# Deguelinin İnsan Servikal Karsinoma (HeLa) Hücre Dizisi Üzerindeki Antiproliferatif ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

Melek Günindi Korkut

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2018

# Investigation of the Antiproliferative and Apoptotic Effects of Deguelin on Human Cervical Carcinoma (HeLa) Cell Line

Melek Gunindi Korkut

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Biology

May 2018

# Deguelinin İnsan Servikal Karsinoma (HeLa) Hücre Dizisi Üzerindeki Antiproliferatif ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

Melek Günindi Korkut

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

Danışman: Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan

Mayıs 2018

**ONAY**

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Melek Günindi Korkut'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Deguelinin İnsan Servikal Karsinoma (HeLa) Hücre Dizisi Üzerindeki Antiproliferatif ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

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

**İkinci Danışman** **:** -

**Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

**Üye :** Prof. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

**Üye :** Prof. Dr. Mediha CANBEK

**Üye :** Prof. Dr. Müge AYDIN SAYİTOĞLU

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

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

# ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan danışmanlığında hazırlamış olduğum "Deguelinin İnsan Servikal Karsinoma (HeLa) Hücre Dizisi Üzerindeki Antiproliferitif ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 17/05/2018

Melek Günindi Korkut

İmza

# ÖZET

Kanser, çağımızın en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Serviks kanseri, dünyada kadınlarda görülen kanserler arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Hastalığın tedavisi için yeni ve doğal maddelerin arayışı sürmektedir. Deguelin de *Mundulea sericea*'nın (*Leguminosae*) da içinde bulunduğu çeşitli bitkilerden izole edilen ve güçlü sitotoksik ve kemopreventif özellik gösteren bir rotenoidtir.

Çalışmamızda deguelinin (1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 and 300 μM) insan serviks karsinoma (HeLa) hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Deguelinin sitotoksik etkisini karşılaştırmak için, sisplatin ve 5-FU pozitif kontrol olarak seçilmiştir. Deguelinin $IC_{50}$ değerleri 24 ve 48 saat için sırasıyla 50 μM ve 23 μM olarak hesaplanmıştır. Yirmidört saat için hem sisplatin hem de 5-FU'nun $IC_{50}$ değeri hesaplanamazken, 48 saatte sisplatinin $IC_{50}$ değeri 167 μM olarak belirlenmiştir. Deguelinin HeLa hücre morfolojisi üzerindeki etkileri ters ışık mikroskobu kullanılarak araştırılmıştır. Seçilen 25, 50 ve 100 μM deguelin dozlarının apoptotik hücre ölümünü doza ve zamana bağlı olarak arttırdığı DNA fragmentasyon yöntemiyle belirlenirken; 50 ve 100 μM deguelin dozlarının ise *TP53, SURVİVİN, FAS* ve *KASPAZ3* gen anlatım düzeyleri üzerindeki etkisi RT-RZR yöntemi ile araştırılmıştır. Deguelinin *SURVİVİN g*en anlatımını azalttığı, *TP53, FAS* ve *KASPAZ3* gen anlatım düzeylerinin ise arttığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda, deguelinin insan serviks karsinoma (HeLa) hücre dizisi üzerinde doza ve zamana bağlı olarak antiproliferatif, morfolojik ve apoptotik etki gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda, deguelinin apoptotik süreçte görev alan *SURVİVİN* gen anlatımını baskılayıp, *TP53, FAS* ve *KASPAZ3* genlerinin anlatım düzeylerini ise arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızın, ileride serviks kanseri ile ilgili yapılacak farklı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Deguelin, serviks kanseri, HeLa, sitotoksisite, apoptoz, RT-RZR.

## SUMMARY

Cancer is a terrible disease and represents one of the serious health-care issues for the human race, demanding a proactive strategy for cure. Cervical cancer is the fourth most common cancer in female worldwide. Finding novel and efficient compounds of natural origin has been a major point of concern for research in the pharmaceutical sciences. Deguelin, a rotenoid, isolated from several plant species including *Mundulea sericea* (*Leguminosae*) has been shown to be a strong antitumor and cancer chemopreventive agent in several mammalian cell culture systems.

The current study was thus designed to investigate antiproliferative effects of deguelin on human cervical cancer (HeLa) cells by MTT assay. Cisplatin and 5-FU used as positive controls in comparison to the cytotoxic activity of deguelin. HeLa cells were treated with all agents in doses of (1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 and 300 μM) for 24 and 48 hours. $IC_{50}$ values of deguelin were estimated as 50 μM and 23 μM for 24 and 48 hours, respectively. While $IC_{50}$ values of neither cisplatin nor 5-FU were not determined for 24 hour, cisplatin's $IC_{50}$ value was calculated as 167 μM for 48 hours. The effects of deguelin on HeLa cell's morphology were examined by using inverted microscopy. To show whether the antiproliferative effect of deguelin is through apoptosis, DNA fragmentation was measured by cell death ELISA plus kit. RT-PCR was employed to assess the expression levels of *TP53, SURVIVIN, FAS* and *CASPASE3*. The expression of *SURVIVIN* was downregulated and *TP53, FAS* and *CASPASE3* expressions were upregulated in deguelin-treated HeLa cells.

In our present study, we determined that deguelin shows antiproliferative, morphological and apoptotic effects on human cervical carcinoma (HeLa) cells in a dose and time dependent manner. Also, we demonstrated that deguelin downregulates *SURVIVIN* expression and upregulates *TP53, FAS* and *CASPASE3* expressions on HeLa cells. We are thinking that our research will be source of further *in vitro* and *in vivo* studies for cervix cancer.

**Keywords:** Deguelin, cervix cancer, HeLa, cytotoxicity, apoptosis, RT-PCR.

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince akademik, bilimsel ve deneysel çalışmalar ile tanışmamı sağlayan, tüm bu konularda kendimi geliştirmeme imkan tanıyan ve tezimin tüm aşamalarında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak her konuda yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresinde eğitim alanında büyük katkıları olan, Prof. Dr. Mediha CANBEK, Prof. Dr. Ruhi UYAR, Prof. Dr. Selda KABADERE, Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU ve beni yetiştiren bölümümün tüm değerli hocalarına teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımın gen anlatım düzeylerinin belirlenmesi aşamasında, bana laboratuvarının kapılarını açan ve tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşıp araştırmalarımda kendimi geliştirmeme sonsuz destek olan Prof. Dr. Müge AYDIN SAYİTOĞLU' na teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum arkadaşım Emine İNAN'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak hiç bir fedakarlıktan kaçınmadan, her koşulda bana destek olan canım annem İsmigül GÜNİNDİ, canım babam Bayram GÜNİNDİ, biricik abim Aykut GÜNİNDİ, sevgili eşim Ahmet KORKUT ve varlığıyla hayatıma anlam katan canım kızım Zehra Ela KORKUT'a tüm içtenliğimle sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa**

**ÖZET** ..... vi
**SUMMARY** ..... vii
**TEŞEKKÜR** ..... viii
**İÇİNDEKİLER** ..... ix
**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... xi
**ÇİZELGELER DİZİNİ** ..... xiv
**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ** ..... xv
**1. GİRİŞ VE AMAÇ** ..... 1
**2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI** ..... 3
2.1. Kanser ..... 3
2.2. Hücre döngüsü ve kanser ..... 9
2.3. Hücre ölümü ..... 11
2.4. Apoptoz ..... 12
2.4.1. Tarihçesi ve biyolojik önemi ..... 13
2.4.2. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ..... 14
2.4.3. Mekanizmaları ..... 15
2.4.3.1. Dış yolak ..... 16
2.4.3.2. İç yolak ..... 20
2.4.4.Apoptozun ilerletilmesi ve düzenlenmesi ..... 23
2.4.4.1. Kaspazlar ..... 23
2.4.4.2.Apoptoz İnhibitörleri ..... 26
2.4.4.3.TP53 ..... 29
2.5. Serviks Kanseri ..... 31
2.5.1. Tanımı ve epidemiyolojisi ..... 31
2.5.2. Risk faktörleri ve moleküler biyolojisi ..... 32
2.5.3. Serviks Kanseri Tanı ve Tedavisi ..... 34
2.6. Deguelin ..... 35
**3. MATERYAL VE YÖNTEM** ..... 38
3.1.Hücre Kültürü ..... 38
3.1.1. Hücrelerin çoğaltılması ..... 38

# İÇİNDEKİLER (devam)

**Sayfa**

3.1.2. Hücrelerin deneye alınması ..... 39
3.1.3. Hücrelerin sayımı ..... 39
3.1.4. Hücrelerin kültür kaplarına ekilmesi ..... 40
3.1.5. İlaç dozlarının hazırlanması ve uygulanması ..... 40
3.2. Mitokondriyal aktiviteye dayalı hücre çoğalmasının belirlenmesi ..... 41
3.3. Hücre morfolojisi üzerindeki etkilerin belirlenmesi ..... 43
3.4. Hücre ölümünün belirlenmesi ..... 43
3.5. Gen anlatım düzeylerinin belirlenmesi ..... 45
3.5.1. RNA izolasyonu ..... 47
3.5.2. cDNA sentezi ..... 47
3.5.3. Polimeraz zincir reaksiyonu ..... 48
3.6. İstatistiksel Analizler ..... 50
**4. BULGULAR VE TARTIŞMA** ..... 51
4.1. Deguelinin HeLa Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkileri ..... 52
4.2. Deguelinin HeLa Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkileri ..... 60
4.3. Deguelinin HeLa Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkileri ..... 69
4.4. Deguelinin HeLa Hücreleri Gen Anlatım Düzeyleri Üzerindeki Etkileri ..... 71
**5. SONUÇ VE ÖNERİLER** ..... 81
**KAYNAKLAR DİZİNİ** ..... 83

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil** **Sayfa**

2.1. Kanserleşen bir hücrenin gelişim süreci ..... 5
2.2. Kanserleşen bir hücrede görülen ortak karakteristik özellikler ..... 6
2.3. Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerine yeni eklenen özellikler ..... 8
2.4. Hücre döngüsü ve p53 kontrol sistemi ..... 10
2.5. p53 kontrol sisteminin devre dışı kaldığı durumlarda gözlenen kontrolsüz hücre çoğalması ..... 11
2.6. Apoptoz sinyal ileti yolakları ve birbirleriyle etkileşimleri ..... 16
2.7. Bazı TNF süperailesi ve TNFR süperailesi üyeleri ve yapıları ..... 17
2.8. Fas ve FasL yapısı ..... 19
2.9. FAS aracılı apoptotik hücre ölüm yolağı ..... 20
2.10. Bcl-2 ailesi üyeleri ..... 21
2.11. Bcl-2 ailesi tarafından apoptozun düzenlenmesi ..... 22
2.12. Kaspaz ailesi üyeleri ..... 24
2.13. Kaspazların aktivasyonu ..... 25
2.14. Memeli IAP ailesi üyeleri ..... 27
2.15. *SURVİVİN*in şematik ve atomik yapıları ..... 28
2.16. Survivinin Fas aracılı apoptotik hücre ölümünü baskılama mekanizması ..... 28
2.17. *TP53* geninin yapısı ..... 29
2.18. p53 proteininin fonksiyonları ..... 30
2.19. Doğurganlık yaşındaki kadınlarda serviks yapısı ve ölçüleri ..... 31
2.20. HPV proteinlerin katıldığı apoptotik sinyal yolakları ..... 33
2.21. Deguelin'in kimyasal formülü ..... 37
3.1. MTT' nin kimyasal yapısı ve formazana dönüşmesi ..... 41
3.2. HeLa hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca uygulanan deguelin dozlarının spektrofotometre cihazında okunmadan önceki mor renkli formazan tuzlarının görüntüsü ..... 42
3.3. Hücre ölümü belirleme kitinin çalışma prensibi ..... 44

# ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

**Şekil** **Sayfa**

3.4. HeLa hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca uygulanan deguelin dozlarının spektrofotometre cihazında okunmadan önceki görüntüsü ..... 45
3.5. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu çalışma prensibi ..... 46
4.1. Deguelinin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 24 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi ..... 52
4.2. Deguelinin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 48 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi ..... 53
4.3. Sisplatin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 24 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi ..... 56
4.4 Sisplatin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 48 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi ..... 57
4.5. 5-FU dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 24 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi ..... 58
4.6. 5-FU dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 48 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi ..... 59
4.7. HeLa hücrelerinin kontrol grubunun 24 saatteki morfolojik görüntüsü ..... 61
4.8. HeLa hücreleri üzerinde 25 μM deguelin dozunun 24 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü ..... 61
4.9. HeLa hücreleri üzerinde 50 μM deguelin dozunun 24 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü ..... 62
4.10. HeLa hücreleri üzerinde 75 μM deguelin dozunun 24 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü ..... 62
4.11. HeLa hücreleri üzerinde 100 μM deguelin dozunun 24 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü ..... 63
4.12. HeLa hücrelerinin deguelin uygulanmamış kontrol grubunun 24 saatteki morfolojik görüntüsü ..... 64
4.13. HeLa hücreleri üzerinde 10 μM deguelin dozunun 48 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü ..... 64

# ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

**Şekil** **Sayfa**

4.14. HeLa hücreleri üzerinde 25 μM deguelin dozunun 48 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü ..... 65
4.15. HeLa hücreleri üzerinde 50 μM deguelin dozunun 48 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü ..... 65
4.16. HeLa hücreleri üzerinde 75 μM deguelin dozunun 48 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü ..... 66
4.17. HeLa hücreleri üzerinde 100 μM deguelin dozunun 48 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü ..... 66
4.18. 24 saat 75 μM deguelin dozu ile muamele edilen hücrelerin zarlarında oluşan kabarcıkların ve apoptotik cisimciklere benzer yapıların görüntüsü (200 X) ..... 67
4.19. 24 saat 75 μM deguelin dozu ile muamele edilen hücrelerin zarlarında oluşan kabarcıkların ve apoptotik cisimciklere benzer yapıların daha ayrıntılı görüntüsü (400 X) ..... 68
4.20. Apoptotik süreçte hücrelerde görülen morfolojik değişiklikler ..... 68
4.21. Seçilen deguelinin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 24 saatlik DNA fragmentasyon oranları ..... 70
4.22. Seçilen deguelinin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 48 saatlik DNA fragmentasyon oranları ..... 70
4.23. Deguelinin HeLa hücrelerinde *TP53* gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisi ..... 73
4.24. Deguelinin HeLa hücrelerinde *SURVİVİN* gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisi ..... 74
4.25. Deguelinin HeLa hücrelerinde *FAS* gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisi ..... 77
4.26. Deguelinin HeLa hücrelerinde *KASPAZ3* gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisi ..... 78
4.27. Deguelinin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin olası mekanizması ..... 80

# ÇİZELGELER DİZİNİ

**Çizelge** **Sayfa**

3.1. Primer dizileri ..... 49
4.1. RT-PZR sisteminde *TP53* gen anlatım sonuçları ..... 72
4.2. RT-PZR sisteminde *SURVİVİN* gen anlatım sonuçları ..... 74
4.3. RT-PZR sisteminde *FAS* gen anlatım sonuçları ..... 76
4.4. RT-PZR sisteminde *KASPAZ3* gen anlatım sonuçları ..... 78

# SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| Simgeler | Açıklama |
|---|---|
| % | Yüzde |
| °C | Santigrat derece |
| µL | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| µM | Mikromolar |
| $cm^2$ | Santimetrekare |
| dk | Dakika |
| kb | Kilobaz |
| kDa | Kilodalton |
| L | Litre |
| M | Molar |
| mL | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| ngr | Nanogram |
| nm | Nanometre |
| nM | Nanomolar |

| Kısaltmalar | Açıklama |
|---|---|
| 5-FU | 5-Fluorourasil |
| ABTS | 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit |
| AGS | İnsan gastrik kanseri hücre dizisi |
| ANOVA | Tek yönlü varyans analizi |
| ATP | Adenozintrifosfat |
| Bcl-2 | B hücre lenfoma-2 |
| BH | Bcl-2 homoloji |
| BIR | Baculoviral IAP tekrar bölgesi |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| Kısaltmalar | Açıklama |
|---|---|
| bp | Baz çifti |
| $Ca^{++}$ | Kalsiyum iyonu |
| CDK | Siklin bağımlı kinaz |
| cDNA | Komplementer DNA |
| cIAP | Hücresel apoptoz inhibitör protein |
| CKI | Siklin bağımlı kinaz inhibitörü |
| $CO_2$ | Karbondioksit |
| CRD | Sistein aminoasiti bakımından zengin bölge |
| DD | Ölüm bölgesi |
| DED | Ölüm ilerletici bölge |
| DISC | Ölüm başlatıcı sinyal kompleksi |
| DMEM | Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle medyum |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Etilendiamintetraasetikasit |
| ER | Endoplazmik retikulum |
| ERK | Ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz |
| FADD | Fas ilişkili ölüm bölgesi |
| FBS | Fetal dana serumu |
| HBE | İnsan bronşiyal epitel hücreleri |
| HBSS | Hanks'ın dengelenmiş tuz solüsyonu |
| HeLa | İnsan servikal karsinoma hücre dizisi |
| HepG2 | İnsan karaciğer kanseri hücre dizisi |
| HIV | İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü |
| HL60 | İnsan lösemi hücre dizisi |
| HPV | İnsan papilloma virüs |
| HSV | Herpes simpleks virüs |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| Kısaltmalar | Açıklama |
|---|---|
| HT29 | İnsan kolon kanser hücre dizisi |
| Huh-7 | İnsan karaciğer kanseri hücre dizisi |
| HUVEC | İnsan umbilikal damar endotel hücre dizisi |
| IAP | Apoptoz inhibitör protein |
| IARC | Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı |
| IBM | IAP bağlanma motifi |
| JNK | Jun N terminal kinaz |
| K-562 | İnsan lösemi hücre dizisi |
| KUT-1 | İnsan lösemi hücre dizisi |
| MAPK | Mitojen tarafından aktive edilen kinaz |
| MCF-7 | İnsan meme kanseri hücre dizisi |
| MKN-28 | İnsan gastrik kanseri hücre dizisi |
| MMLV | Moloney Murine lösemi virüs |
| MOMP | Mitokondri dış membran geçirgenliği |
| MPT | Mitokondriyal geçirgenlik değişimi |
| mRNA | Mesajcı RNA |
| MT-2 | İnsan lösemi hücre dizisi |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid |
| NCCD | Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesi |
| NFκB | Nüklear faktör kappa beta |
| NSCLC | Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizisi |
| PI3K | Fosfotidilinozitol 3 kinaz |
| PZR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| RNA | Ribonükleik asit |
| RT-PZR | Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu |
| SKB-3 | İnsan meme kanseri hücre dizisi |
| SK-Hep1 | İnsan karaciğer kanseri hücre dizisi |
| SNU-484 | İnsan gastrik kanseri hücre dizisi |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| Kısaltmalar | Açıklama |
|---|---|
| SPSS | Statistics Program for Social and Science |
| TIM | TRAF etkileşimli motif |
| TNF | Tümör nekroz faktör |
| TNFR | Tümör nekroz faktör reseptör |
| TRADD | TNFR ilişkili ölüm bölgesi |
| TRAF | TNFR ilişkili faktör |
| U937 | İnsan lösemi hücre dizisi |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |
| XIAP | X bağlantılı apoptoz inhibitör protein |

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çok hücreli organizmalarda, doku bütünlüğünün korunması ve canlılığın sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi için, hücre çoğalması ve hücre ölümünün uygun zaman ve uygun miktarlarda gerçekleşmesi ile dengede tutulması gerekir. Bu dengenin bozulması, canlılığın sağlıklı işleyişini aksatabilir. Kanser hastalığı, hücre çoğalmasının artması ve hücre ölümünün azalması şeklinde bu dengenin bozulmasından kaynaklanan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Hastalığın gelişmesi, pek çok faktöre bağlı ve çok aşamalı bir süreçtir. Fakat günümüzde karsinojen ajanların artması ile birlikte görülme sıklığı ve kanserle ilişkili ölümlerin sayısı da artmaktadır. Bu sebeple kanser hastalığı çağımızın en önemli sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir (Harrington, 2015)

Serviks kanseri, dünyada kadınlarda görülen kanserler arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Günümüzde serviks kanserinin tedavisi için cerrahi müdahalenin ardından radyasyon tedavisi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Fakat kullanılan kemoterapötik ajanların pek çok yan etkisi görülmektedir. Bu sebeple daha az yan etkiye sahip, kanserli hücreler üzerinde seçici şekilde düşük dozlarda daha fazla sitotoksik etki gösteren yeni ilaç araştırmaları devam etmektedir (Manzo-Merino vd., 2014).

Son yıllarda özellikle bitkisel kökenli ajanların kanserli hücrelerin çoğalmasını baskılayıcı etkileri araştırılmaktadır. Deguelin, *Legüminosa* familyasına ait bitkilerden izole edilmiş flavonoid kökenli bir rotenoidtir. Yapılan çalışmalarda, deguelinin farklı kanserli hücre dizileri üzerinde değişik konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını baskılayıcı etkileri *in vitro* olarak gösterilmiştir (Li vd., 2009). Ayrıca bazı normal hücre dizileri üzerinde düşük toksik etki gösterdiği de belirlenmiştir (Lee vd., 2010). Bu nedenle, günümüzde kullanılan pek çok kemoterapötik ajana göre düşük dozlarda etki etmesi, kanserleşme sürecinde ve kanserin erken aşamalarında premalignant hücrelere özellikle etki etmesi sebebiyle kemopreventif bir ajan olduğu ifade edilmiştir (Chun vd., 2003).

Çalışmamızın birinci amacı; deguelinin farklı dozlarının insan serviks karsinoma (HeLa) hücre dizisi üzerindeki çoğalmayı baskılayıcı etkilerinin doza ve zamana bağlı

olarak belirlenmesidir. İkinci amacımız ise, oluşan sitotoksik etkinin apoptotik hücre ölümü ile gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesidir.

# 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

## 2.1. Kanser

Kanser, tüm teknolojik gelişmelere ve araştırmalara rağmen hala tüm dünyada en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization, WHO) özel kanser ajansı olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (International Agency for Research on Cancer, IARC) 2012 yılında yayınladığı raporda tüm dünyada kanser hastalığının görülme sıklığı, yaygınlığı ve ölüm oranı açıklanmıştır. Raporda, 14,1 milyon yeni teşhis ve 8,2 milyon kanserle ilişkili ölüm olduğu bildirilmiştir. Aynı raporda kanser yaygınlığı 32,6 milyon insan olarak duyurulmuştur (IARC, 2013).

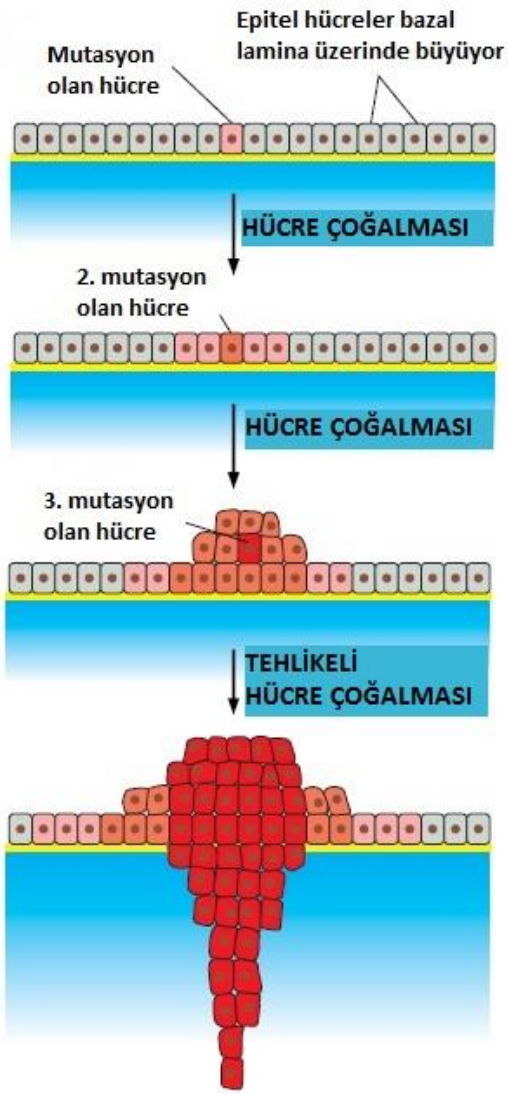
Kanser türlerine göre dağılıma bakıldığında ise, ilk sırada yeni kanser teşhislerinin % 13'ünü akciğer kanseri (1,8 milyon), ardından % 11,9 ile meme kanseri (1,7 milyon) ve % 9,7 ile kolon kanseri (1,4 milyon) izlemektedir. Kanserle ilişkili ölümlerde ise yine akciğer kanseri % 19,4 (1,6 milyon) ile ilk sırada yer alırken, % 9,1 ile karaciğer (0,8 milyon) ikinci, % 8,8 ile mide kanseri (0,7 milyon) üçüncü sırada yer almaktadır. Ayrıca raporda, serviks kanserinin 528 000 yeni teşhis ile 4. sırada yer aldığı ve kadınlar arasında kanserle ilişkili ölümlerde de yine 4. sırada bulunduğu belirtilmiştir. Bu sebeple raporda özellikle gelişmekte olan ülkelerde hastalığın izlenmesi ve tedavisi için ulusal programda bazı düzenlemelerin getirilmesinin gerekliliği vurgulanmıştır (IARC, 2013).

Kanser; bedensel, çevresel ve/veya biyolojik etkenler sebebiyle oluşan karmaşık genetik bir hastalıktır. Kansere sebep olan ajanlara **karsinojen** denilir. Karsinojenlerin etkisi ile genlerde meydana gelen değişim sonucunda da hücrede **kanserleşme süreci (karsinogenez)** başlamaktadır (Cooper ve Hausman, 2006).

Kontrolsüz hücre çoğalması sonucu oluşan hücre kitlelerine **tümör** adı verilir. Oluşan tümörler davranışlarına göre iki farklı şekilde isimlendirilirler. İlki, iyi huylu olarak bilinen **benign tümörler,** genellikle çevredeki dokulara yayılmaktan ziyade yavaş yavaş büyüyerek kütlelerini arttırırlar. Diğer grup ise kötü huylu olarak bilinen, genellikle hızlı bir şekilde büyüyerek, çevredeki dokuları istila eden ve uzak organlara gidip yerleşebilen

**malignant tümör**lerdir. Epitel hücrelerinden köken alan tümörlere **karsinoma;** bez epitel hücrelerinden köken alanlara **adenoma;** kas, kemik ve bağ doku gibi mezodermden köken alanlara **sarkoma;** kan ya da bağışıklık sistemi içinde oluşanlara ise **lösemi** ya da **lenfoma** adı verilir (Alison, 2001).

Normal bir hücrenin kanserli hücreye dönüşümünün çok aşamalı bir süreç olduğu bilinmektedir. Hücrelerin bu süreçte, aşırı ve zamansız çoğalmalarına, bağışıklık sisteminden kaçmalarına ve uzaktaki dokulara ulaşarak metastaz yapmalarına yol açan birçok genetik, metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri bilinmektedir (Merlo vd., 2006). Tüm bu değişikliklerin temelinde nokta mutasyonu, gen amplifikasyonu, delesyon, insersiyon ve yeniden düzenlenme gibi pek çok mutasyon çeşidi bulunmaktadır (Şekil 2.1). Bu mutasyonlar özellikle DNA tamirinde rol alan genler, proto-onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerde meydana geldiği ve tamir edilemediğinde kanserin gelişmesi söz konusudur. Özellikle, DNA onarımında görevli olan genlerde herhangi bir mutasyon meydana geldiğinde karsinogenez sürecinde hızlı bir gelişme görülür. Normalde hücre çoğalmasının düzenlenmesinde görev alan proto-onkogenlerin mutasyon geçirmeleri sonucu onkogen durumuna geçmeleri sonucu hücre çoğalması için aşırı protein aktivasyonunu uyararak hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına neden olur. Tümör baskılayıcı genler ise anormal hücrelerin çoğalmasının in-aktive edilmesinde görevlidir. Fakat bu genlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler de yine kontrolsüz hücre çoğalmasını tetiklemektedir (Coleman ve Tsongalis 2006).




Şekil 2.1. Kanserleşen bir hücrenin gelişim süreci (Alberts vd., 2002)

Kanser hastalığı; gelişimi, belirtileri ve sonuçları bakımından kişiden kişiye farklılıklar gösterebilir. Bu farklılıklar moleküler ve hücresel düzeyde de görülebilmektedir (Merlo vd., 2006). Fakat yine de normal hücrelere göre kanser hücrelerinin çoğunda ortak olan bazı özellikler tanımlanmıştır. Hanahan ve Weinberg'in 2000 yılında yayınladıkları bir derlemede çoğu kanser hücrelerinde ortak olarak görülen 6 önemli karakteristik özellik tanımlanmıştır (Şekil 2.2) (Hanahan ve Weinberg, 2000).




Şekil 2.2. Kanserleşen bir hücrede görülen ortak karakteristik özellikler (Hanahan ve Weinberg, 2000)

- **Büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik:** Normal hücrelerin bekleme fazından aktif bölünme fazına geçebilmeleri için mitojenik büyüme sinyalleri almaları gerekir. Fakat çoğu tümör hücresinin, normal mikro çevreden bağımsız hareket edebilmek için kendilerine ait normal büyüme sinyalini taklit eden sinyaller ürettikleri bilinmektedir.

- **Anti-büyüme sinyallerine duyarsızlık:** Normal doku içinde, homeostazın sağlanması amacıyla hücrelerin bekleme fazında kalmalarını sürdürmek için mikro çevreden ve etraftaki hücrelerden anti-büyüme sinyalleri üretilmektedir. Fakat kanserli hücreler bu uyarılara duyarsız kalmaktadır.
- **Apoptozdan kaçma:** Homeostazın sağlanması için yaşlanmış, hasar görmüş ya da istenmeyen hücrelerin apoptotik hücre ölümü ile ortadan kaldırılması

gerekmektedir. Fakat kanserli hücrelerin çoğunda belki de hepsinde apoptoza karşı direnç ve apoptozdan kaçış görülmektedir.

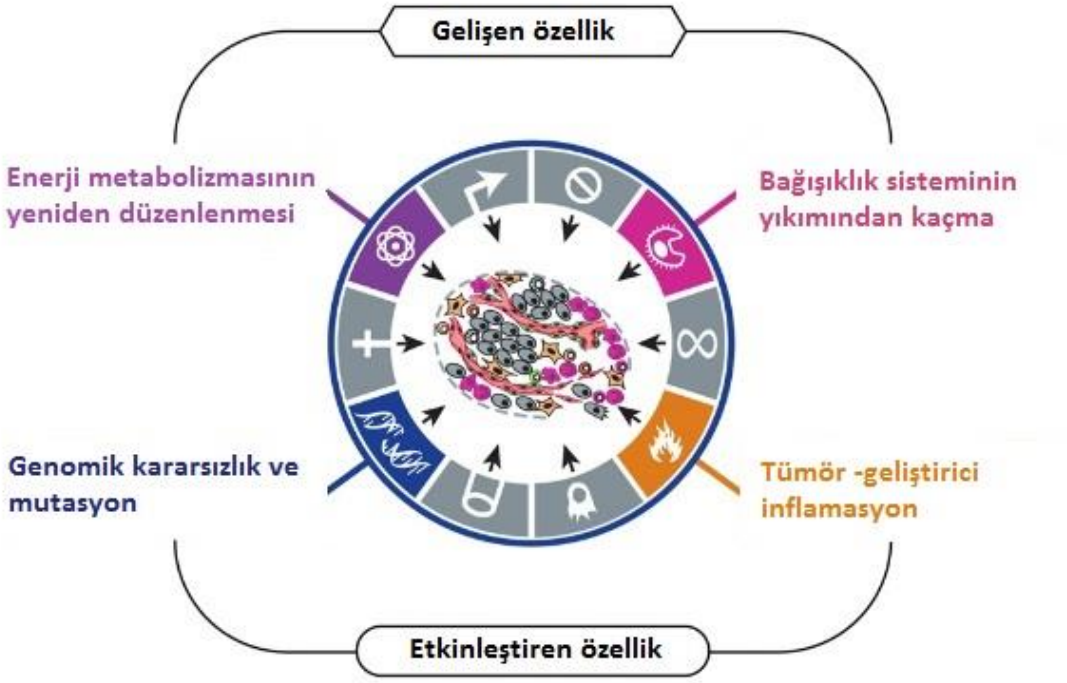
- **Sınırsız çoğalma potansiyeli:** Normal hücrelerde telomer uç problemi sebebiyle bölünme sınırlı sayıdadır. Fakat kanserli hücrelerde aktif telomeraz enzimi sayesinde kısalan telomer bölgelerini sürekli tamir etmesi sebebiyle hücrelerin bölünmeye ve çoğalmaya devam ettikleri bilinmektedir.

