dozlarının C6 hücreleri üzerinde 24 saatte herhangi bir morfolojik değişiklik yaratmadığı ve hücre yoğunluğu açısından bakıldığında kontrol hücreleriyle arasında belirgin bir farklılık gözlenmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Fakat 2 mM dozundan itibaren kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, canlı hücre sayısının azalmasıyla birlikte belirgin şekilde hücrelerde morfolojik değişiklikler gözlenmeye başlanmıştır (Şekil 4.3). Hücrelerin mekik şeklinde olan normal hücre görüntülerinin yuvarlaklaşma eğiliminde olduğu ve normal hücrelere göre daha da küçüldükleri tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin 2,5; 3 ve 3,5 mM dozlarında da aynı şekilde devam ettiği görülmüştür (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).



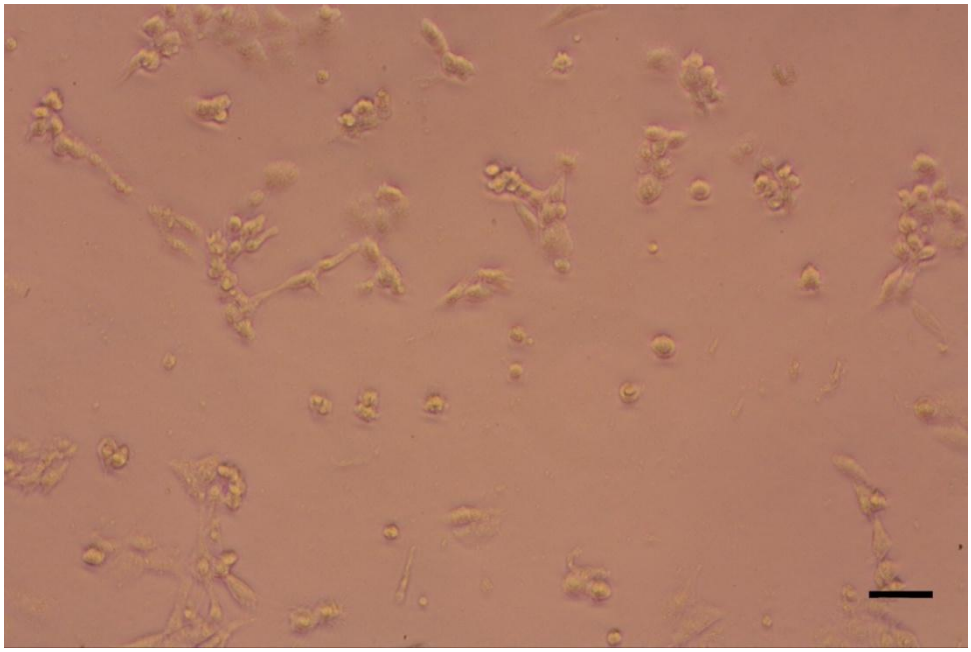
Şekil 4.1. Kontrol grubu olan C6 hücrelerinin 24 saat sonraki değişikliklerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 μm.



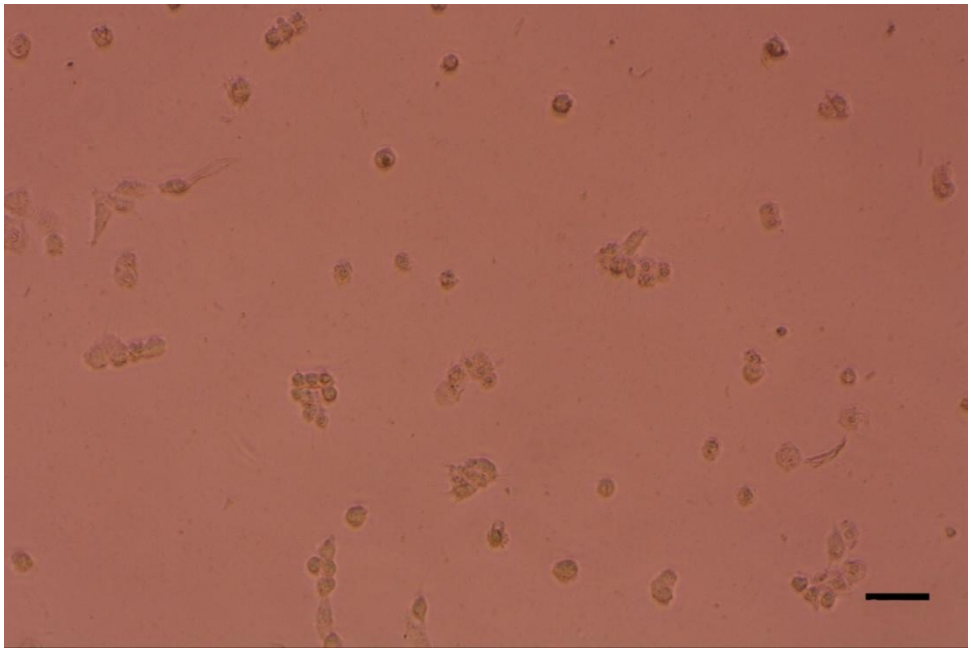
Şekil 4.2. Protokatekuik asitin 1,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 μm.



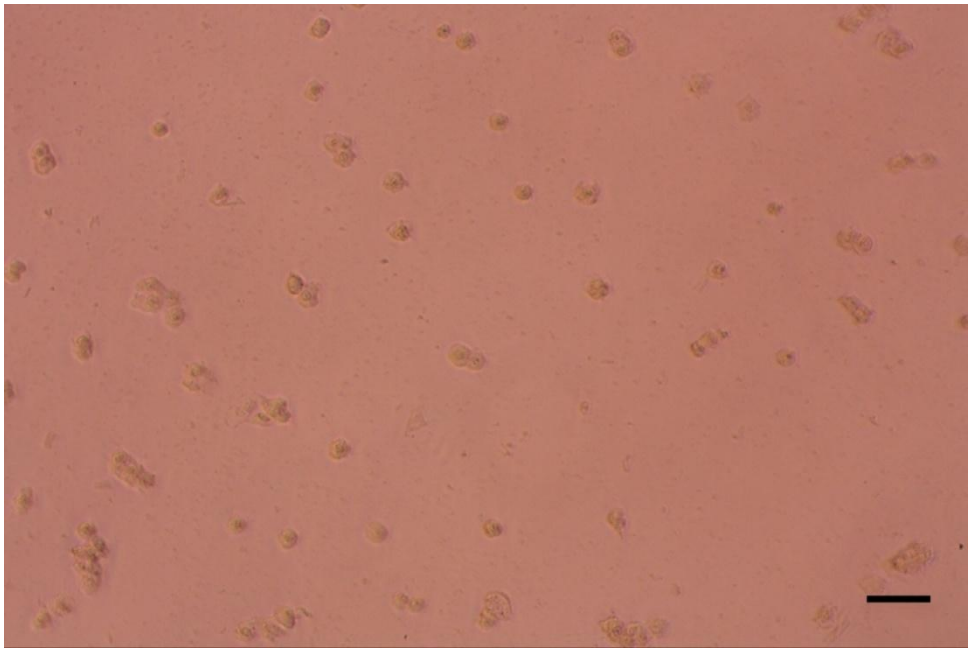
Şekil 4.3. Protokatekuik asitin 2 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 μm.



Şekil 4.4. Protokatekuik asitin 2,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 μm.



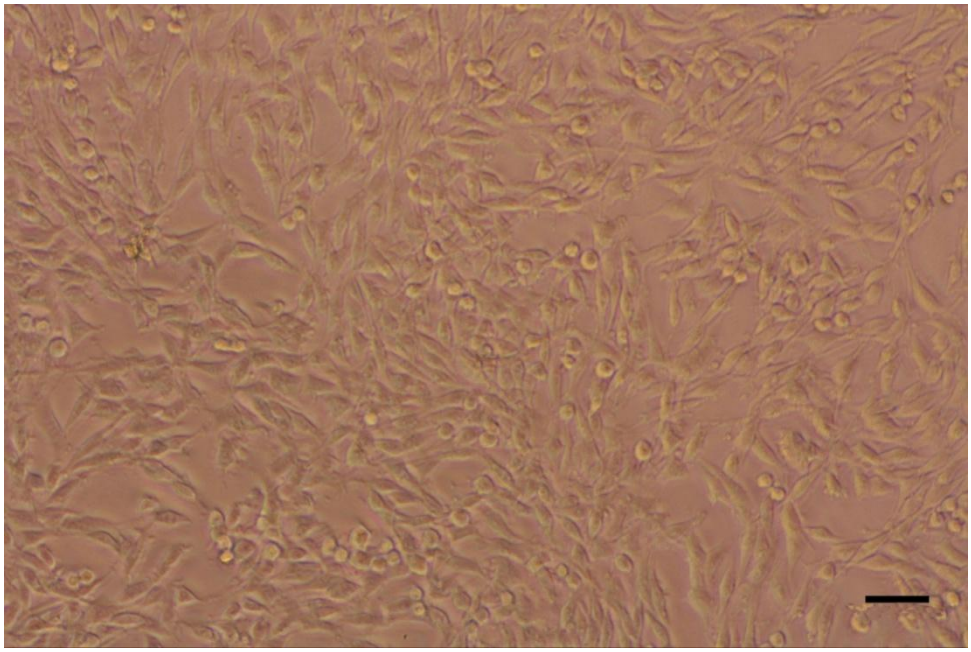
Şekil 4.5. Protokatekuik asitin 3 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 μm.