- **Sürekli anjiyogenez:** Çoğalan tümör hücrelerinde besin ve oksijen yetersizliği başladığı için tümör hücreleri üretmiş oldukları moleküller sayesinde yeni damar oluşumunu olarak tanımlanan anjiyogenez sürecini uyarırlar. Bu sayede artan besin ve oksijen ihtiyaçlarını karşılamış olurlar.

- **İnvazyon ve metastaz:** Kanserli hücrelerin invazyon denilen yakınlardaki dokulara yayılma özelliklerinin yanı sıra anjiyogenez sayesinde uzaktaki doku ya da organlara da ulaşarak metastaz yapma ve oraya yerleşip yeni koloniler oluşturma özelliğini kazandıkları bilinmektedir.

Kanser hastalığı ile ilgili çalışmalar devam ederken sürekli yeni bilgiler açığa çıkmaktadır. Bu yeni bilgilere göre Hanahan ve Weinberg 2011 yılında kanser hücrelerinin karakteristiklerine iki yeni karakteristik özellik ilave etmiş ve yayınlamışlardır (Şekil 2.3.) (Hanahan ve Weinberg, 2011).

- **Enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi:** Normal hücreler oksijen varlığında, glikozu sitozolde glikoliz yoluyla pirüvata, ardından da mitokondride karbondioksite kadar çevirirler. Kanser hücrelerinde ise daha hızlı enerji elde etmek için glikoliz enerji metabolizması sınırlandırılarak glikozu hızlı bir şekilde laktik asite çevrilerek kullanılır.
- **Bağışıklık sisteminin yıkımından kaçma:** Kanser hücreleri, T ve B lenfositler, makrofaj ve doğal öldürücü hücreler gibi bağışıklık sisteminin ana elemanlarından ve onların yıkımından kaçabilme özelliğine sahiptir (Hanahan ve Weinberg, 2011).




Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerine yeni eklenen özellikler (Hanahan ve Weinberg, 2011)

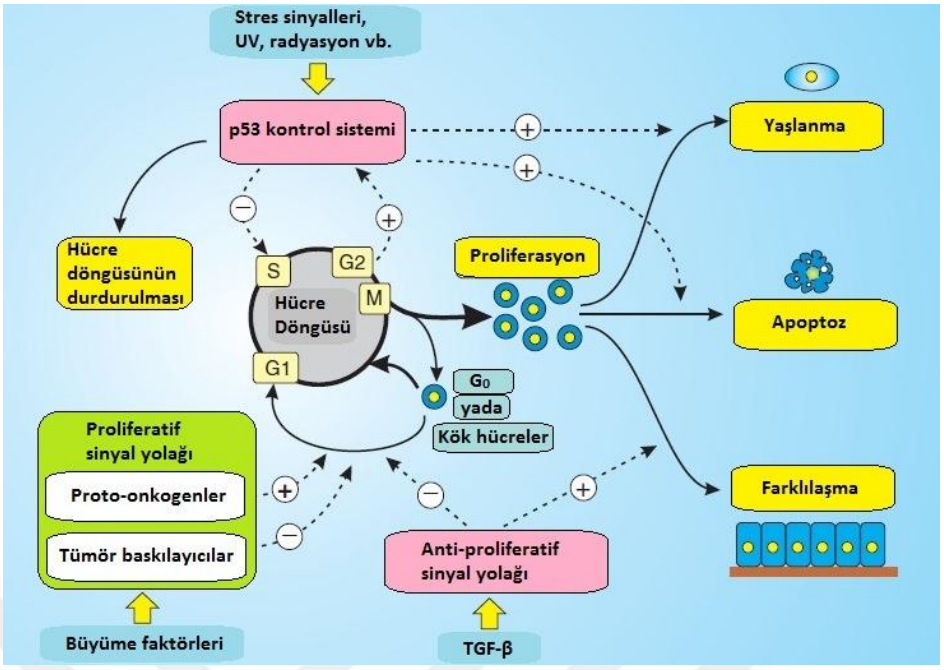
Kanser, normal hücrelerde sağlıklı bir şekilde işleyen bölünme, farklılaşma ve hücre ölümü gibi mekanizmaların bilgi ve sinyal akışında oluşan bazı aksaklıklar sonucunda, hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki değişimlerden kaynaklandığı için özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır (Cooper ve Hausman, 2006). Bu noktada dikkati çeken en önemli değişim ise çoğalma ve hücre ölümü arasındaki dengenin kaybıdır. Bu kayıp neticesinde hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam etmektedir. Kanser hastalığı ile baş edebilmek için moleküler seviyedeki bu değişimlerin aydınlatılması ve o noktalara müdahale edilmesi güncel tedavi yaklaşımlarının temelini oluşturmaktadır. Bu sebeple son zamanlarda yapılan moleküler araştırmalar, hücre döngüsü, apoptoz ve kanser ilişkisi üzerinde yoğunlaşmıştır.

## 2.2. Hücre döngüsü ve kanser

İki hücre bölünmesi arasındaki süreç **hücre döngüsü** olarak isimlendirilmektedir. Tüm somatik hücreler, pozitif ve negatif sinyaller tarafından düzenlenen hücre döngüsü sürecindeki mitoz bölünme ile çoğalırlar. Çoğalma uyarısını alan bir hücre, sırasıyla bir takım biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler geçirerek birbirine genetik olarak tıpa tıp benzeyen iki yeni hücre oluşturur (Alberts vd., 2002).

Hücre döngüsü, bölünmeye hazırlık yapılan **interfaz** ile hücresel içeriğin ve genetik materyalin iki yavru hücreye eşit olarak dağılması yani **mitoz bölünme** olmak üzere iki evrede incelenmektedir. Hücre döngüsünün sağlıklı bir şekilde ilerlemesi için bazı aşamalarda kontrol edilmesi gerekmektedir. Kontrolün gerçekleştiği bu noktalar, replike olmamış ya da hatalı replike olmuş DNA'lara karşı duyarlıdırlar. Kontrol noktalarında belirlenen hasarlı DNA'ya sahip olan hücrelerin bölünmesi bu sayede engellenmektedir. Kontrolün gerçekleştiği aşamalar; G1/S geçişi, G2/M geçişi ve M kontrol noktaları olarak isimlendirilmektedir (Vermeulen vd., 2003).

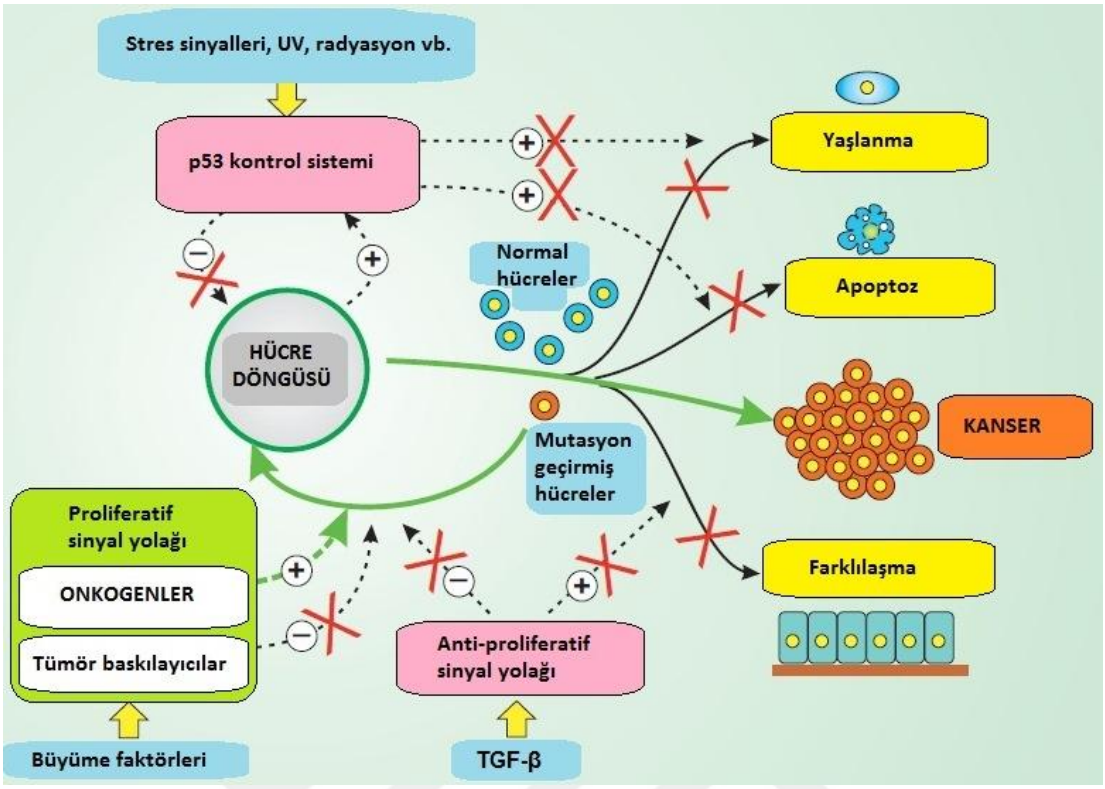
Kanserli hücrelerde, hücre kontrol mekanizmalarından kaçış gözlenmektedir. Bunun en temel sebeplerinden birisi proto-onkogen veya tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlardır. İnsan kanserlerinin yaklaşık % 90'ında pRb, % 50'sinde ise *TP53* olarak bilinen tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğradığı bilinmektedir. Şekil 2.4'te gösterildiği gibi normalde inaktif durumda bulunan *TP53* geni, herhangi bir DNA hasarında aktif hale gelerek p21 genini uyarır. p21 geni, hücrenin $G_1$ fazından S fazına geçişini engeller. Bu sayede hasarlı DNA'nın replikasyonu ve neticede yeni hücrelere hasarlı DNA geçişi önlenmiş olur. Aynı zamanda *TP53* geni DNA tamirinde görevli proteinlerin transkripsiyonunu da sağlar. Eğer DNA hasarı tamir edilirse hücre döngüsü devam eder. Ancak DNA hasarı tamir edilemezse *TP53* geni bax proteinini aktive ederek hücrenin apoptoza gitmesini sağlar. Bu sayede hasarlı DNA'ya sahip olan hücre ortadan kaldırılmış olur (Berridge, 2014) (Şekil 2.4).




Şekil 2.4. Hücre döngüsü ve *TP53* kontrol sistemi (Berridge, 2014)

Fakat şekil 2.5'te gösterildiği gibi, *TP53* geni herhangi bir mutasyon sebebiyle görevini yerine getiremezse hasarlı DNA'ya sahip hücre, kontrol noktalarından kaçarak çoğalmaya devam eder ve kanserleşme süreci hızlı bir şekilde gelişebilir (Şekil 2.5) (Berridge, 2014).

Ayrıca hücre döngüsünün farklı fazlarındaki önemli proteinlerin mutasyonu yoluyla da hücre döngüsünün kontrolü bozulur ve kanser hastalığı gelişebilir. Özellikle kanserleşme sürecinde hücre döngüsü ile ilgili mutasyonların genellikle siklin, siklin bağımlı kinaz (CDK), CDK-aktive edici enzimler, siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CKI) ve kontrol noktası proteinlerini kodlayan genlerde olduğu belirlenmiştir. Bu mutasyonların bir ya da birkaçının hücrede gerçekleşmesi hücre döngüsünün kontrolsüz bir şekilde devam etmesi ile sonuçlanır (Garrett, 2001).




Şekil 2.5. *TP53* kontrol sisteminin devre dışı kaldığı durumlarda gözlenen kontrolsüz hücre çoğalması (Berridge, 2014)

## 2.3. Hücre ölümü

Hücreler bölünerek çoğalmaya devam ederken aynı zamanda yaşlanmış ya da hasara uğramış hücrelerin de yok edilmesi gereklidir. Bu hassas denge hücre ölümü olarak tanımlanan ve çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenen bir süreç ile kontrol edilmektedir. Hücre ölümü özellikle gelişim, homeostaz ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli bir rol alan fizyolojik bir süreçtir (Kiraz vd., 2016).

Biyolojik öneminden dolayı hücre ölüm çeşitleri hakkında çok fazla araştırma yapılmış ve birbirlerine benzeyen ya da farklılık gösteren pek çok morfolojik ya da biyokimyasal özelliğin olduğu dikkat çekmiştir. Belirlenen her farklı özelliğin farklı bir hücre ölümü çeşidi olmadığı ya da benzer morfolojik özelliklere sahip olup farklı biyokimyasal olayların gözlendiği durumlar bilim dünyasında bazı karışıklıklara neden olmuştur. Bu sebeple ilk olarak 2005 yılında (ardından 2009, 2012, 2015 ve son olarak da 2018 yıllarında) dünyanın pek çok yerinden hücre ölümü çalışmalarına katılan

araştırmacılar bir araya gelerek Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesini (NCCD) oluşturmuşlardır. Bu komitenin amacı, hücre ölümü araştırmacıları arasında hücre ölümü ve farklı özellikleri için ortak bir kriter oluşturarak terminolojik karışıklıkları ve yanlış kullanımları önlemektir. Hücre ölümü alanında yapılan çalışmalar ve bulunan yeni bilgiler arttıkça bu kriterlerde ve sınıflandırmalarda bazı güncellemeler yapılmaktadır. Örneğin hücre ölümünün sınıflandırılmasında ilk zamanlarda genellikle morfolojik özellikler kullanılmış, sonra biyokimyasal özelliklere göre yeni sınıflandırma yapılmış, son bilimsel gelişmeler doğrultusunda ise moleküler özellikler ve mekanizmaların ön planda olduğu tanımlama ve sınıflandırmalar yapılmıştır (Kroemer vd., 2005; Galluzzi vd., 2018).

NCDD'nin 2018 yılında yayınladığı rapora göre, hücre ölümü moleküler mekanizmalarına göre; dış apoptoz, iç apoptoz, mitokondriyal geçirgenlik değişimi (MPT)-odaklı nekroz, nekroptoz, ferroptoz, piroptoz, partanatoz, entotik hücre ölümü, NETotik hücre ölümü, lizozom bağımlı hücre ölümü, otofaji bağımlı hücre ölümü, immünojenik hücre ölümü, hücresel yaşlanma ve mitotik katastrof olarak sınıflandırılmıştır (Galluzzi vd., 2018).

Bu ölüm türleri arasında, kanserleşen hücrelerin farklı mekanizmalarla apoptozdan kaçışı araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Eğer kanserli hücrelerin apoptotik sürece girmesini sağlayan yeni ajanlar belirlenebilirse hastalığın tedavisinde büyük bir adım atılmış olacaktır. Bu nedenle, pek çok araştırmacı bu tip yeni moleküllerin sentezi ya da izole edilmesi çalışmalarını gerçekleştirmektedir.

## 2.4. Apoptoz

Apoptoz, istenmeyen ya da hasarlı hücrenin enerji gerektiren ve genetik olarak kontrol edilen mekanizmalar ile kendi kendini yok etmesi olarak tanımlanmaktadır (Elmore, 2007).

### 2.4.1. Tarihçesi ve biyolojik önemi

1842 yılında Carl Vogt ilk ‘doğal hücre ölümü’ varsayımını ortaya koymuştur. Ardından 1858 yılında Rudolp Wirchow doğal hücre ölümünün nekrozdan farklı olduğunu tanımlamış ve bunu ‘nekrobiyoz’ (necrobiosis) olarak isimlendirmiştir. Walther Flemming ise 1885 yılında doğal hücre ölümünün morfolojik değişimlerini açıkça tanımlamış ve bunu ‘kromotoliz’ (chromatolysis) olarak isimlendirmiştir. Sonraki yaklaşık 30 yıl boyunca literatürde bu şekilde yer almıştır (Sankari vd., 2012). 1960’lı yıllarda hücre ölümü araştırmalarına ilgi tekrar artmış ve 1964 yılında Lockshin ‘programlı hücre ölümü’ terimini kullanmıştır. Bu hücre ölümünün gelişim boyunca kazara olmadığı ve birbirini izleyen kontrollü aşamalardan oluştuğunu ileri sürmüştür (Locksin ve William, 1964).