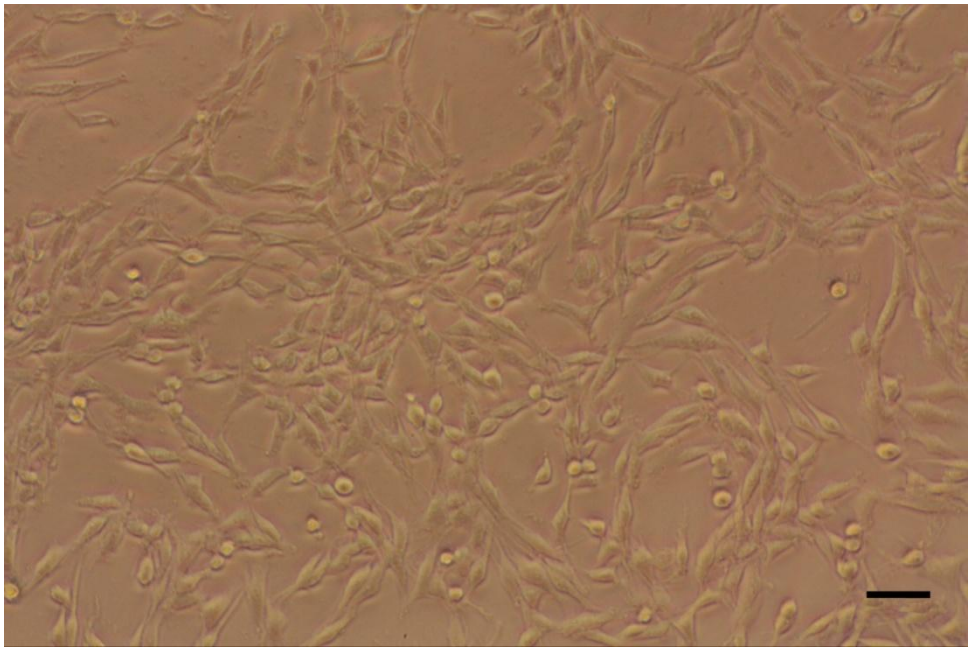
Şekil 4.6. Protokatekuik asitin 3,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 μm.

Protokatekuik asit dozları ile 48 saat muamele edilen T98G hücrelerinde de morfolojik olarak herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

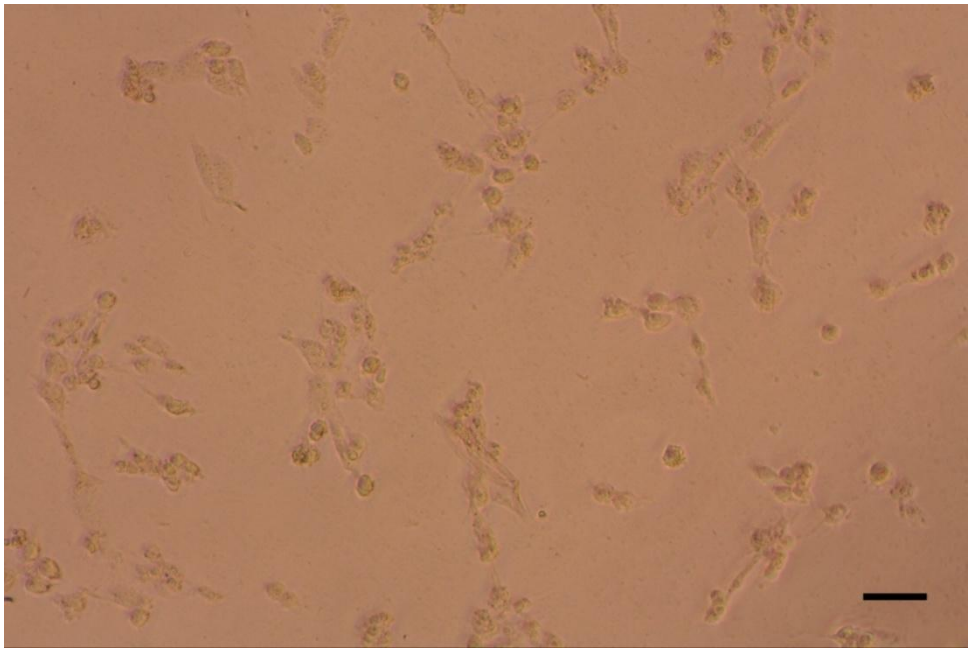
C6 hücrelerinde denenen 0,5; 0,75 ve 1 mM protokatekuik asit dozlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 48 saatte de morfolojik olarak herhangi bir değişiklik yaratmadığı ve hücre yoğunluğu açısından bakıldığında kontrol hücreleriyle arasında belirgin bir farklılık gözlenmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.7). 24 saatteki değişikliklerden farklı olarak ise 48 saatte hücre yoğunluğunun azalması ve morfolojik değişikliklerin 1,5 mM dozundan itibaren görülmeye başlamıştır (Şekil 4.8). Artan doza bağlı olarak canlı hücre sayısındaki azalış devam ederken, hücrelerde morfolojik değişikliklerin de daha belirgin bir şekilde devam ettiği tespit edilmiştir. Normal morfolojileri mekik şeklinde olan hücrelerin görüntülerinin yuvarlaklaşma eğiliminde olduğu ve normal hücrelere göre daha da küçüldükleri görülmüştür. Bu morfolojik değişikliklerin 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM dozlarında da aynı şekilde devam ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12).



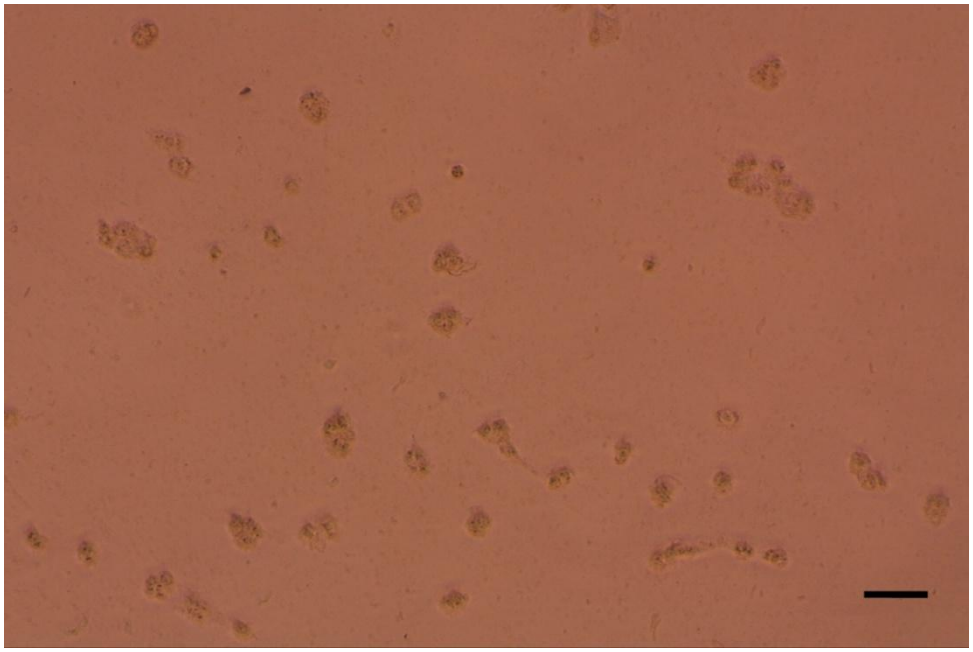
Şekil 4.7. Kontrol grubu olan C6 hücrelerinin 48 saat sonraki değişikliklerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 μm.