Kerr ve arkadaşları 1972 yılında bilim dünyasına yeni bir terim kazandırmış ve sağlıklı dokularda, normal gelişimde, atrofide ve tümör gerilemesinde görülen programlı hücre ölümünü ‘**apoptoz**’ olarak tanımlamışlardır (Kerr vd., 1972). Apoptoz terimi eski Yunanca’ da apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprakların dökülmesini tanımlamak için kullanılan bir sözcüktür (Duprez vd., 2009). 1980’li yılların sonlarına doğru apoptozun gelişim ve hastalıklarda önemli bir role sahip olduğu anlaşılmıştır. 2002 yılında apoptoz araştırmalarının 3 öncüsü olan Sydney Brenner, H. Robert Horvitz ve John E. Sulston tıp ve fizyoloji alanında apoptoz üzerindeki çalışmalarıyla Nobel ödülü almışlardır (Sankari vd., 2012). Halen apoptoz ve mekanizmaları ile ilgili pek çok sorunun yanıtını arayan bilim insanları bu konudaki araştırmalarını sürdürmektedir.

Apoptoz, apoptotik genlerin aktive olmasıyla, enerji bağımlı ve genetik olarak kontrol edilen istenmeyen ya da hasarlı hücrenin kendi kendini yok etmesi olarak tanımlanabilir. Bu hücre ölümünde genellikle; kromatinlerin yoğunlaşması ve parçalara ayrılması, sitoplazmik organellerin yoğunlaşması, endoplazmik retikulumun genişlemesi ve hücre hacminde küçülme gibi tipik morfolojik değişimler gözlenmektedir. Ayrıca plazma zarındaki değişimler ve bu sayede inflamasyonun önlenmesi ile de diğer hücre ölüm şekillerinden ayrılmaktadır (Kam ve Ferch, 2000).

Apoptoz, çok hücreli organizmaların iç dengelerinin ve gelişimlerinin sağlanmasında önemli bir mekanizmadır. Apoptotik hücre ölümü; lenslerin gelişimi, iç kulağın şekillenmesi, kas gelişimi ve parmak arası zarların ortadan kaldırılması gibi gelişme döneminde organ ve dokuların yeniden düzenlenmesinde oldukça etkili bir mekanizmadır. Ayrıca sinir ve bağışıklık sistemi hücrelerinin sayısal olarak dengelenmesi de yine apoptoz ile sağlanmaktadır. Bunun dışında apoptozun, yetişkin organizmalarda emzirme dönemi sonunda meme bezinin gerilemesi, ovulasyon gerilemesi, immün sistemin dengelenmesi gibi önemli süreçlerde de rol aldığı bilinmektedir (Duprez vd., 2009).

### 2.4.2. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Apoptoza uğrayan bir hücre, diğer hücreler ile olan bağlantılarını koparark komşu hücrelerden ayrılır, hücre yüzeyindeki mikrovilluslar kaybolur ve hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (Kam ve Ferch, 2000). Nukleusta ise hem kromatin hem de nuklear zarda değişimler gerçekleşir. Kromatin, nuklear zara doğru kayarak yoğun kümeler oluşturur. Nuklear zar sağlam kalır, fakat nuklear porlar yeniden dağılır. Aynı zamanda nuklear proteinlerde de değişimler görülür. Mitokondride DNA bozulur. Endoplazmik retikulumda (ER) sisternalar genişler ve birbirine kaynaşır. ER yapısını kaybeder ve mitokondri zar bütünlüğü bozulur (Sankari vd., 2012). Apoptotik hücrenin sitoplazmik zarı bozulur ve kabarcıklar (blebbing) oluşur. Hücre zarı ile çevrili sitoplazmik kalıntılar apoptotik cisimler olarak isimlendirilen parçalara ayrılır. Apoptotik cisimler ise fagositlerin içlerine alınarak ortadan kaldırılırlar. Bu sayede herhangi bir inflamatuar cevap oluşmaz (Atkin-Smith and Poon, 2017).

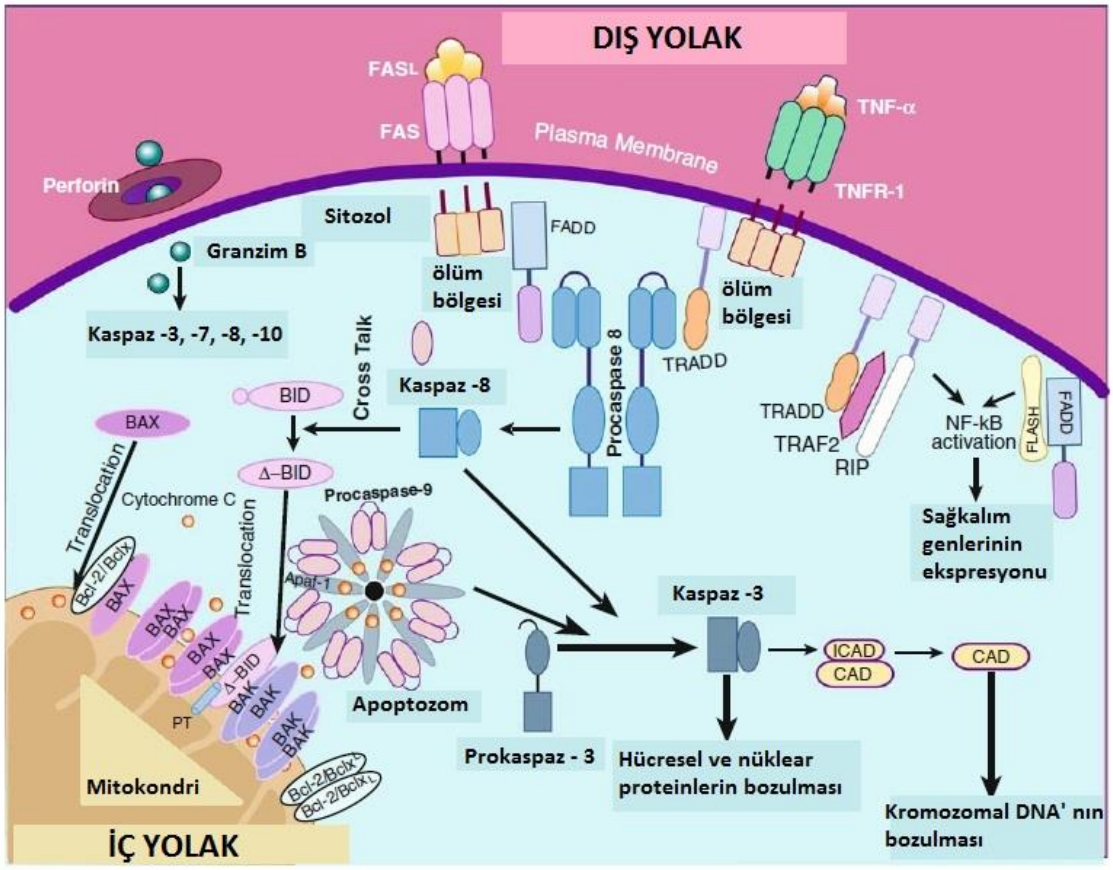
Apoptotik hücreler pek çok biyokimyasal değişiklik gösterir. Örneğin; pek çok protein substratların parçalanmasına neden olan proteolitik enzimlerin aktivasyonu gerçekleşir. Bunlar içinde apoptozun başlaması ve devam etmesi açısından büyük bir öneme sahip olan kaspazlar ilk sırada yer almaktadır. Kaspaz enzimleri sayesinde DNA'nın 180-200 baz çiftlik (bp) oligonukleozomal parçalara ayrılması gerçekleşir (Chowdhury vd., 2008). Ayrıca transglutaminazlar, protein çapraz bağlanması sayesinde sitoplazmik proteinleri apoptotik cisimlere dönüştürür. Bunun dışında hücre zarındaki

fosfotidilserinin yön değiştirmesi sayesinde fagositik tanıma mümkün olmaktadır (Poon vd., 2014).

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi için apoptoza özgü bu morfolojik ve biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla morfolojik, immüno-histokimyasal, biyokimyasal, immünolojik ve moleküler biyolojik pek çok farklı yöntem kullanılabilir.

### 2.4.3. Mekanizmaları

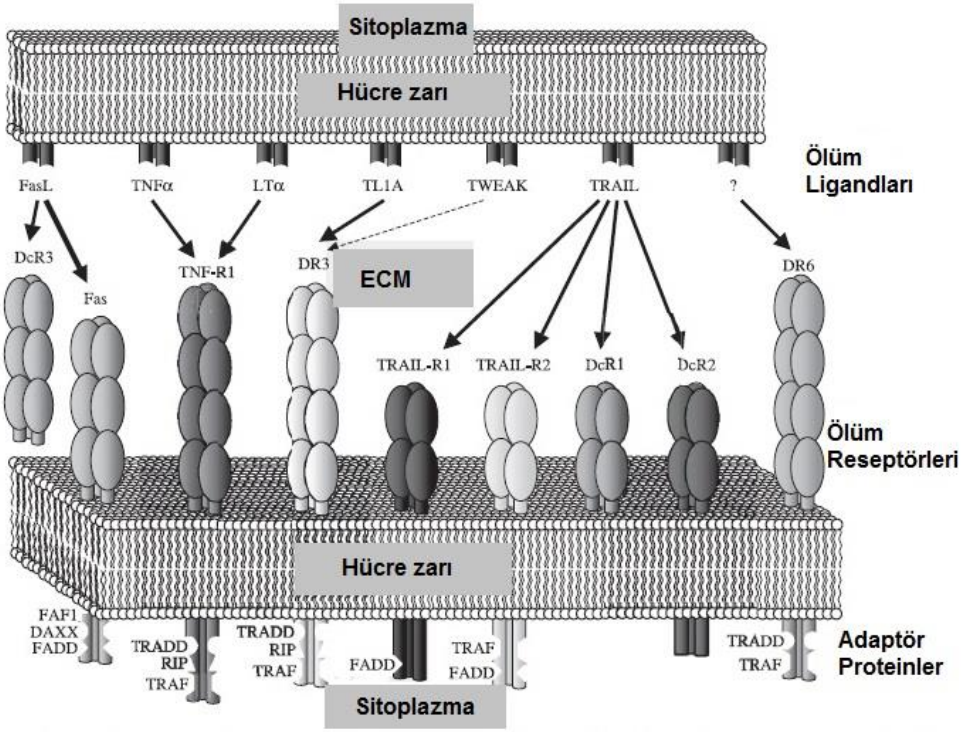
Apoptozun moleküler mekanizması, insan ve diğer memelileri de içeren gelişmiş çok hücreli organizmalarda evrimsel olarak oldukça iyi korunmuştur. Besin yetersizliği, hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, geri dönüşümsüz DNA hasarı, hücre döngüsünün bozulması, hücre metabolizmasındaki hatalar, büyüme faktörleri eksikliği, serbest radikaller, hücre içi kalsiyum ($Ca^{++}$) artışı, ısı şoku, viral enfeksiyon ve bakteriyal toksinler, kimyasallar, iyonize radyasyon, direk fiziksel yaralanmalar gibi pek çok fizyolojik ve patolojik uyarı apoptotik programı aktive edebilir. Bu uyarılar farklı moleküler mekanizmalar üzerinden apoptozu başlatır (Ghatage vd., 2012). Apoptoz süreci; apoptozun başlatılması, hücre içi proteazların aktivasyonu, hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin olması ve fagositoz olarak kabaca 4 aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar genel olarak dış yolak, iç yolak, ER aracılı apoptoz ve perforin/granzim olmak üzere 4 farklı sinyal ileti yolağı üzerinden gerçekleşir. Bu apoptoz yolakları ve düzenlenmesinde görev alan molekül ve organeller temelde farklı olsa da yolaklar arasında geçişler ve farklı etkileşimler Şekil 2.6'da görüldüğü gibi gerçekleşebilir (Saikumar ve Venkatachalam, 2009).




Şekil 2.6. Apoptoz sinyal ileti yolakları ve birbirleriyle etkileşimleri (Saikumar ve Venkatachalam 2009)

### *2.4.3.1. Dış yolak*

Apoptozun dış yolağında, apoptozu başlatmak için hücre dışı sinyaller kullanılır. Hücre ölüm sinyalleri, ki bunlar ölüm ligandları olarak da bilinir, tümör nekroz faktör (TNF) süperailesi üyeleridir ve hücre zarında bulunan tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) süperailesi ölüm reseptörlerine bağlanırlar (Şekil 2.7). Bugüne kadar TNF ve TNFR süperailelerine ait olan toplam 19 ligand ve 30 reseptör tanımlanmıştır (Locksley vd., 2001).




Şekil 2.7. Bazı TNF süperailesi ve TNFR süperailesi üyeleri ve yapıları (Curtin ve Cotter 2003)

TNF süperailesi ligandlarının çoğunluğu, hücre içi N ucu ve hücre dışı C ucu bulunan tip 2 transmembran proteinidir. Ligandlar kısa sitoplazmik bölge ve oldukça uzun bir hücre dışı bölge bulundururlar. Hücre dışı bölgeleri çözülebilir molekül üreten spesifik metalloproteinazlar tarafından kesilebilir. Genellikle, kesilmiş ve kesilmemiş ligandlar kovalent olmayan homotrimer olarak aktif olsa da sadece bazı üyeler heterotrimer olabilir. Hem mebrana bağlı hem de gizlenmiş ligandlar normal ve malignant çeşitli hücreler tarafından ekprese edilir. TNF süperailesi üyelerinin çoğu, transmembran hücre yüzey proteini olarak eksprese edilir ve lokal seviyede etki ettikleri düşünülür. Bu süperailenin bazı önemli üyeleri TNF-a, FasL (CD95L) ve TRAIL olarak sayılabilir (Wiens ve Glanney, 2011).

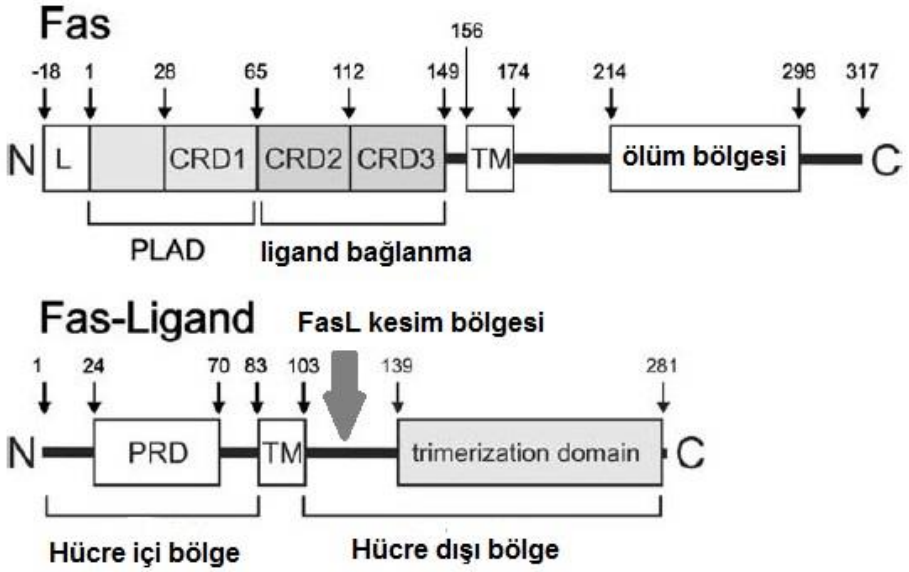
TNFR süperailesinin çoğunluğu, hücre içi N ucu ve hücre dışı C ucu bulunan tip 1 transmembran proteinlerden oluşur. Yapıları uzundur ve hücre dışı bölgelerinde genellikle 1-4 arasında özel (hallmark) sistein aminoasiti bakımından zengin bölge (CRDs) içerirler. CRD'ler 3 disülfit zincirinin üzerine katlanmış formunda korunmuş 6 sistein içeren yaklaşık 40 aminoasitlik yalancı tekrarlardır (Wiens ve Glenney, 2011).

Bugüne kadar insanda TNFR süperailesinin 30 üyesi tanımlanmıştır. TNFR üyeleri sitoplazmik sekanslarına ve sinyal özelliklerine göre 3 gruba ayrılmıştır.

1. Grup: Sitoplazmik ucunda ölüm bölgesi (Death Domain-DD) bulunduran Fas, TNF-R1, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2 ve DR6 birinci gruptur. Ölüm bölgesi içeren reseptörlerin ilgili ligandları ile aktivasyonu Fas ilişkili ölüm bölgesi (Fas Associated Death Domain, FADD) ve TNFR ilişkili ölüm bölgesi (TNFR associated death domain, TRADD) gibi hücre içi ölüm bölgesi içeren adaptörlerin devreye girmesine yol açar. Bu moleküller sırası ile kaspaz kaskadının aktivasyonuna ve apoptozun uyarılmasına neden olur.

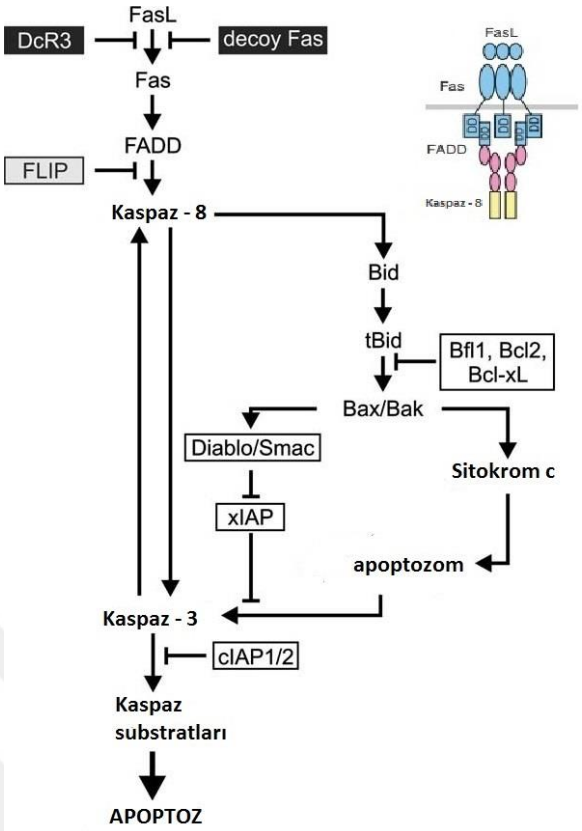
2. Grup: Bu reseptörler sitoplazmik kuyruklarında bir ya da daha fazla TNFR ilişkili faktör (TRAF) etkileşimli motif (TIMs) içerirler. TIM içeren TNF reseptörlerin aktivasyonu TRAF ailesi üyelerinin devreye girmesine ve nüklear faktör κB (NFκB), Jun N-terminal kinaz (JNK), p38, ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz (ERK) ve fosfotidilinozital-3-kinaz (PI3K) gibi çeşitli sinyal ileti yolaklarının aktivasyonuna yol açar.

3. Grup: Sitoplazmik ucunda fonksiyonel hücre içi sinyal bölgesi ya da motifi içermeyen reseptörlerdir. Bu reseptör grubu hücre içi sinyaller sağlayamasa bile diğer iki reseptör ve ilgili ligadlarının sinyalleri ile etkili bir şekilde yarışır. Bu sebeple, bu tuzak reseptörler diğer TNF reseptör sinyal ileti yolaklarının aktivasyonunu engelleyerek fonksiyon gösterirler (Dempsey vd., 2003).




Şekil 2.8. *FAS* ve *FASL* yapısı (Wajant vd., 2003)

İnsan *FAS* geni 9 ekzon bölgesi içerir ve kromozom 10'da tek lokusta eksprese edilir. FasL ölüm ligandı, Fas ölüm reseptörüne bağlandığında apoptozun başlaması için sinyal ileti yolağı aktive olur (Şekil 2.8). Şekil 2.9'da gösterildiği gibi, ligand reseptör bağlanması, reseptörün üçlü yapı kazanması ve reseptörün ölüm bölgesi ile adaptör protein arasında homofilik etkileşimler oluşmasını sağlar ve sonuçta adaptör protein hücre membranında yerleşir. FADD'ın ölüm ilerletici bölgesi prokaspaz 8'e bağlanır. Ligand, reseptör ve prokaspaz 8 bağlanması ölüm başlatıcı sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex, DISC) olarak bilinir. DISC sonra toplanmaya ve prokaspaz 8'i aktive etmeye başlar. Enzimin aktive olmuş formu yani kaspaz 8, ilerletici kaspaz ya da diğer ilerletici molekülleri keserek apoptozu başlatır (Wajant vd, 2003; .Li ve Yuan, 2008)

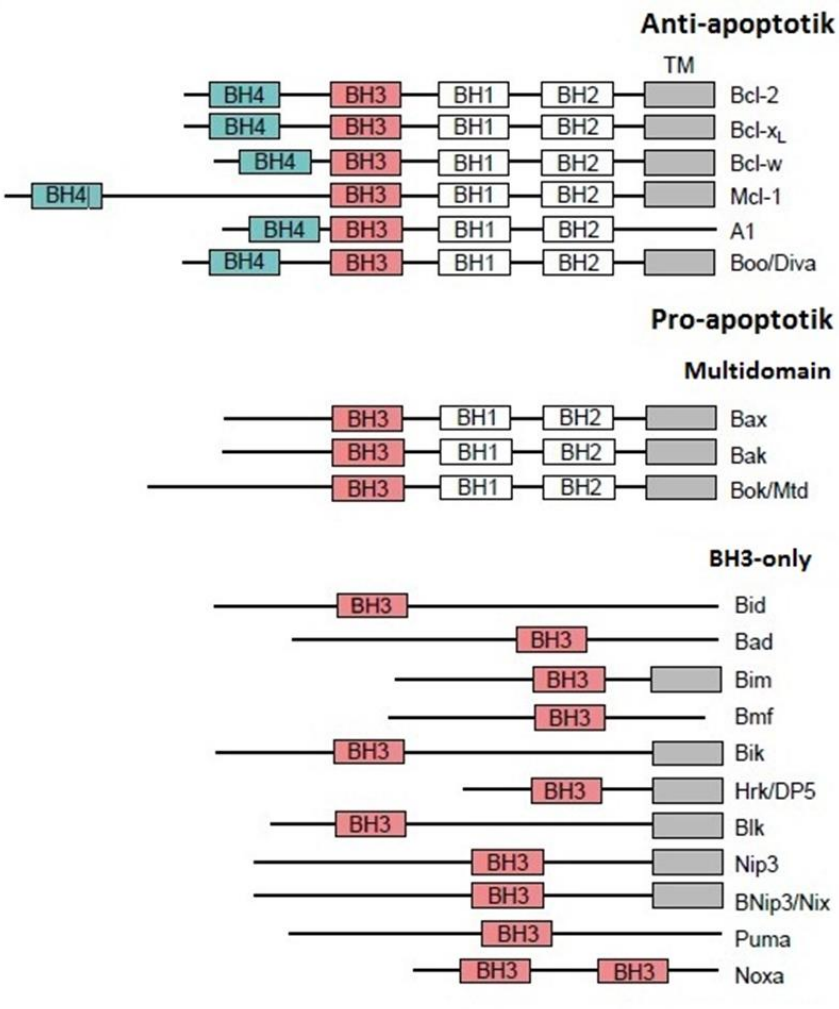



Şekil 2.9. *FAS* aracılı apoptotik hücre ölüm yolağı (Wajant vd, 2003; .Li ve Yuan, 2008)

### *2.4.3.2. İç yolak*

Apoptozun iç yolağı genel anlamda, DNA hasarı ve sitotoksik muamele gibi çeşitli hücre içi uyarılar tarafından aktive edilen, Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından kontrol edilen ve mitokondrinin aracılık ettiği apoptotik sinyal ileti yolağıdır (Wu vd., 2018).

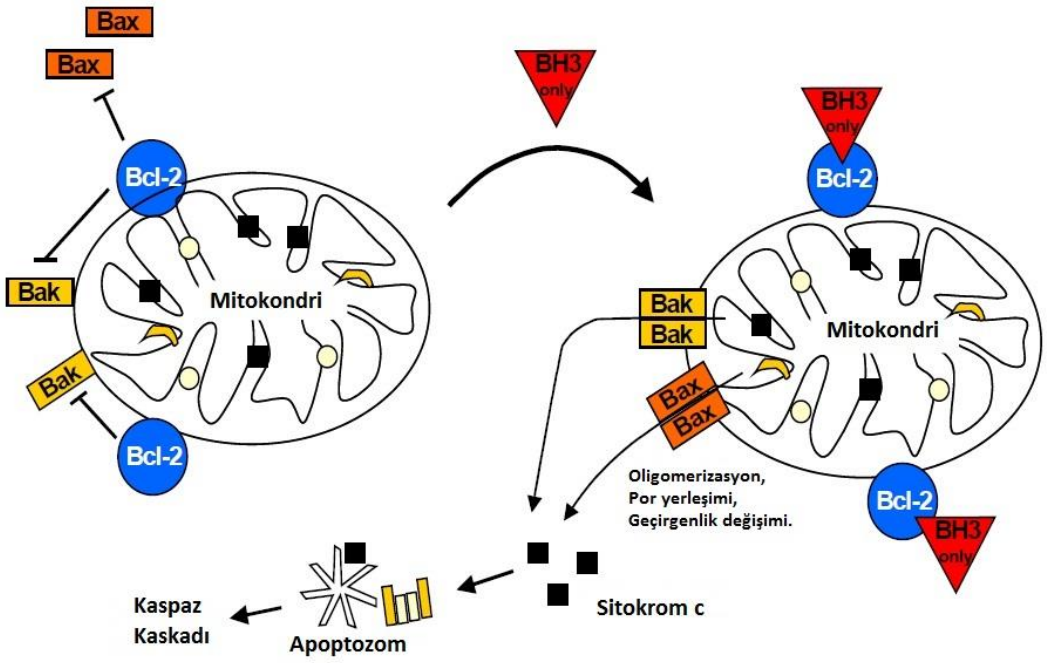
İlk olarak insan B hücreli lenfomada (B cell lymphoma/leukemia-2) tanımlanan Bcl-2 ailesi üyeleri, apoptoz sürecinde özellikle mitokondri zar geçirgenliğinin düzenlenmesinde görev almaktadır. Bugüne kadar Bcl-2 ailesinin 25 üyesi tanımlanmıştır. Bu proteinler sitoplazma, mitokondri, düz endoplazmik retikulum ve perinükleer zarlarda bulunurlar. Şekil 2.10.'da gösterildiği gibi Bcl-2 homoloji (BH) bölgesi olarak isimlendirilen 4 bölgeden en az birine sahiptirler. Pro- ve anti- apoptotik etkilerine ve BH bölgeleri bulundurma durumlarına göre 2 gruba ayrılırlar (Pihan vd., 2017) (Şekil 2.10).




Şekil 2.10. Bcl-2 ailesi üyeleri (Kuwana vd., 2003)

**Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi:** Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri çoklu bölge effektör (multidomain effector) proteinleri ve BH3-only proteinleri olarak iki alt sınıfa ayrılırlar. ***Çoklu bölge effektör proteinleri*** Bax, Bak ve Bok/Mtd'dir. BH 1-2-3 bölgelerini taşırlar ve aktive olduklarında mitokondri dış membran geçirgenliği (MOMP) olarak bilinen mitokondri dış zarının bütünlüğünü bozan değişikliğe sebep olurlar. Bu şekilde dış mitokondri membran geçirgenliğinin artışı ise, pro-kaspaz 9'un aktivasyonunu sağlayan ve apoptozomun bir parçası olan sitokrom c'nin salınımına sebep olur (Cichorek, 2008). ***BH3-only proteinleri*** ise Bim, Bid, Bad, Bik, Bmf, Blk, Hrk/DP5, Nip3, BNip3/Nix, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler, sadece BH3 bölgesi içerirler. BH3-only proteinleri apoptozu başlatmak için anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanır ve onların görevlerini yeniden düzenlerler. BH3-only protein sinyalleri mitokondriyal apoptotik yolağın başlaması için önemlidir (Cichorek, 2008).

**Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi:** Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri; Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w ve Myc-1'dir. Bu proteinler, 4 BH bölgesinden dördünü taşırlar ve apoptozu baskılarlar. Bu anti-apoptotik proteinlerin hepsi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi eşlerini inaktive ederek ve mitokondriyal dış membran bütünlüğünü koruyarak hücre sağ kalımını düzenlerler. Anti-apoptotik proteinler mitokondriden sitokrom c ve endoplazmik retikulumdan kalsiyum ($Ca^{++}$) iyonlarının dışarı çıkmasını engellerler (Cichorek, 2008)




Şekil 2.11 Bcl-2 ailesi tarafından apoptozun düzenlenmesi (Gewies, 2003)

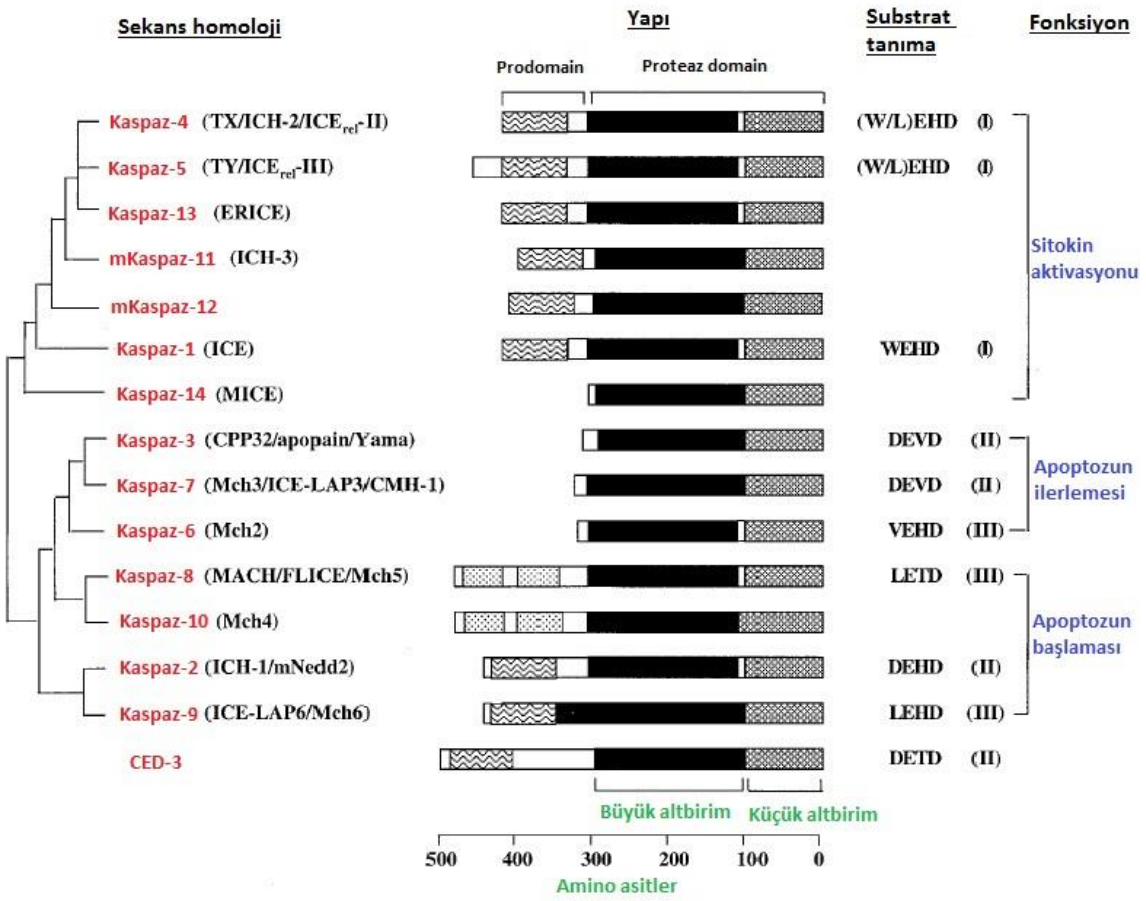
Homeostatik dengenin olduğu durumlarda anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondriyal hasara sebep olan Bax ve Bak gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini engelleyerek mitokondri bütünlüğünü sürdürür. Hücresel stres olduğunda BH3-only proteinleri aktive olur ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine karşı koyar. Neticede bax ya da bak'ın engellenmesi ortadan kalkar ve bax benzeri faktörler konformasyonel değişime uğrarlar, dış mitokondri zarlarına gömülürler ve burada geçirgenlik değişimini teşvik edererek kanal şekli değişimi ile sitozole sitokrom c ve apoptojenik faktörler salınımına yol açar (Suhaili vd., 2017). Sonra sitokrom c, Apaf-1 ve ATP ile birleşerek prokaspaz-9 un aktivasyonunda görevli apoptozom olarak bilinen bir platform şekillenir (Yuan ve Akey,

2013). Aktif kaspaz-9, apoptotik hücre ölümünün ilerletilmesinde kritik öneme sahip kaspaz-3,-6 ve -7 gibi sonraki ilerletici kaspazları aktive eder (Zamaraev vd., 2017)(Şekil 2.11). Buna ilaveten, diğer pro-apoptotik proteinler hücresel intihar mekanizmasına katkıda bulunmak için mitokondriden salınır. Örneğin, Smac/Diablo, X bağlantılı apoptoz inhibitör protein (XIAP), hücresel apoptoz inhibitör protein (cIAP1) ve cIAP2 gibi apoptoz inhibitör proteinlerin aktivasyonuna karşı koyar. Smac/Diablo nun XIAP' a bağlanması kaspaz -9, -3 ve -7 nin engelleyici etkileşimini ortadan kaldırır. cIAP1 ve cIAP2 XIAP ın tersine direkt olarak kaspazları engelleyemezler. Özellikle, TNFR1'in yeniden görev almasına yol açan TRAF2 ile etkileşirler. O noktada, TNF'nin uyardığı RIP1'in ubikitinizasyonuna aracılık eden NFκB aktivasyonuna katkıda bulunur. Antiapoptotik genlerin NFκB aracılı ekspresyonu cIAP1 ve cIAP2'nin antiapoptotik fonksiyonuna neden olabilir (Duprez vd., 2009).