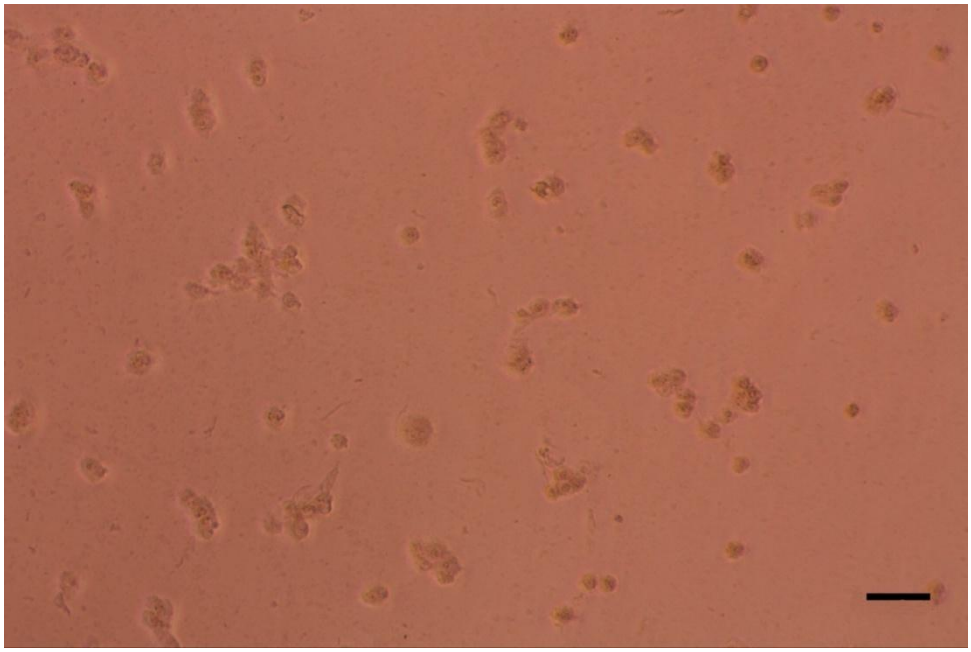
Şekil 4.8. Protokatekuik asitin 1,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 μm.



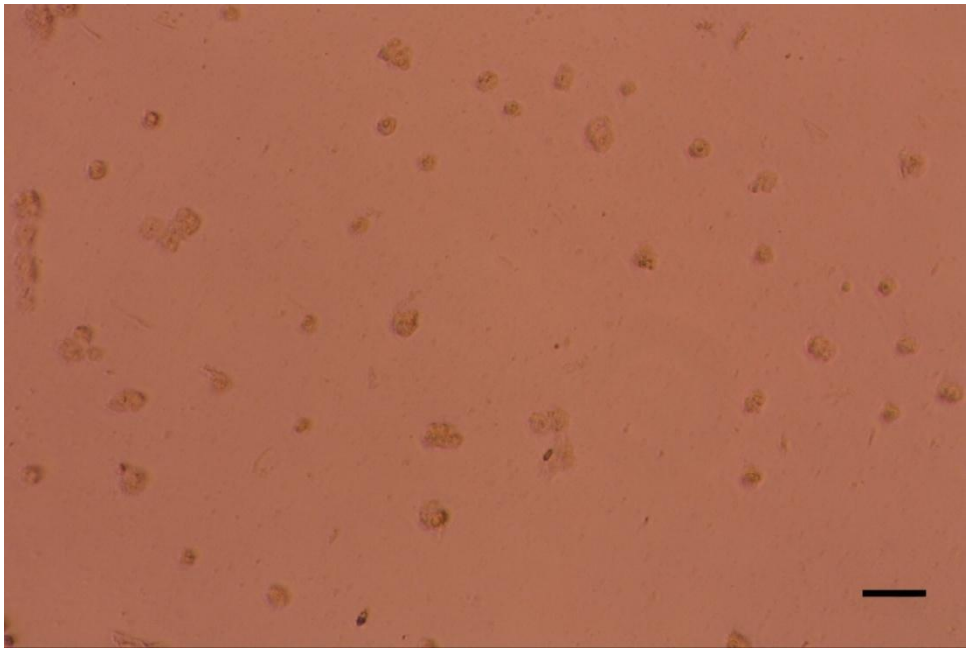
Şekil 4.9. Protokatekuik asitin 2 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 µm.



Şekil 4.10. Protokatekuik asitin 2,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50µm



Şekil 4.11. Protokatekuik asitin 3 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 μm.



Şekil 4.12. Protokatekuik asitin 3,5 mM'lık dozunun C6 hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. Ölçü birimi: 50 μm.

4.2. Protokatekuik Asitin Glioma Hücre Dizileri Üzerindeki Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Çoğalmayı Baskılayıcı Etkilerinin Belirlenmesi

Protokatekuik asitin mitokondrial aktiviteye dayalı hücre çoğalması üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada, 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM protokatekuik asit dozları 24 ve 48 saat süre ile glioma hücre dizileri üzerinde denenmiştir.

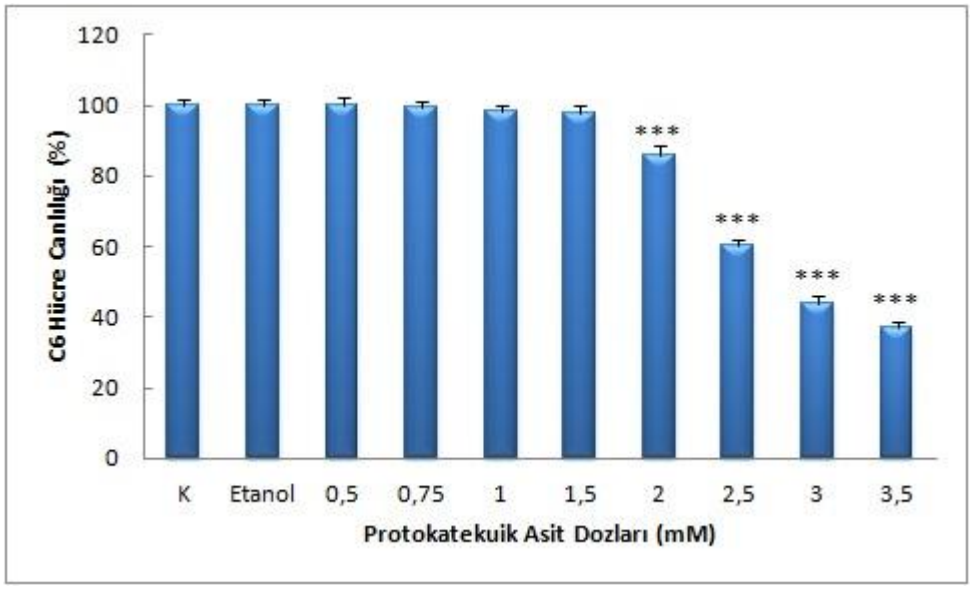
Yapılan deneylerde 24 saat protokatekuik asit dozları ile muamele edilen T98G hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir ($p>0,05$).

C6 hücreleri ile 24 saat muamelesinde ise 0,5; 0,75; 1 ve 1,5 mM dozlarında çoğalmayı baskılayıcı bir etki gözlenmemesine rağmen ($p>0,05$), 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM dozlarında hücre yaşam oranlarında kontrole göre sırasıyla % 15, 40, 56 ve 64 oranında bir azalma olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.13). Kontrole göre % 50 oranında sitotoksik etki gösteren doz olan IC_{50} değeri ise 24 saatte 2,79 mM olarak hesaplanmıştır.