### 2.4.4.Apoptozun ilerletilmesi ve düzenlenmesi

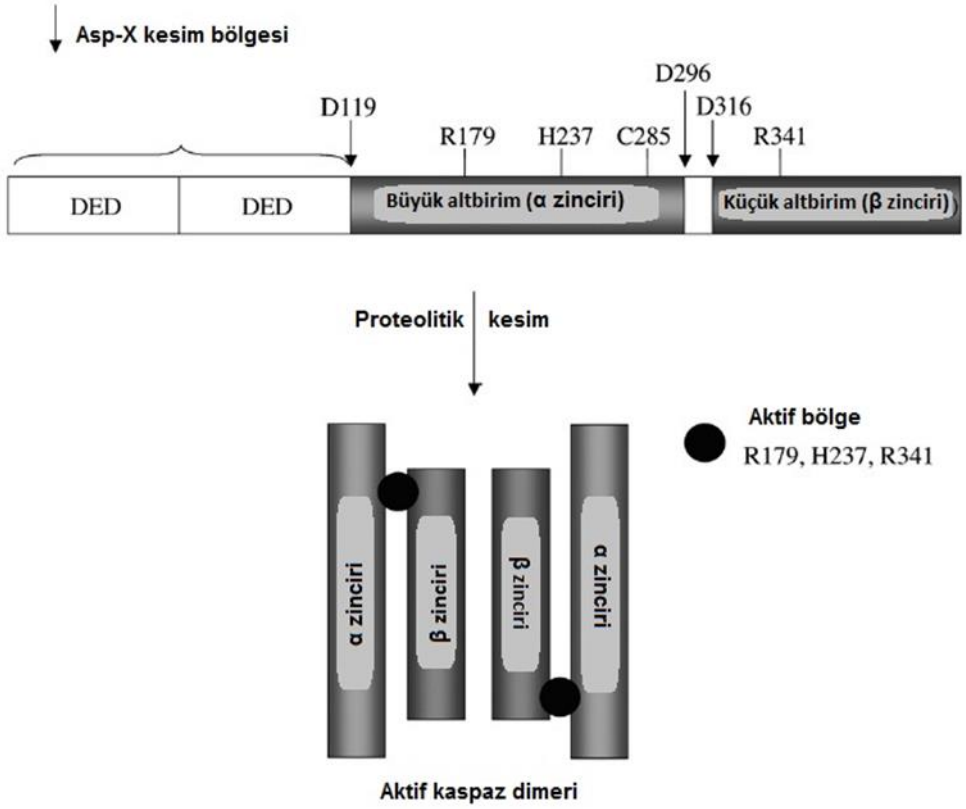
#### *2.4.4.1. Kaspazlar*

Apoptoz ister dış yolak ister iç yolak ile başlatılsın apoptozun ilerletilmesinden kaspazlar sorumludur. Kaspazlar sistein proteaz ailesi üyeleridir. Aktif merkezlerinde sistein amino asidi taşımaları ve hedef proteinlerini aspartik asit birimlerinden kesmeleri sebebiyle 'sistein-bağımlı aspartat-spesifik proteaz (**c**ysteine-dependent **asp**artate-specific prote**ases=Caspase**) olarak isimlendirilmişlerdir. Kaspazlar proteazlar arasında en çok özgüllük gösteren enzimlerdir. Kesinlikle aspartik asitten sonra substratlarını kırmaktadırlar. Aspartik asidin önündeki 4 aminoasit (tetrapeptit) komposizyonu ve bunların üç boyutlu yapısı özgüllüklerinde önemli etkiye sahiptir. Bugüne kadar, memelilerde 14 farklı kaspaz üyesi tanımlanmıştır (Şekil 2.12, Gewies, 2003).




Şekil 2.12. Kaspaz ailesi üyeleri (Chang ve Yang, 2000)

Tüm kaspazlar amino asit sekansları, yapıları ve substratları yönünden benzerlik göstermektedir. Şekil 2.13'de gösterildiği gibi kaspazlar amino ucu bölgesi (prodomain), büyük alt-birim ve küçük alt-birim olmak üzere üç önemli bölge bulundurmaktadır. Aktif merkez, büyük alt-birimde yer almaktadır. Aktivasyon bu bölgeler arasındaki peptit bağlarının kırılması ve daha sonra büyük ve küçük alt-birimlerin birleşerek heterodimer oluşturması sayesinde gerçekleşir. Bu heterodimerlerin de birleşmesiyle iki aktif merkez içeren bir tetramerik yapı oluşarak aktif kaspaz dimeri meydana gelmektedir (Donepudi ve Grutter, 2002).




Şekil 2.13. Kaspazların aktivasyonu (Donepudi ve Grutter, 2002)

Kaspaz aktivasyonunda başlıca üç mekanizma vardır;

a) Başlatıcı bir kaspaz tarafından proteolitik kesim sonucu aktivasyon

b) Yakın indükleme (induced proximity)

c) Holoenzim oluşumu

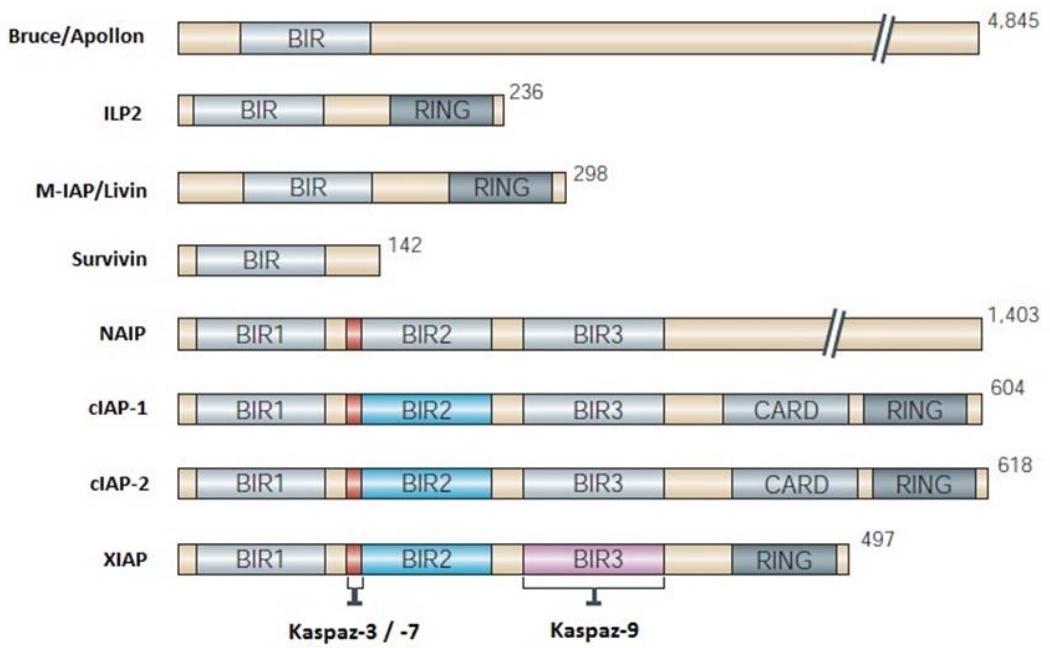
İlerletici kaspazın başlatıcı kaspaz tarafından proteolitik kesimi sonucu aktivasyonu oldukça etkin bir mekanizmadır. Yakın indükleme mekanizmasında ise birçok kaspaz-8 molekülü bir araya gelerek birbirlerini çapraz biçimde aktive ederler. Holoenzim olarak aktivasyonda ise sit-c ve ATP-bağımlı Apaf-1 oligomerizasyonu, prokaspaz-9'un bu komplekse katılmasına olanak vererek apoptozom adı verilen yapıyı oluşturur. Kaspaz-9'un bu yolla aktivasyonu proteolitik olarak değil, kompleksin biçim değiştirmesiyle sağlanır (Donepudi ve Grutter, 2002).

Kaspazlar aktivasyon mekanizmasına ve kaspaz kaskadındaki görevlerine göre başlatıcı kaspazlar ve ilerletici (efektör) kaspazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Başlatıcı kaspazlar; kaspaz -2, -8, -9 ve -10 olmak üzere ilerletici kaspazları aktive eden

proteazlardır. İlerletici kaspazlar olarak bilinen kaspaz -3, -6 ve -7 ise hücre içinde pek çok farklı substratı parçalayarak apoptozun ilerletilmesinde görevlilerdir (Zamaraev vd., 2017). İlerletici kaspazlar, hücre çeşidine özgü olarak hücre içinde sitoplazmik proteinler (aktin, β katenin, intermediate filament protein keratin 18), nükleer proteinler (lamin A, lamin B, NuMA), DNA metabolizması ve tamir proteinleri (PARP, DNA topoizomeraz), protein kinazlar (MAPK, ERK, Akt ), sinyal ileti yolağı proteinleri (fosfoipazlar) ile hücre döngüsü ve çoğalmasında görevli proteinler (p21, p27, pRb) olmak üzere pek çok substratı keserek apoptoza özgü morfolojik ve biyokimyasal değişikliğe sebep olurlar (Chowdhury vd., 2008).

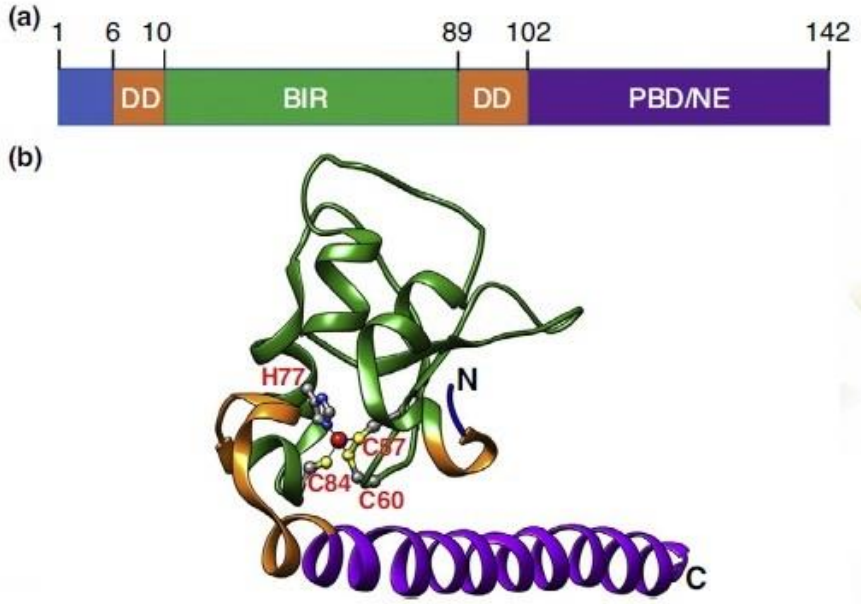
#### *2.4.4.2.Apoptoz İnhibitörleri*

Apoptoz inhibitörleri (IAPs), doğal bağışıklık ve immünite, hücre çoğalması, hücre göçü ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik fonksiyonların düzenlenmesi ile ilgili protein ailesidir. İnsan genomu IAP ailesinin 8 üyesini kodlar. Protein-protein etkileşimi içeren, yaklaşık 70 birimlik 1 ya da 3 çift özel N-terminal baculoviral IAP tekrar (BIR) bölgesi bulundurmasıyla karakterizedir. BIR'ların ana bileşeni, tek çinko iyonunu düzenleyen Cys/His motifi birliğidir. Çoğu IAP bağlanma motifi (IBMs) olarak isimlendirilen korunmuş bir tetrapeptid motifi bağlayan hidrofobik girinti şeklindedir. IBM'ler bazı kaspaz ve IAP antagonistlerinin alt ünitelerinin N uçlarının sonunda bulunurlar. Böylece, hidrofobik BIR girintisi sadece aktif kaspazlara bağlanabilir (Mita vd., 2008, Mohamed vd, 2017)(Şekil 2.14).



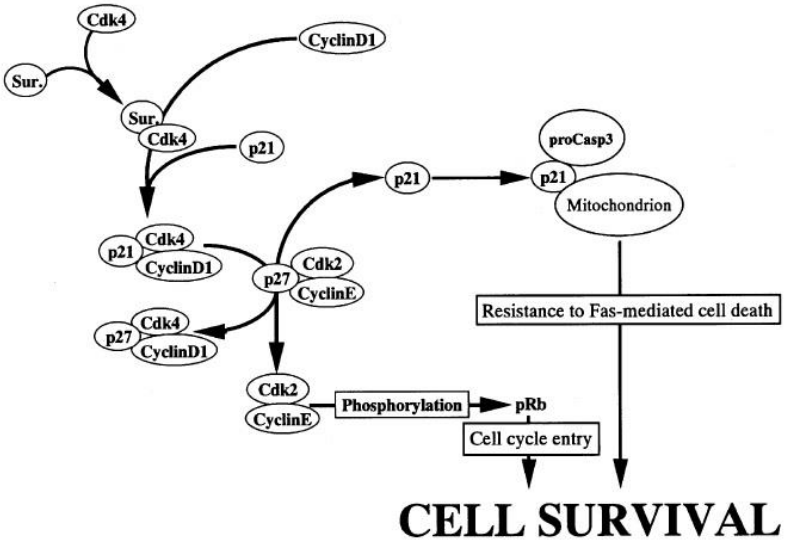

Şekil 2.14. Memeli IAP ailesi üyeleri

*SURVİVİN*, tek BIR bölgesi içeren IAP ailesi üyelerinin en küçüğüdür. İlk kez 1997 yılında Ambrosini G. vd. tarafından keşfedilmiştir. *SURVİVİN* geni, kromozomun 17q25 bölgesinde bulunur. Gen 14,7 kb uzunluğunda ve 16,5 kDa ağırlığında 142 aminoasitlik survivin proteinini kodlar (Şekil 2.15). S *SURVİVİN*'in embriyonik ve fetal gelişim süresince ve çeşitli kanser hücrelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir. Diğer apoptoz inhibitör proteinlerin aksine *SURVİVİN* farklılaşmış normal dokularda eksprese edilmemektedir (Mita vd., 2008)




Şekil 2.15. *SURVİVİN*'in şematik ve atomik yapıları a) *SURVİVİN*'in şematik yapısı. (DD: dimerizasyon bölgesi, BIR: Baculovirüs tekrar bölgesi, PBD: protein bağlanma bölgesi NE: nuklear uç (export)) b) *SURVİVİN*'in atomik yapısı (Perry vd., 2017).

*SURVİVİN*'in ana fonksiyonu hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozun baskılanmasıdır. *SURVİVİN*'in apoptozun baskılanmasındaki rolü; aktif kaspaz – 3, - 7 ve - 9' a bağlanarak onların bozulmasını sağlamasıdır. Ayrıca yapılan çalışmalarda survivinin kaspaz -3 üzerinden *FAS* aracılı hücre ölümünü baskıladığı rapor edilmiştir (Mohamed vd., 2017).