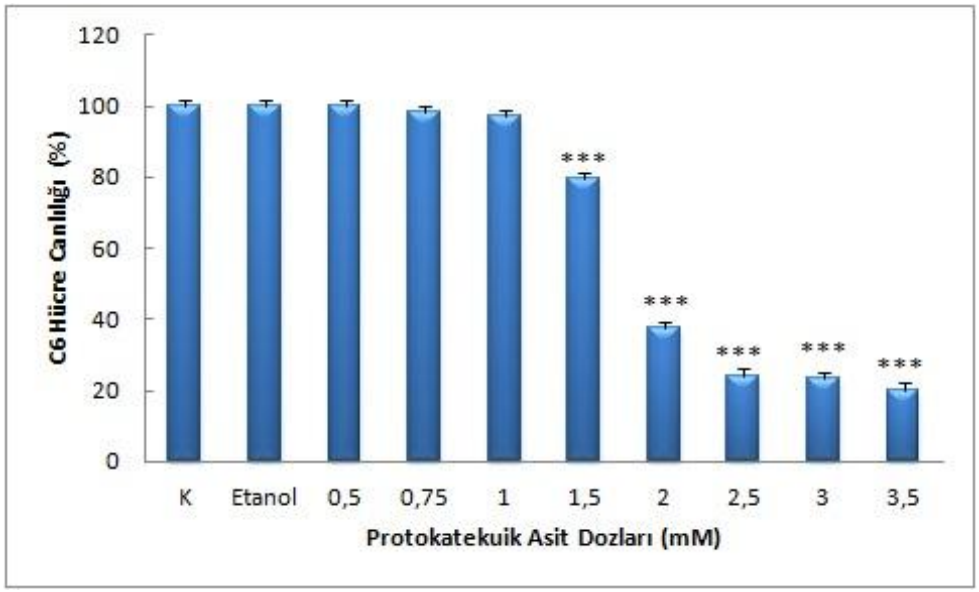
Yapılan deneylerde 48 saat protokatekuik asit dozları ile muamele edilen T98G hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Protokatekuik asitin C6 hücreleriyle 48 saat muamelesi sonucunda ise 0,5; 0,75 ve 1 mM dozlarında etki gözlenmezken ($p>0,05$); 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM dozlarında hücre yaşam oranını sırasıyla yaklaşık % 21, 63, 76, 77 ve 80 oranında azalttığı belirlenmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.14). 48 saatteki IC_{50} değeri ise 1,84 mM olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca protokatekuik asitin çözücüsü olarak kullandığımız en yüksek doz (3,5 mM) içinde bulunan etanol miktarının hem 24 saat hem de 48 saatte hücre yaşam oranı üzerinde herhangi baskılayıcı etki göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.13. Protokatekuik asit dozları ile 24 saat muamele edilen C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: p<0,001).



Şekil 4.14. Protokatekuik asit dozları ile 48 saat muamele edilen C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: p<0,001).

4.3. Protokatekuik Asitin Glioma Hücre Dizileri Üzerindeki Lizozomal Aktiviteye Dayalı Çoğalmayı Baskılayıcı Etkilerinin Belirlenmesi

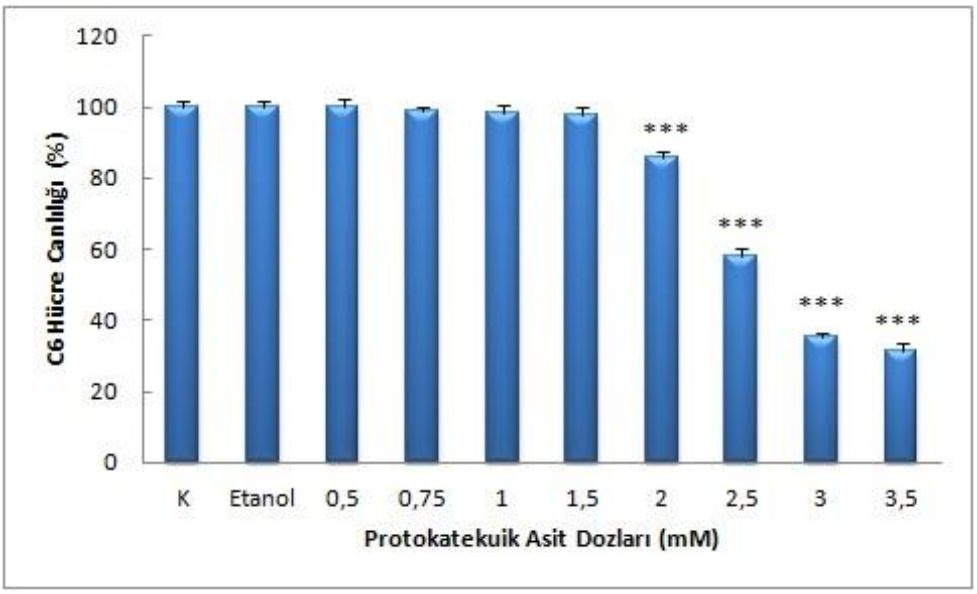
Lizozomal aktiviteye dayanarak hücre çoğalmasını belirleyen NR yöntemi deney sonuçlarına göre protokatekuik asit dozları ile 24 saat muamele edilen T98G hücrelerinin çoğalmayı baskılayıcı bir etki göstermediği tespit edilmiştir ($p>0,05$).

C6 hücrelerinde ise 24 saatte 0,5; 0,75; 1 ve 1,5 mM protokatekuik asit dozlarında çoğalmayı baskılayıcı etkisi gözlenmezken ($p>0,05$), 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM dozlarında yaklaşık olarak sırasıyla % 15, 42, 65 ve 69 oranında hücre yaşam oranının azaldığı belirlenmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.15). 24 saatteki IC_{50} değeri ise 2,67 mM olarak hesaplanmıştır.

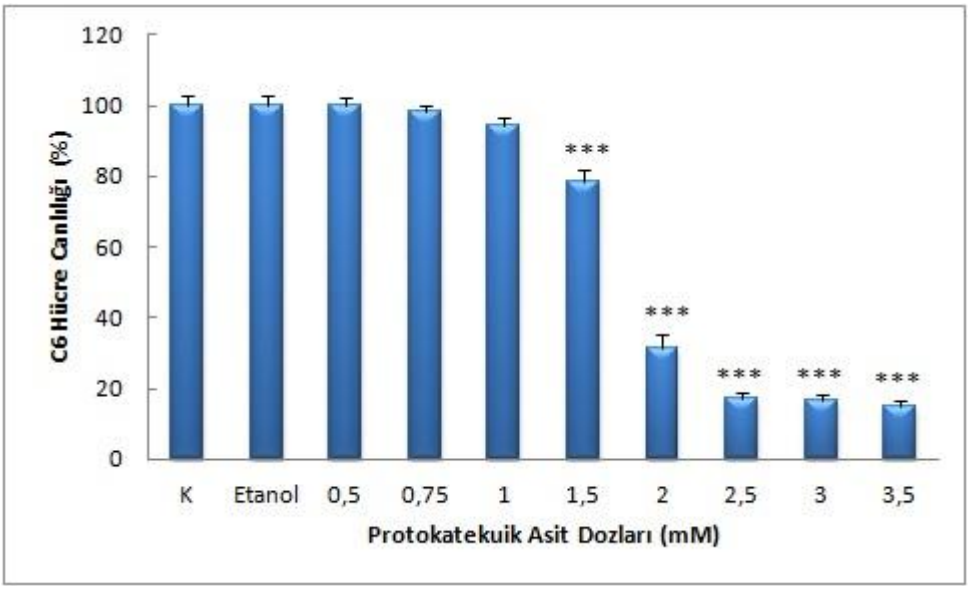
Protokatekuik asit ile 48 saat muamele edilen T98G hücreleri üzerindeki çoğalmayı baskılayıcı etkisi kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında belirgin bir etkinin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).

Protokatekuik asitin C6 hücreleriyle 48 saat muamelesi sonucunda ise 0,5; 0,75 ve 1 mM dozlarında herhangi bir etki gözlenmezken ($p>0,05$), 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM dozlarında ise sırasıyla yaklaşık olarak % 12, 69, 83, 84 ve 85 oranında hücre yaşam oranını azalttığı belirlenmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.16). 48 saatteki IC_{50} değeri ise 1,79 mM olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca protokatekuik asitin çözücüsü olarak kullandığımız en yüksek doz (3,5 mM) için de bulunan etanol miktarının hem 24 saat hem de 48 saatte hücre yaşam oranı üzerinde herhangi baskılayıcı etki göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.15. Protokatekuik asit dozları ile 24 saat muamele edilen C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin lizozomal aktivite bakımından değerlendirilmesi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: p<0,001).