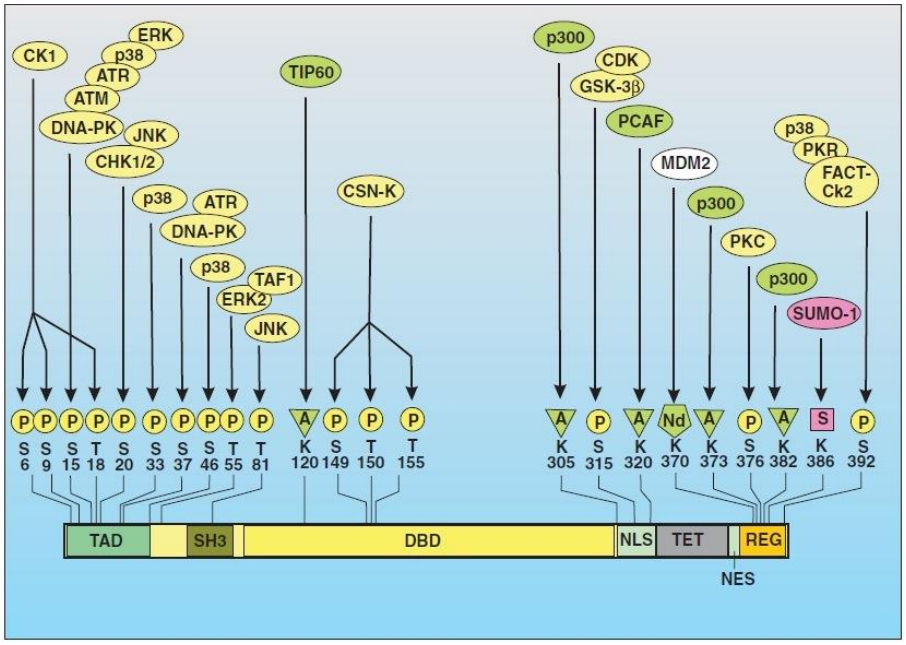



Şekil 2.16. *SURVİVİN*'in *FAS* aracılı apoptotik hücre ölümünü baskılama mekanizması (Suzuki vd., 2000)

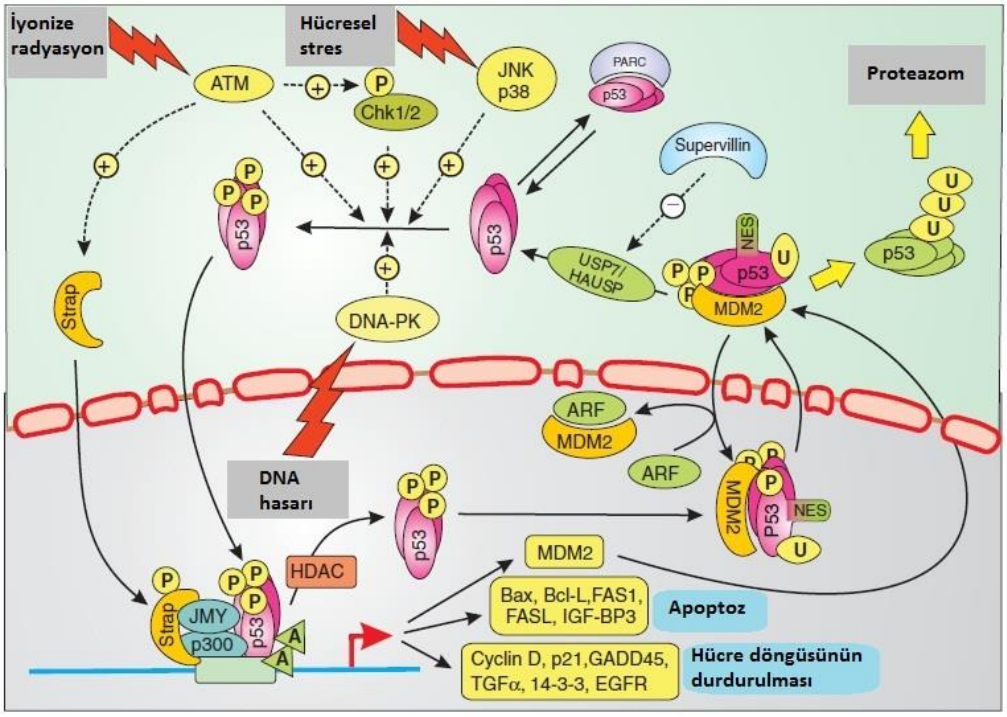
Şekil 2.16'da gösterildiği gibi *SURVİVİN*'in nukleusa geçmesi Fas uyarımı ve hücre döngüsüne bağlıdır. *SURVİVİN* birde hücre döngüsü düzenleyicisi CDK4 ile etkileşir bu da CDK2/siklin E aktivasyonuna ve Rb fosforilasyonuna yol açar. Survivin/CDK4 komplesinin şekillenmesinin sonucu olarak p21 CDK4 ile kompleksinden salınır ve Fas aracılı hücre ölümünü baskılamak için mitokondriyal prokaspaz-3 ile etkileşir. Böylece; *SURVİVİN FAS* aracılı hücre ölümünü kaspaz 3 üzerinden baskılamış olur (Suzuki vd., 2000).

### *2.4.4.3.TP53*

*TP53* geni 17. kromozom da bulunur ve 53 kDa moleküler ağırlığa sahip p53 proteinini kodlamaktadır (Şekil 2.17). *TP53*; DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü, genomik kararlılığın sağlanması, kromozom ayrılmasının düzenlenmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücresel olayda rol oynayan tümör baskılayıcı bir gendir (Şekil 2.18). *TP53*, bu işlevlerini ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek ya da diğer proteinler veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşerek gerçekleştirmektedir.




Şekil 2.17. *TP53* geninin yapısı (Berridge, 2014)



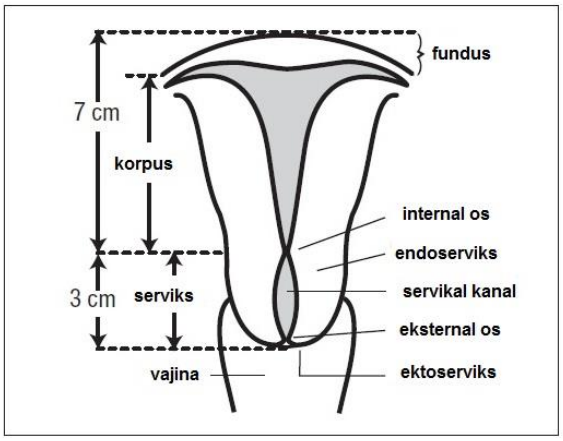

Şekil 2.18. TP53 proteininin fonksiyonları (Berridge, 2014)

TP53 proteini, DNA hasarı ve onkojenik transformasyon sonucu aktive olmaktadır. Kaspaz -3, -7, -8 ve -9 enzimlerini de aktive ederek apoptozu uyarır ve kanser oluşumunu engeller. *İn vivo* ve *in vitro* koşullarda ubikitin-proteazom yolu tarafından yıkıldığı bilinmektedir. Çeşitli genlerin ifade düzeylerini kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan *TP53* hücre döngüsünün normal bir biçimde seyretmesini sağlamaktadır. Eğer hücrede normal olmayan bir durum varsa hücre döngüsü *TP53* tarafından durdurulmaktadır. *TP53* hücresel stres durumunda apoptozu tetiklemektedir. Strese girmeyen, hasara uğramamış hücrelerde TP53 protein konsantrasyonu belirlenemeyecek kadar azdır ve sitoplazmada tutularak çekirdeğe girişi önlenir. Normal gelişim sırasında gerçekleşen apoptozda görev almayan *TP53* tümör baskılayıcı geni çeşitli kanserlerde mutasyona uğramaktadır. Tüm kanserlerin %50'sinden fazlasında *TP53* mutasyonu görülmektedir (Berridge, 2014)

## 2.5. Serviks Kanseri

### 2.5.1. Tanımı ve epidemiyolojisi

Serviks (rahim ağzı), uterusun vajinanın üst kısmı ile birleştiği bölgedir. Serviksin dış yüzeyi çok katlı yassı epitel (skuamöz) hücrelerden oluşmakta olup **ektoserviks** olarak adlandırılır. Ektoserviks çeşitli dış etkenlere karşı dokuyu korumaktadır. Serviksin iç yüzeyi ise **endoserviks** olarak adandırılır ve salgı yapıcı (glanduler) epitel hücreler ile kaplıdır. Endoserviks ve ektoserviksin geçiş kısmında **tarnsformasyon zonu** olarak adlandırılan bir bölge vardır. Bu bölge, **yeni yassı silindirik epitel sınırı** olarak da adlandırılan silindirik epitel ile yassı epitel arası değişime uğramış hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 2.19). Servikal karsinogenezin büyük bir kısmının bu bölgedeki mitototik aktivitesi yüksek ve değişime uğramış bu hücrelerde başladığı bilinmektedir. Servikal kanserlerin yaklaşık % 90'ı skuamöz epitelden köken alır ve bunlar **skuamöz hücre kanserleri** olarak adlandırılırlar. Kalan % 10'luk kısım ise glanduler epitel hücrelerinden ortaya çıkan **adenokarsinomlar**dır (WHO, 2014).




Şekil 2.19. Doğurganlık yaşındaki kadınlarda serviks yapısı ve ölçüleri (WHO, 2014)

Serviks kanseri, dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen dördüncü, tüm kanser türleri arasında ise yedinci sırada yer almaktadır. Dünya sağlık örgütünün 2012 yılında yayınladığı rapora göre; tüm dünyada 528 000 (tüm kanserlerin % 12'si) yeni teşhis koyulmuş ve 266 000 (tüm kanserlerin % 7.5'i) serviks kanseri ile ilişkili ölüm rapor

edilmiştir. Serviks kanseri teşhisleri ve ölümlerinin yaklaşık 10'da 9'u az gelişmiş bölgelerde kaydedilmiştir (IARC, 2012).

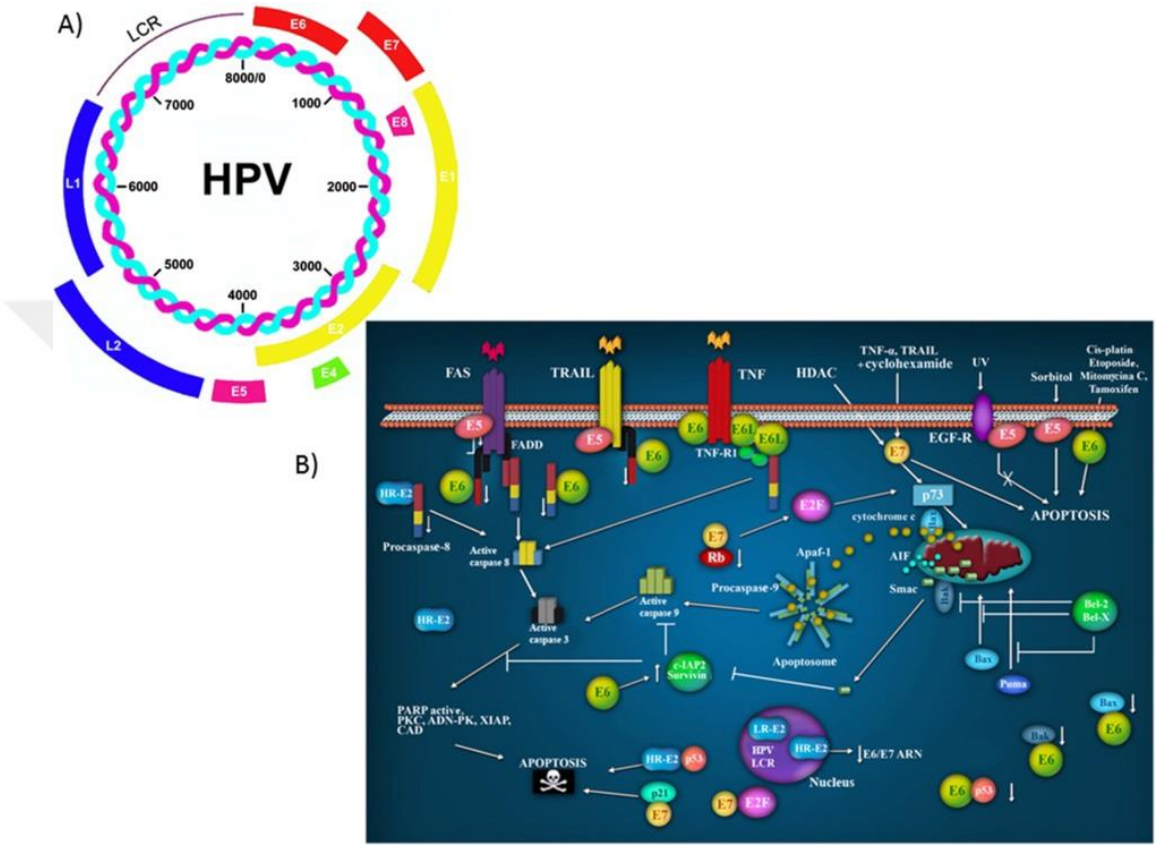
### 2.5.2. Risk faktörleri ve moleküler biyolojisi

Tümör gelişimi çok aşamalı bir süreçtir. Dolayısıyla birçok faktör kanser oluşumuna neden olabilmektedir. Bu etkenlerden birisi de virüslerdir. Virüsler gerek hayvanlarda gerekse insanlarda tümör oluşumuna sebep olabilmektedir. İnsan papilloma virüsü serviks kanserinin gelişmesinde rol oynayan bir virüs olarak tespit edilmiştir (Tummers ve Van Dr Burg, 2015).

İnsan papilloma virüsü (HPV); *Papovaviridae* ailesinden, küçük, zarfsız, 45-50 nm boyutlarında, yaklaşık 8000 bç'lik, halkasal yapılı ve çift zincirli DNA'dan oluşan bir DNA virüsüdür (Jiang ve Yue, 2014). HPV'ler yüksek risk oluşturan (HR-HPV) ve düşük risk oluşturanlar (LR-HPV) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Yüksek risk oluşturan gruptan HPV-16 ve HPV-18 özellikle serviks kanseri ile ilişkilendirilmektedir. Tüm HPV'ler aynı genomik organizasyona sahiptir ve E1, E2, E4, E5, E6, E7 (erken) ile L1 ve L2 (geç) olmak üzere 8 protein kodlarlar (Lagunas-Martinez vd., 2010).

HPV konak genomuna katılırken erken bölge genlerinden E2 geninde delesyon oluşur ve E2 eksprese edilemez. E2'nin yokluğunda E5, E6 ve E7 ekspresyonu artmaktadır. E5 dış apoptozda görevli Fas ve TRAİL gibi hücre ölüm yolaklarını engeller. E7 ise pRb gibi anti-apototik proteinlerin bozulmasını uyarır. E6 bax ve bak gibi pro-apoptotik proteinlerin degredasyonuna yol açarken aynı zamanda da IAP'ların ekspresyonunu uyarır (Fuentes-Gonzales vd., 2013). Bunun yanı sıra E6, p53 proteinlerini bozarak hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozu engelleyerek proliferasyonun kontrolsüz şekilde çoğalmasına sebep olur (Şekil 2.20). Artan proliferasyonla birlikte DNA hasarı birikir ve sonuçta aktive olmuş onkogenler, kromozomal kararsızlık, viral ve hücresel DNA'nın metilasyonu, telomeraz aktivasyonu, hormonal ve immunogenetik faktörler, transforme olmuş hücreleri oluşturur (Lagunas-Martinez vd., 2010). Sonra hücreler enfekte oldukça proliferasyon artar ve yayılma gerçekleşir. Ardından geç bölge genlerinin ekspresyonu başlar. Viral genom çoğalır ve yapısal proteinleri oluşturur.

Böylece oluşan viral partiküller çoğalarak yüzeyden diğer dokuları enfekte etmektedir (Jiang ve Yue, 2014). Serviks kanserinde oluşum süreci 10-20 yıldır; bununla birlikte bazı lezyonların bir kaç yıl içerisinde kanser oluşturduğu da görülmüştür. (Lagunas-Martinez vd., 2010).




Şekil 2.20. HPV proteinlerin katıldığı apoptotik sinyal yolakları. A) HPV genomu, B) HPV proteinlerin apoptotik sinyal yolakları üzerindeki etkileri (Fuentes-Gonzales vd., 2013)

Ayrıca, *Herpes simpleks virus* (özellikle HSV-2) enfeksiyonlarının da *papilloma* viruslar ile sinerjistik rol oynayarak servikal karsinoma oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir. HPV ile enfekte serviks epitelinin malign transformasyonunda bağışıklık sistemi yanıtının da önemli olduğu düşünülmektedir. HIV enfeksiyonu gibi bağışıklık sistemin baskılandığı durumlarda servikal displazi ve invazif kanser riski, bağışıklık sisteminin baskılanma derecesi ile ilişkili olarak arttığı belirlenmiştir. İnsan lökosit antijen (Human Leukocyte Antigen-HLA) genlerindeki polimorfizmlerin de HPV ile ilişkili servikal neoplazi oluşumunda risk faktörü olduğu düşünülmektedir (Chelimo vd., 2013).