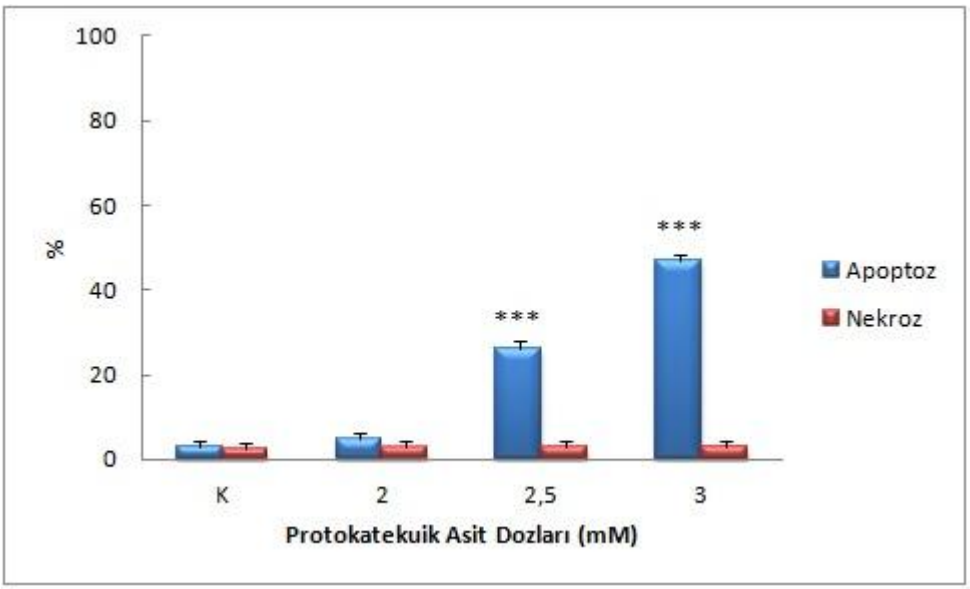
Şekil 4.16. Protokatekuik asit dozları ile 48 saat muamele edilen C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin lizozomal aktivite bakımından değerlendirilmesi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: p<0,001).

4.4. Protokatekuik Asitin Glioma Hücre Dizileri Üzerindeki Apoptotik ve/veya Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi

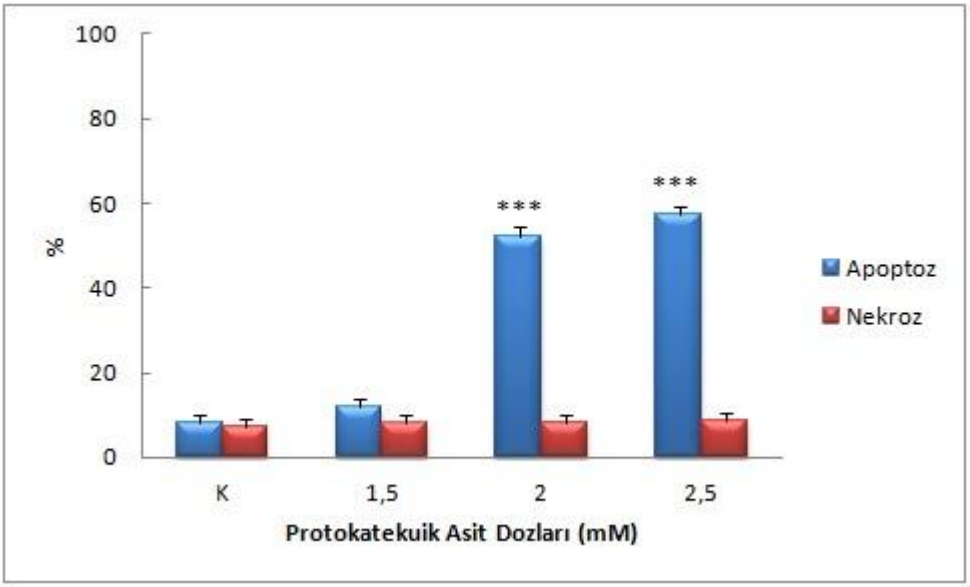
Bu yöntemde, hücre ölüm çeşitlerinden apoptoz ve/veya nekroz oluşumunu belirlemek için Hücre Ölümü Belirleme Kiti (Roche) kullanılmıştır. Daha önce yapılan MTT ve NR deneylerinin sonuçlarına göre protokatekuik asitin denenen tüm dozlarının T98G hücre dizisi üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi gözlenmediği için bu yöntem sadece C6 hücre dizisi üzerinde denenmiştir.

Çalışmamızda C6 hücreleri üzerinde protokatekuik asitin apoptotik ve/veya nekrotik etkilerini belirlemek için 2; 2,5 ve 3 mM dozları seçilerek 24 saat süre ile uygulanmıştır. Kitin içerisinde bulunan pozitif kontrol % 100 apoptotik ya da nekrotik hücre olarak kabul edilmiştir. Seçilen dozlar pozitif kontrole göre kıyaslandığında sırasıyla % 4,9 ($p>0,05$); 25,9 ve 46,9 'luk ($p<0,001$) apoptotik etki tespit edilmiştir. Aynı dozlarla muamele edilen hücrelerde ise nekrotik etkinin sırasıyla % 2,79; 2,87 ve 3,21 olduğu hesaplanmıştır ($p>0,05$; Şekil 4.17).

Protokatekuik asitin, C6 hücreleri üzerinde apoptotik ve/veya nekrotik etkilerini belirlemek için 1,5, 2 ve 2,5 mM dozları seçilerek 48 saat süre ile uygulanmıştır. Kitin içerisinde bulunan pozitif kontrol % 100 apoptotik ya da nekrotik hücre olarak kabul edilmiştir. Seçilen dozlar pozitif kontrole göre kıyaslandığında sırasıyla % 11,8 ($p>0,05$); 52,1 ve 57,4 'lik ($p<0,001$) apoptotik etki tespit edilirken, aynı dozlarla muamele edilen hücrelerde ise nekrotik etkinin sırasıyla % 8,08; 8,21 ve 8,80 olduğu hesaplanmıştır ($p>0,05$;Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Protokatekuik asitin uygulandığı C6 hücrelerinin 24 saatteki apoptotik ve nekrotik etki yüzdeleri. K: Kontrol. (***: p<0,001).



Şekil 4.18. Protokatekuik asitin uygulandığı C6 hücrelerinin 48 saatteki apoptotik ve nekrotik etki yüzdeleri. K: Kontrol. (***: p<0,001).

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Teknolojinin ilerlemesi ve yeni tedavi şekillerinin gelişmesine rağmen kanserle ilişkili ölümlerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bazı kanser türlerinin tedavisinde başarılı sonuçlar alınsa da hala pek çok kanser türü için kesin bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Glioblastoma multiforme; hızlı yayılan, kısa sürede hastanın ölümü ile sonuçlanan oldukça tehlikeli beyin tümörlerinden birisidir (Collet, et al., 2011). Hastaya tedavi amacı ile öncellikle cerrahi müdahale, ardından ise radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Fakat cerrahi müdahale de tümörün bulunduğu bölgenin tam olarak temizlenememesi, kemoterapi de ise kullanılan ilaçların yan etkilerinin fazla olması ve/veya zaman içerisinde kanser hücrelerinin kullanılan ilaçlara direnç kazanması tedaviyi olumsuz etkilemektedir. Tüm bu müdahalelere rağmen hastanın yaşam süresi en fazla 1 ya da 2 yıl uzatılabilmektedir (Salford, et al., 2002; Liu, et al., 2011).

Günümüzde doğada bulunan bitkisel kaynaklı pek çok maddenin kanseri önleyici ya da kanser hücrelerinde çoğalmayı baskılayıcı etkisinin olup olmadığı halen araştırılmaktadır. Bu tip maddeler doğal kaynaklı oldukları için genellikle kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar gibi normal hücreler üzerinde olumsuz etkilere sahip değildirler. Protokatekuik asit de hemen hemen tüm bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bir bileşiktir (Guan, et al., 2009; Tanaka, et al., 2011). Özellikle üzüm, erik, badem, fındık, ceviz, soğan, zeytin, siyah pirinç, zeytinyağı, yeşil çay, siyah çay, beyaz ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır. Ayrıca melisa, anason ve biberiye gibi çeşitli baharatlarında protokatekuik asit bakımından zengin olduğu bilinmektedir (Krajka-Ku´zniak, et al., 2004; Ban, et al., 2007; Tanaka, et al., 2011). Protokatekuik asitin, anti-oksidan (Liu, et al.,2002; Liu, et al., 2008), anti-atheroskleroz (Wang, et al., 2011), anti-inflamatuar (Min, et al., 2010; Wang, et al., 2011) ve kanser oluşumunu önleyici (Kawamori, et al.,1994; Tanaka, et al., 1995) aktivitelerinin yanı sıra, çeşitli kanser hücre dizilerinde hücre çoğalmasını baskılayıcı etki gösterdiği (Tseng, et al., 2000; Yip, et al., 2006; Anter, et al., 2011; Lin, et al., 2011) fakat normal hücreler

üzerinde böyle bir etkiye sahip olmadığı yapılan *in vitro* çalışmalarda rapor edilmiştir (Lin, et al., 2007; Yin, et al., 2009).

Bu amaçla, çalışmada protokatekuik asitin farklı dozlarının insan glioblastoma multiforme (T98G) ve sıçan glioma (C6) hücre dizilerindeki hücre morfolojisi, çoğalması ve apoptotik-nekrotik etkileri 24 ve 48 saat süreyle incelenmiştir.

Yip ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada 4 gün (96 saat) boyunca 100 μmol/L protokatekuik asit ile muamele edilen insan hepatoselüler karsinoma (HepG2) hücrelerinde morfolojik değişikliklerin görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca 100 μmol/L protokatekuik asit dozunun hücrelerde belirgin bir yuvarlaklaşma ve sayıca azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Yip, et al., 2006). Benzer şekilde çalışmamızda da HepG2 hücrelerinde olduğu gibi, C6 hücrelerinde 48 saatte 1,5 mM protokatekuik asit dozunun hücre morfolojisinde yuvarlaklaşma ve bunu takiben hücre sayısında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Yip ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile bu çalışmanın dozlarını karşılaştırdığımızda 100 μmol/L dozunun oldukça etkili olduğu gözlenirken, T98G ve C6 hücrelerinde ise bu dozun herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu durumun muamele süresinin uzunluğu ve hücre dizisinin farklı olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, 0,5-3,5 mM arasındaki protokatekuik asit dozlarının mitokondriyal aktiviteye dayalı hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisi, doza ve zamana bağlı olarak MTT yöntemi kullanılarak her iki hücre hattında da araştırılmıştır.

Tseng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 0,2-2 mM protokatekuik asit dozlarının insan lösemi hücresi (HL-60) üzerindeki çoğalmayı baskılayıcı etkileri MTT yöntemi kullanılarak 24 ve 48 saat süreyle araştırılmıştır. HL-60 hücreleri üzerinde çoğalmayı baskılayıcı etkisi 24 saatte 0,5 mM, 48 saatte ise 0,2 mM dozundan itibaren görülmeye başlamıştır (Tseng, et al., 2000). Anter ve arkadaşları tarafından aynı hücre dizisinde yapılan farklı bir çalışmada ise protokatekuik asitin farklı dozları (5-35 mM) ile hücreler 72 saat süre ile muamele edilmiştir. Bu çalışmada mitokondriyal aktiviteye

dayalı hücre çoğalmasını belirlemek için WST-8 yöntemi kullanılmış ve IC_{50} değeri ise 12,72 mM olarak hesaplanmıştır (Anter, et al., 2011). Tseng ve arkadaşlarının kullandığı hücre hattı ile Anter ve arkadaşlarının kullanmış olduğu hücre hattı aynı olmasına rağmen protokatekuik asitin hücre çoğalması üzerinde göstermiş olduğu baskılayıcı etki oldukça farklılık göstermektedir. Aynı çalışmada hücre canlılığını belirlemek için tripan mavisi yöntemi kullanıldığında ise 72 saatte IC_{50} değeri 4,54 mM olarak hesaplanmıştır (Anter, et al., 2011). Bu çalışma aynı dozlarda ve aynı hücre dizisi üzerinde yapılmış olmasına rağmen farklı canlılık belirleme yöntemleri kullanıldığında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum protokatekuik asitin sitotoksik etkisinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlere bağlı olarak da farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir.

Diğer bir çalışmada ise 24 ve 48 saat süreyle 1-4 mM arasındaki protokatekuik asit dozlarının insan gastrik kanser (AGS) hücre dizisinde, hücre çoğalması üzerindeki baskılayıcı etkisi araştırılmıştır. 48 saatteki IC_{50} değeri 4 mM olarak belirtilmiştir (Ho, et al., 2010).

Ayrıca Lin ve arkadaşlarının (2007) yapmış olduğu çalışmada ise iki farklı insan gastrik karsinom (AGS ve MKN45), insan hepatoselüler karsinom (Hep3B), hepatoblastoma (HepG2) ve insan kolorektal karsinom (Lovo ve HT29) hücre dizileri üzerindeki protokatekuik asitin 24 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır. AGS, MKN45, Hep3B, HepG2, HT29 ve Lovo hücre dizilerinin 24 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 7,3; 15,8; 26,2; 16,8; 22,3 ve >30 mM. olarak hesaplanmıştır (Lin, et al., 2007). Literatür verileri ile sonuçlarımız karşılaştırıldığında protokatekuik asitin C6 hücrelerinde daha düşük dozlarda hücre çoğalmasını baskılayıcı etki gösterdiği belirlenmiştir.

Lin ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu farklı bir çalışmada ise AGS hücre dizisi üzerinde 0,1; 0,5; 1,0 ve 2,0 mM protokatekuik asit dozları 24 saat süreyle uygulanmıştır. Hücre canlılığını belirlemek için tripan mavisi yöntemi kullanılarak, 2 mM dozunun hücre canlılığını %70 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Lin, et al., 2011). Çalışmamızdan elde edilen veriler ile kıyaslandığında AGS hücre dizisinin

glioma hücre dizilerine göre protokatekuik asitte karşı daha duyarlı olduğu görülmektedir.

Babish ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise protokatekuik asitin insan tükrük bezi karsinomu (HSG_1), insan squamöz karsinomu (HSC-2) ve insan dil squamöz karsinomu (CAL27) hücre dizileri üzerinde 24 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkileri NR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada IC_{50} değerleri sırasıyla 18,7; 23,3; 15,5 mM olarak bulunmuştur (Babish, et al., 2002). Nötral kırmızısı yöntemi kullanılarak elde edilen 24 saatlik sonuçlarımız ile bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında protokatekuik asitin C6 hücre dizisi üzerindeki lizozomal aktiviteye dayalı çoğalmayı baskılayıcı etkisinin daha düşük dozlarda olduğu görülmektedir.

Kanser tedavisinde kullanılması düşünülen ilaçların özellikle apoptotik hücre ölümüne neden olması istenmektedir. Çünkü apoptoz çeşitli hasarlar sonucunda hücrenin programlı bir şekilde ölmesini sağlar ve çevresindeki diğer komşu hücreleri olumsuz bir şekilde etkilemesini engeller. Ayrıca kanserleşen hücrelerin hızlı çoğalma sürecine girmeden ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Fakat kanserli hücreler farklı mekanizmalar sayesinde apoptotik hücre ölümünden kaçarlar. Bu nedenle kanserleşen hücrelerde apoptotik hücre ölümünün aktive edilmesi kanserin tedavisi için umut verici nitelik taşımaktadır. Bu sebeple çeşitli ilaçların hücre çoğalmasını baskılayıcı etkilerinin belirlenmesinin ardından ilacın aktive ettiği hücre ölümü tipinin belirlenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda protokatekuik asitin C6 hücreleri üzerindeki apoptotik ve/veya nekrotik etkileri Hücre Ölümünü Belirleme Kiti kullanılarak araştırılmştır. Sonuç olarak kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında artan doza ve zamana bağlı olarak protokatekuik asitin apoptotik etkiyi arttırdığı belirlenmiştir ($p<0,001$). Bununla beraber anlamlı bir nekrotik etki ise gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Benzer şekilde Yin ve arkadaşlarının (2009) yapmış olduğu çalışmada 1, 2, 4 ve 8 μmol/L protokatekuik asitin 48 saat insan meme (MCF7), akciğer (A549), serviks (HeLa), karaciğer (HepG2) ve prostat (LNCaP) kanserli hücreler üzerindeki apoptotik

etkileri Hücre Ölümünü Belirleme Kiti kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının tamamında doza bağlı olarak apoptotik etkinin arttığı belirlenmiştir. En fazla apoptotik etkinin ise LNCaP hücresinde görüldüğü rapor edilmiştir (Yin, et al., 2009). Çalışmamızın Yin ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzer sonuçlar gösterdiği ve protokatekuik asitin C6 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü doza bağlı olarak arttırdığı belirlenmiştir.

Literatür taraması sonucunda protokatekuik asitin zamana bağlı olarak apoptotik etkiyi arttırdığı farklı yöntemler kullanılarak da belirlenmiştir. DNA'nın fragmente olması apoptozun spesifik özelliklerinden birisidir. Anter ve arkadaşlarının (2011) HL-60 hücreleri üzerinde yapılmış bir çalışmada, artan doza bağlı olarak DNA'nın fragmente olduğu agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak gözlenmiştir (Anter, et al., 2011). Lin ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada ise zamana bağlı olarak protokatekuik asitin AGS hücreleri üzerindeki apoptotik etkiyi artırdığı DAPI çekirdek boyaması yöntemi ile gösterilmiştir.

Protokatekuik asitin apoptoz sürecini tetiklemesine ilişkin farklı mekanizmalar olduğu çeşitli kanserli hücre dizilerinde yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Lin ve arkadaşlarının (2007) yapmış olduğu çalışmada AGS hücrelerinde protokatekuik asitin, JNK/p38 aktivasyonunu etkili bir şekilde uyardığı, Yip ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada ise HepG2 hücrelerinde apoptozu, c- Jun N- terminal kinaz (JNK) bağımlı olarak indüklediği ifade edilmiştir.

Tseng ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada HL-60 hücrelerinde ise protokatekuik asitin Retinoblastoma (Rb) fosforilasyonu ve Bcl-2 proteininin ekspresyonunun azalmasında önemli rol oynayarak apoptozu aktive ettiği belirtilmiştir (Tseng, et al., 2000). Protokatekuik asitin hücre çoğalmasını baskılayıcı etki mekanizmasına dair çalışmalar farklı kanserli hücre dizilerinde halen çalışılmaya devam edilmektedir.

Çalışmamızda, çeşitli kanser hücrelerinde protokatekuik asitin çoğalmayı baskılayıcı etkisi çalışılmış olmasına rağmen, insan glioblastoma multiforme (T98G) ve

sıçan glioma (C6) hücreleri üzerindeki etkisi ilk defa ortaya konmuştur. Çalışmanın sonuçlarına göre protokatekuik asitin hem mitokondriyal hem de lizozomal aktiviteye dayalı olarak C6 hücre çoğalmasını doza ve zamana bağlı olarak benzer şekilde baskıladığı, buna rağmen; T98G hücrelerinde ise etkisiz olduğu belirlenmiştir. Ayrıca protokatekuik asitin C6 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak apoptotik hücre ölümünü aktive ettiği ilk defa tespit edilmiştir. Protokatekuik asitin C6 hücrelerinde apoptozu hangi mekanizmalar sayesinde tetiklediği ile ilgili ileri düzeyde çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Çalışmamızın sonuçları göz önüne alındığında glioma hücreleri üzerindeki protokatekuik asitin etkileri ilk defa belirlenmiştir.

Çalışmamızın ilk olma özelliği taşımasıyla birlikte, bilimsel açıdan faydalı olacağına ve daha sonra yapılacak olan *in vivo ve in vitro* çalışmalara ise öncülük yapacağına inanmaktayız.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abe, K. and Matsuki N., 2000, Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT, Neuroscience Research, 38, 325-329.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, M., Walter, P., 2008, Hücrenin moleküler biyolojisi, Türkiye Bilimler Akademisi, Ankara, 1314- 1318 s.

Alenzi, F. Q. B., 2004, Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle, British Journal of Biomedical Science, 61 (2), 1-4.

Alley, M.C., Scudiere, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., 1988, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, Cancer Research, 48: 589-601.

Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E., 2008, Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, Tıp Araştırmaları Dergisi, 6(2), 93 -104.

Anter, J., Romero-Jime´nez, M., Bedmar- Ferna´ndez, Z., Villatoro, M., Villatoro-Pulido, M., Analla, M., Alonso-Moraga, A., Mun˜oz-Serrano, A., 2011, Antigenotoxicity, Cytotoxicity, and Apoptosis Induction ,by Apigenin, Bisabolol, and Protocatechuic Acid, Journal of Medicinal Food, 14(3), 276–283.

Atmaca H., 2008, İnsan Yumurtalık Kanseri Hücre Hattında (Ovcar-3) Zolendronik Asit ve Gossypol'un Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 75s. (yayınlanmış).

Atıcı, E., 2007, Tıp tarihinde kanser ve lösemi, Türk Onkoloji Dergisi, 22(4), 197-204.

Babich, H., Sedletcaia, A., Kenigsberg B., 2002, *In Vitro* Cytotoxicity of Protocatechuic Acid to Cultured Human Cells from Oral Tissue: Involvement in Oxidative Stress, *Pharmacology & Toxicology*, 91, 245–253.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Ban, J.Y., Cho, S.O., Jeon, S.Y., Bae, K., Song, K.S., Seong, Y.H., 2007, 3,4-Dihydroxybenzoic acid from *Smilacis chinae* rhizome protects amyloid protein (25–35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons, Neuroscience Letters 420, 184–188.

Borenfreund, E. and Puerner, J.A., 1984, A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays, Journal Of Tissue Culture Methods, 9, 7-9.

Cabadak, H.,2008, Hücre Siklusu ve Kanser, ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 9(3), 51-61.

Chen, Z., Liu Y-M., Yang S., Song B-A., Xu, G-F., Bhadur P.S., Jin, L-H., Hu D-Y., Liu, F., Xue, W., Zhou, X., 2008, Studies on the chemical constituents and anticancer activity of Saxifraga stolonifera (L) Meeb, Bioorganic & Medicinal Chemistry 16, 1337–1344.

Collet, B., Guitton, N., Saikali, S., Avril, T., Pineau, C., Hamlat, A., Mosser, J., Quillien, V., 2011, Differential analysis of glioblastoma multiforme proteome by a 2D-DIGE approach, Proteome Science, 9(1), 1-26.

Collins, J.A., Schandl, C.A., Young K.K., Vesely J., Willingham M.C., 1997, Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis, The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 45(7), 923–934.

Cooper, G.M. ve Hausman, R.E., 2006, Hücre Moleküler Yaklaşım, İzmir Tıp kitabevi, İzmir, 580-662 s.

Coşar, M., Bıkmaz, K., İplikçioğlu, A.C., Başocak, K., Ceylan, D., 2004, İntrakranyal Glioblastoma Multiforme'nin Spinal Seeding fieklinde Metastazı: Olgu Sunumu, Türk Nöroşirürji Dergisi, 14, 2, 111 – 115.

Çalışkan, M., 2000, Apoptosis: Programlanmış Hücre Ölümleri, Turkish Journal of Zoology, 24, 31-35.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Das, A., Banik, N.L., Ray, S.K., 2008, N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide induced both differentiation and apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells, Brain Research, 1227, 207 – 215.

Dewson, G., Kluck R. M., 2010, Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease, Cell Health and Cytoskeleton 2010:2 9–22.

Edinger, A.İ. and Thompson C.B., 2004, Death by design: apoptosis, necrosis and autopfagy, Current Opinion in Cell Biology, 16, 633-669.

Eitel, K., Wagenknecht, B., Weller, M., 1999, Inhibition of drug-induced DNA fragmentation, but not cell death, of glioma cells by non-caspase protease inhibitors, Cancer Letters, 142, 11-16.

Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Morozzi, G., 2011, The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenols induce apoptosis on HL60 cells, Food Chemistry, 125, 1249–1255.

Festjens, N., Berghe, T.V., Vandenabeele P., 2006, Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response, Biochimica et Biophysica Acta 1757, 1371–1387.

Fotakis, G. and Timbrell J.A., 2006, In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, Toxicology Letters, 160, 171-177.

Fountoulakis, S., Tsatsoulis, A., 2004, On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: aunifying hypothesis, Clinical Endocrinology , 60, 397–409.

Garrett, M.D., 2001, Cell cycle control and cancer, Current Science, 81(5), 515-522.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Ghobrial I.M., Witzig, T. E., Adje, A.A., 2005, Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 55:178–194.

Gozuaçık, D., Kimchi, A., 2004, Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, Oncogene , 23, 2891–2906.

Guan, S., Ge, D., Liu, T.Q., Ma, X.H., Cui a, Z.F., 2009, Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells, Toxicology in Vitro, 23, 201–208.

Güleş, Ö. ve Eren, Ü., 2008, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 73-78.

Gültekin, N., Karaoğlu, K., Küçükateş, E., 2008, Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi, 36(2), 120-130.

Hengartner, M.O., 2000, The biochemistry of apoptosis, Nature, 407, 770.

Ho, H.H., Chang, C.S., Ho, W.H., Liao, S.Y., Wu, C.H., Wang, C.J., 2010, Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NFkB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals, Food and Chemical Toxicology, 48 2508–2516.

Igney, F.H. and Krammer, P.H., 2002 Death and Anti- death: Tumour Resistance to Apoptosis, Nature Rewievs Cancer, 2 , 277-288.

Kam, P.C.A., Ferch, N.I., 2000, Apoptosis: mechanisms and clinical implications, Anaesthesia, 55, 1081-1093.

Kandaş Özten, N., 2004, Programlı Hücre Ölümü, Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi, 5, 1.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Karmakar, S., Weinberg, M.S., Banik, N.L., Patel, S.J., Ray, S.K., 2006, Activation of Multiple Molecular Mechanisms for Apoptosis in human Malignant Glioblastoma T98G and U87M Cells treated with sulforaphane, *Neuroscience* 141, 1265–1280.

Kawamori, T., Tanaka T., Kojima T., Suzui M., Ohniski M., Mori H., 1994, Suppression of Azoxymethane- induced Rat Colon Aberrant Crypt Foci by Dietary Protocatechuic Acid, Japanese Journal of Cancer Research, 85, 686-691.

Kerr, J.F.R., Wyllie , A.H., Currie, A.R, 1972, Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with İmplications in Tissue Kinetics, British Journal of Cancer, 26,239-257.

Koçyiğit, A. ve Çevik, M., 2011, Memeli reprodüktif dokuları, gamet hücreleri ve embriyolarında apoptosis, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 8(1), 33-41.

Komissarova, E.V., Saha S.K., Rossman T.G., 2005, Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example, Toxicology And Applied Pharmacology, 202, 99-107.

Krajka-Ku´zniak, V., Szaefer, H., Baer-Dubowska, W., 2004, Modulation of 3 methylcholanthrene-induced rat hepatic and renal cytochrome P450 and phase II enzymes by plant phenols: protocatechuic and tannic acids, Toxicology Letters 152, 117–126.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, ES, Baehrecke EH, Blagosklonny, MV, El-Deiry, WS, Golstein, P., Green, DR, Hengartner, M., Knight RA, Kumar, S., Lipton, SA, Malorni, W., Nuñez, G., Peter, ME, Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., 2009, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, Cell Death Differ. ,16(1): 3–11.

Kumar, V., Cotran R.S, Robbins, S.L., 2000, Temel patoloji (Çev. U. Çevikbaş), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 11-17s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Lin, H.H., Chen, J.H., Chou, F,P., Wang, C.J., 2011, Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-kB pathway and MMP-2 production bytargeting RhoB activation, British Journal of Pharmacology, 162, 237–254.

Lin, H.H., Chen, J.H., Huang, C.C., Wang, C.J., 2007, Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation, *International Journal of Cancer* , 120, 2306–2316.

Liu, C.L., Wang, J.M., Chu, C.Y., Cheng, M.T., Tseng, T.H., 2002, In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity, Food and Chemical Toxicology 40, 635–641.

Liu, Y.M., Jiang B., Bao, Y.M., An L.J., 2008, Protocatechuic acid inhibits apoptosis by mitochondrial dysfunction in rotenone-induced PC12 cells, Toxicology in Vitro, 22, 430–437.

Liu, K.W., Feng, H., Bachoo, R., Kazlauskas, A., Smith, E.M., Symes, K., Hamilton, R.L., Nagane, M., Nishikawa, R., Hu, B., Cheng, S.Y., 2011, SHP-2/PTPN11 mediates gliomagenesis driven by PDGFRA and INK4A/ARF aberrations in mice and humans, The Journal of Clinical Investigation, 121(3), 905-917.

Min, S.W., Ryu, S.N., Kim, D.H., 2010, Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O-β-D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid, International Immunopharmacology, 10, 959–966.

Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, Journal of Immunological Methods, 65, 55- 63.

Nandi, S., Vracko M., Cagchi, B. M., 2007, Anticancer Activity of Selected Phenolic Compounds: QSAR Studies Using Ridge Regression and Neural Networks, Chemical Biology & Drug Design, 70: 424–436.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Nicotera, P. And Melino, G., 2004, Regulation of the apoptosis–necrosis switch, Oncogene, 23, 2757–2765.

Oztopcu- Vatan, P., Kabadere, S., Uyar R., 2009, The effect of pretreatment or combined treatment of quercetin on menadione toxicity in rat primary mixed glial cells in vitro, Cytotechnology, 61:11–16.

Ölgen, S., Bıçak, I., Nebioğlu, D., 2002, Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar, Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 31(3), 193-214.

Öz Arslan, D., Korkmaz, G., Gözüaçık, D., 2011, Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması, Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 184-194.

Popiolkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J.S., Mazurek, A.P., 2005, In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides, Cancer Letters, 229, 67-75.

Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L.,2003, Necrosis: a specific form of programmed cell death?, Experimental Cell Research 283, 1–16.

Putnam, K.P., Bombick D.W., Doolittle D.J., 2002, Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate, Toxicology In Vitro, 16, 599-607.

Rastogi, R. P., Sinha, R., Sinha R.P., 2009, Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity, EXCLI Journal, 8, 155-181.

Reithmeier, T., Graf, E., Piroth, T., Trippel, M., Pinsker, M.O., Nikkhah, G., 2010, BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors, BMC Cancer, 10(30), 1-8.

Salford, LG., Siesjö, P., Skagerberg, G., Persson, BRR., Larsson, EM., Lindvall, M., Visse, E., Widegren, B., 2002, Search for effective therapy against glioblastoma multiforme-clinical immunisation with autologous glioma cells transduced with the human interferon-γ gene, International Congress Series, 1247, 211-220.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Stockert, J.C., Blazquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A., 2012, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, Acta Histochemica, 114, 785-796.

Tanaka T., Kojirna, T., Kawamori, T., Mori H., 1995, Chemoprevention of Digestive Organs Carcinogenesis by Natural Product Protocatechuic Acid, Cancer Supplement, 75, 6, 1433-1439.

Tanaka, T., Tanaka, T., Tanaka, M., 2011, Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid, Journal of Experimental and Clinical Medicine, 3(1), 27-33.

Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, MA, Rehemtulla, A., 2001, Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system, Oncogene ,20, 167 – 177.

Taylor, R.C., Cullen S.P., Martin S.J., 2008, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9, 231- 241.

Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L., Wang, C.J., 2000, Induction of Apoptosis by *Hibiscus* Protocatechuic Acid in Human Leukemia Cells via Reduction of Retinoblastoma (RB) Phosphorylation and Bcl-2 Expression, Biochemical Pharmacology, 60, 307–315.

Tsujimoto, Y., 1998, Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?, Genes to Cells, 3, 697–707.

Uliasz, T.F. and Hewett, S.J., 2000, A microtiter trypan blue absorbance assay for the quantitative determination of excitotoxic neuronal injury in cell culture, Journal of Neuroscience Methods 100, 157–163.

Uyar, B. B., Karadağ- Gezmen M., Şanlıer N., Günyel S., 2013, Toplumumuzda sıklıkla kullanılan bazı bitkilerin toplam fenolik madde miktarının saptanması, Gıda, 38 (1), 23-29.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Verma, Y. K., Gangenahalli, G. U., Singh V. K., Gupta, P., Chandra, R., Sharma R. K., Raj, H.G., 2006, Cell death regulation by B-cell lymphoma protein, 11: 459–471.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., 2003, Berneman Z.N., The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, Cell Proliferation, 36, 131-149.

Wang, D., Zou, T., Yang, Y., Yan, X., Ling, W., 2011, Cyanidin-3-O-b-glucoside with the aid of its metabolite protocatechuic acid, reduces monocyte infiltration in apolipoprotein E-deficient mice, Biochemical Pharmacology, 82, 713–719.

Weng, C-J. and Yen, G-C., 2012, Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol and their derivates, Cancer Treatments, Reviews 38, 76-87.

Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., 2005, A practical note on the use of cytotoxicity assays, International Journal Of Pharmaceutics, 288, 369-376.

Willingham, M.C., 1999, Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis, The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 47(9), 1101–1109.

Wong, R.S.Y., 2011, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to Treatment, Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 30, 87.

Yazıcı, P., Alizadehshargh, S., Güner-Akdoğan, G., 2009, Apopitoz: Düzenleyici Moleküller, Hastalıklarla İlişkisi ve Apopitozu Saptama Yöntemleri, Turkiye Klinikleri J Med Sci, 29(6):1677-86.

Yıldırım, A., Bardakcı, F., Karataş, M., Tanyolaç B., 2007, Moleküler Biyoloji, Nobel yayınları, Ankara, 423- 467s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Yın, M.C., Lin, C.C., Wu, H.C., Tsao, S.M., Hsu, C.K., 2009, Apoptotic Effects of Protocatechuic Acid in Human Breast, Lung, Liver, Cervix, and Prostate Cancer Cells: Potential Mechanisms of Action, journal of agrıcultural and food chemistry, 57, 6468–6473.

Yip, E.C.H., Chan, A.S.L. Pang, H., Tam, Y.K., Wong, Y.H., 2006, Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism, Cell Biology and Toxicology, 22, 293-302.

Zanotto-Filho, A., Braganhol, E., Schroder, R., de Souz, L.H.T. Dalmolin, R.J.S., Pasquali, M.A.B, Gelain, D.P., Battastini, A.M.O., Moreira , J.C.F., 2011, NFkB inhibitors induce cell death in glioblastomas, Biochemical Pharmacology 81,412–424.