Epidemiyolojik çalışmalar göstermektedir ki; serviks kanserinin gelişmesinde HPV ile birlikte bazı çevresel etmenler de rol oynamaktadır. Bunlar; sigara kullanımı, oral gebelik önleyici ilaç kullanımı, cinsel ilişki ve seksüel davranış, sosyoekonomik düzey ve diyet olarak sıralanabilir (Chelimo vd., 201; Louie vd., 2009).

### 2.5.3. Serviks Kanseri Tanı ve Tedavisi

Servikal kanserde, erken dönemde ortaya çıkan semptomlar postkoital kanama, asiklik kanama, kanlı ve kötü kokulu akıntı; geç dönemde ortaya çıkan semptomlar ise bacak ve kasık ağrıları, fistüller (servikovajinal, veziko-vajinal, serviko-rektal, rekto-vajinal), böbrek fonksiyon bozuklukları, alt ekstremitede ödem, anemi ve kilo kaybı olarak sayılabilir. Servikal displazi veya karsinoma *in situ* durumunda iken teşhis edilen kanserlerde tedavi başarısı yüksek olabilmekle birlikte metastaz durumunda tedavi güçleşir. Serviks etrafında bulunan geniş kan ve lenf damarları ağı ve böbreklerden idrar torbasına ilerleyerek rahim ağzına çok yakından geçen idrar yolları, serviks kanseri hücrelerinin rahim ağzında yerleştikten sonra derinlere doğru ilerleyerek komşu doku ve organlara yayılmasını kolaylaştırır. İlerlemiş olgularda yayılan kanser hücreleri, böbrek ve idrar kanallarında tıkanmalar meydana getirerek, böbreklerde anormal genişlemeler (hidronefroz)'e, idrar kanallarında şişme ve genişlemeler (hidroureter)'e neden olur (Aydıner vd., 2016; WHO, 2014; Andrea vd., 2012).

Servikal kanserin tedavisinde; kanserin derecesi ve evresi önemli rol oynar. Tedavi lokal ya da sistemiktir. Lokal tedaviler; bir bölgedeki kanser hücrelerinin cerrahi yöntemlerle ya da radyasyon ile temizlenmesidir. Sistemik tedavi ise; vücudun diğer kısımlarına yayılmış olan anormal hücreleri kontrol altına almak için uygulanır. Hastalığın iyileşme oranı; kanserin tipi ve yerleşimi, evresi, metastaz hızı, hastanın yaşı ve genel durumu ve tedaviye yanıt verip vermediğiyle ilgilidir (WHO, 2014).

Günümüzde servikal kanser tedavisinde, cerrahi, radyasyon tedavisi ve kemoterapi kullanılmaktadır. Kullanılan tedavi yöntemlerinin pek çok dezavantajı vardır. Cerrahi uygulamaların ardından kanamalar ve kramplar gözlenmektedir. Uterusun kaybedildiği durumlarda ise hastalarda psikolojik travmalar ortaya çıkabilmektedir. Radyasyon tedavisi

ise yoğun bir yorgunluk hissi oluşturmakla beraber saç dökülmesi, ciltte kızarma, kuruma, kaşınma ve gevşemeye neden olur. Şiddetli ve uzun süreli diare ile idrara çıkma sırasında acı hissedilmesi, radyasyon tedavisinin diğer yan etkileridir. Kemoterapi ise kan hücreleri, kıl kökü ve sindirim sistemi hücreleri gibi sıklıkla bölünen hücreleri de etkilediğinden olumsuz pek çok yan etki oluşturmaktadır. Ayrıca kemoterapiden etkilenen kan hücreleri, hastanın enfeksiyonlara yatkınlaşmasına, halsizlik hissetmesine ve yaralarında kanama süresinin uzamasına neden olurken, saç kökü hücrelerinin hasar görmesiyle saçların kaybedilmesi de psikolojik problemler yaratabilir. Sindirim sistemi hücrelerinin kemoterapötiklerce etkilenmesi sonucunda ise kusma, mide bulantısı ve iştahsızlık gibi yan etkiler görülmektedir (WHO, 2014 Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2010).

Günümüzde serviks kanserinin tedavisinde en yaygın kullanılan ilaç sisplatindir. Sisplatin, DNA-platin birleşimi sebebiyle DNA'ya hasar vererek sitotoksik etki göstermektedir (Pectasides vd., 2008). Bu sebeple kanserli hücrelerin yanı sıra normal hücreler üzeirnde de sitotoksik etki göstermekte ve buna bağlı olarak hastalarda pek çok yan etki görülmektedir. Ayrıca hücrelerde sisplatine karşı direnç gelişmesi tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bunun yanı sıra sisplatin ile 5-FU adjuvan terapi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat yapılan araştırmalarda sisplatin ve 5-FU kombine verildiğinde bile hastaların 5 yıllık sağ kalımlarının ancak % 9 olduğu bildirilmiştir. Dahası, bu kombine tedavi yaklaşımının hastalarda lökopeni, ototoksisite ve nörotoksisite gibi ana problemlere sebep olduğu belirtilmiştir (Kaern vd., 1999). Bu sebeple serviks kanserinin tedavisi için kanserli hücreler üzerinde düşük dozlarda güçlü sitotoksik etki gösteren fakat normal hücreler üzerindeki sitotoksisitesi az olan yeni maddelerin arayışı sürmektedir.

## 2.6. Deguelin

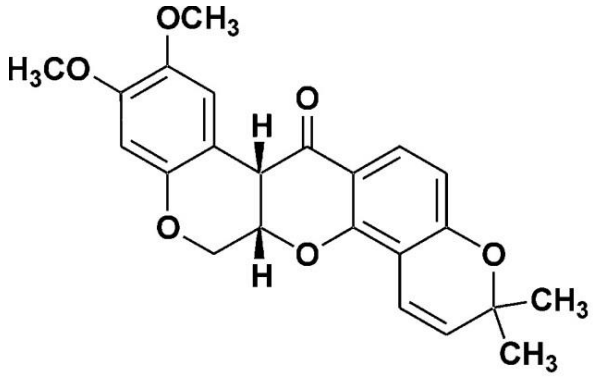
Kanser, tüm teknolojik gelişmelere ve araştırmalara rağmen hala tüm dünyada en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Kanseri önleme ve tedavi etme amacıyla pek çok bilimsel çalışma yapılmaktadır. Bu konuda kimyasal sentezlenen maddelerin dışında son zamanlarda bitkiler tarafından üretilen doğal maddelerin farklı kanserli hücrelerin çoğalması üzerindeki etkileri oldukça dikkat çekmiştir (Nobili vd., 2009). Deguelin de, *Mundulea sericea*'nın da içinde bulunduğu *Leguminosae* familyasına ait çeşitli bitkilerden

izole edilebilen, rotenoid kökenli bir sekonder metabolit olup (Şekil 2.20), *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda düşük dozlarda değişik kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek kemopreventif ve kemoterapötik etki gösterdiği belirlenmiştir (Murillo vd., 2002).

Kemopreventif ajanlar kanserin erken evrelerinde ve ilerleme aşamalarında etki ederken, kemoterapötik ajanlar karsinogenezin geç ve agresif aşamalarında etki etmektedir. Dolayısıyla kemopreventif ajanların kemoterapötiklere göre daha az toksik olması, daha güvenli alternatifler olabileceğini düşündürmektedir. Deguelin ile yapılan çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda farklı kanser hücrelerinde kemopreventif özelliğinin olduğu da belirlenmiştir. Dahası, çoğu kemopreventif ajanların potansiyel adjuvan kemoterapötik ajan olarak düşünülebileceği de bildirilmiştir (Garewal, 1991; Şekil 2.21).

Yapılan *in vivo* çalışmalarda A/J farelerine vücut ağırlığına göre 10 gün boyunca 5,0 ya da 10,0 mg/kg dozlarında verilen deguelinin akciğer kanser oluşumunu engellediği belirlenmiştir (Yan vd., 2005). Bunun dışında 2 ve 4 mg/kg deguelinin Sprague-Dawley farelerinde farmokokinetik ve kemopreventif özellikleri (Udeani vd., 1997; 2001) belirlenmiştir.

Deguelin ile ilgili yapılan çeşitli *in vitro* çalışmalarda ise; U937 lösemi (Liu vd., 2005), Jurkat lenfoma hücrelerinde (Shu vd., 2008; Chen vd 2009), insan kolon kanser (HT29) hücrelerinde (Murillo vd., 2002), karaciğer kanseri (HepG2) hücrelerinde (Lee vd., 2008), gastrik kanser (MKN-28, SNU-484 ve AGS) hücrelerinde (Lee vd., 2010), insan meme kanseri (SKBR-3 ve MCF-7) hücrelerinde, insan premaliganant ve malignant bronşiyal epitel (HBE) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanser (NSCLC) hücrelerinde (Jin vd., 2007) düşük dozlarda çoğalmayı baskılayıcı etkileri rapor edilmiştir.




Şekil 2.21. Deguelin'in kimyasal formülü (Hall ve Lotan, 2004)

Ayrıca, deguelinin pek çok kanserli hücre dizisi üzerinde in vitro yapılan araştırmalarda Wnt sinyal yolağı (Murillo vd., 2002), Bcl-2 ve survivin (Chen vd., 2009), p21, p53 ve survivin ile Akt ve NFκB sinyal ileti yolakları (Eva vd., 2007), cyclooxygenase-2 (Lee vd., 2004), ısı şok protein (hsp90) (Oh vd., 2007), apoptoz inhibitörleri (Peng vd., 2010) ve apoptozun başlatılması ve ilerletilmesinde görevli pek çok farklı yolağın düzenlenmesi yoluyla hücre çoğalmasını durdurduğu ya da apoptotik hücre ölümünü uyardığı belirlenmiştir.

Buna ilaveten kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötikler ile birlikte kombine deguelin uygulamalarının kemoterapötiklerin sitotoksik etkilerini arttırdığı da farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (Peng vd., 2007). Aynı zamanda yapılan farklı bir çalışmada ise deguelinin meme kanseri hücrelerinde radyoterapi uygulamalarında radyaterapiye duyarlılığı arttırdığı da rapor edilmiştir (Yiv vd., 2008).

Deguelin ile ilgi yapılan pek çok *in vivo* ve *in vitro* araştırma gösteriyor ki; deguelin değişik kanser hücrelerinde farklı yolaklar üzerinden seçici olarak çoğalmayı baskılayarak, hücre döngüsünü durdurarak, apoptozu uyararak, anjiyogenezi engelleyerek, sağkalım sinyal yolaklarını engelleyerek ve kanser oluşumunu önleyerek kemopreventif ve kemoterapötik özellikler göstermesi sebebiyle umut vaad eden bir maddedir. Biz de araştırmamızda deguelinin insan serviks kanseri hücre dizisi (HeLa) üzerindeki çoğalmayı baskılayıcı ve apoptozu uyarıcı etkilerini ve bu etkilerin olası mekanizmasını araştırmayı amaçlıyoruz.

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Deneysel çalışmamızın hücre kültürü, hücre çoğalmasının baskılanması ve hücre ölümünü belirleme aşamaları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Hücresel Araştırma Laboratuvarı'nda, gen ekspresyonlarının belirlenmesi aşaması ise İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü; Genetik Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

## 3.1.Hücre Kültürü

### 3.1.1. Hücrelerin çoğaltılması

Epitelyal kökenli insan servikal karsinoma (HeLa) hücreleri kültüre alınan ilk ölümsüz insan hücre dizisidir. 1951 yılında, 31 yaşındaki Henrietta Lacks isimli bir hastadan, rahim kanseri şüphesiyle, John Hopkins Hastanesi'nde Doktor George Gey tarafından alınan biyopsi örneğinin hücre kültürü laboratuvarında kültüre edilmesiyle çoğaltılmıştır (Caverly 2012). O günden itibaren de kültür ortamında üretilmeye devam edilmektedir. Halen biyoloji, tıp ve ilaç geliştirilmesi gibi in vitro birçok alanda model hücre olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda daha önceden Amerikan Kültür Koleksiyon' undan satın alınan HeLa hücre dizisi kullanılmıştır. Dondurulan HeLa hücreleri, oda ısısında çözüldükten sonra % 10'luk fetal dana serumu (FBS, Sigma) ve % 1'lik penisilin-streptomisin antibiyotik çözeltisi (Sigma) içeren Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle Medium (DMEM, Sigma) besi ortamı içinde 5 dakika, +4 °C ve 1200 devir/dakikada santrifüj (Eppendorf) edilmiştir. Santrifüj sonunda tüpün tabanına toplanan hücreler, 5 mL taze besi ortamı içeren 25 $cm^2$' lik kültür kabına alınarak 37 °C'de, % 5 $CO_2$ ve % 95 nem içeren karbondioksitli inkübatörde (Thermo) kültüre edilmiştir. Belirli aralıklarla hücrelerin çoğalma durumları takip edilerek yaklaşık % 80-90 yoğunluğa ulaştıklarında, 75 $cm^2$'lik kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücreler haftada bir pasajlanmış ve besi ortamı iki günde bir

değiştirilerek kültürün devamlılığı sağlanmıştır. Hücrelerin çoğalmaları, canlılıkları ve morfolojik yapıları düzenli bir şekilde takip edilmiştir

### 3.1.2. Hücrelerin deneye alınması

Deneye alınacak hücrelerin öncelikle ters ışık mikroskobunda (Nikon, TS100) yoğunlukları kontrol edilmiştir. Hücreler yaklaşık olarak % 80-90 yoğunluğa ulaştıklarında deneye alınmıştır. İlk olarak kültür kabındaki tüm besi ortamı pipet yardımı ile çekilerek uzaklaştırılmıştır. Ardından kültür kabına 3 mL % 0,25'lik tripsin-EDTA (Sigma) solüsyonu koyularak inkübatörde 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda ters ışık mikroskobunda hücrelerin durumu kontrol edilmiş ve tüm hücrelerin kültür kabının tabanından ayrıldığı gözlemlendikten sonra tripsinin hücrelere zarar vermemesi için aktivitesini sonlandırmak amacıyla içerisinde 9 mL besi ortamı bulunan santrifüj tüpüne alınarak 5 dakika, +4 °C ve 1200 devir/dakikada santrifüj yapılarak hücrelerin tüpün dibinde toplanması sağlanmıştır. Üstteki sıvı, altta 1 mL bırakılarak pipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve birkaç pipetleme işlemi ile dipteki hücrelerin kalan sıvı içinde homojen hale gelmesi sağlanmıştır.

### 3.1.3. Hücrelerin sayımı

Çalışmada kullanılan yöntemlere göre deneye alınacak hücre sayısı farklıdır. Bu sebeple hücrelerin deneye alınmadan önce mutlaka sayılması gerekir. Bu amaçla kullanılan en yaygın yöntem tripan mavisi ile hücrelerin boyanması ve sayılmasıdır. Tripan mavisi yöntemi, zar geçirgenliği kaybolan ölü hücrelerin boyayı içlerine alarak mavi renkte görünmesi ve bu hücrelerin sayılarak total ve canlı hücre sayısının hesaplanması esasına dayanmaktadır (Freshney, 2000). Santrifüj tüpündeki 1 mL hücre süspansiyonundan sayım için 0,2 mL alınarak üzerine 0,3 mL Hanks'ın dengelenmiş tuz solüsyonu (HBSS, Sigma) ve 0,5 mL tripan mavisi (Sigma) koyulduktan sonra 5 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Süre sonunda 10 µL örnek hücre sayım cihazında (Cedex XS, Innovatis) sayılmıştır.

### 3.1.4. Hücrelerin kültür kaplarına ekilmesi

Çalışmamızda, deguelin dozlarının hücre çoğalması üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi için 96 kuyucuklu kültür kaplarına 100 µL besi ortamı içerisinde $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Kültür kapları inkübatöre kaldırıldıktan sonra hücrelerin tabana tutunması için 24 saat beklenmiştir.

### 3.1.5. İlaç dozlarının hazırlanması ve uygulanması

Toz halde satın alınan deguelin (Cayman), dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma) içinde çözülerek 50 mM ana stok çözeltisi hazırlanmış ve -20 °C'de saklanmıştır. Literatür taraması sonucunda 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM deguelin dozlarının uygulanmasına karar verilmiştir. Deguelin dozları, ana stoğun besi ortamı ile seyreltilmesiyle her deney öncesinde taze bir şekilde hazırlanarak uygulanmıştır. Ayrıca deguelin dozları uygulanmayan sadece besi ortamı içeren gruplar ise negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışmada denenen en yüksek doz olan 300 µM deguelin dozu içinde bulunan DMSO'nun etkisini belirlemek amacıyla birde çözücü kontrol grubu hazırlanmıştır.

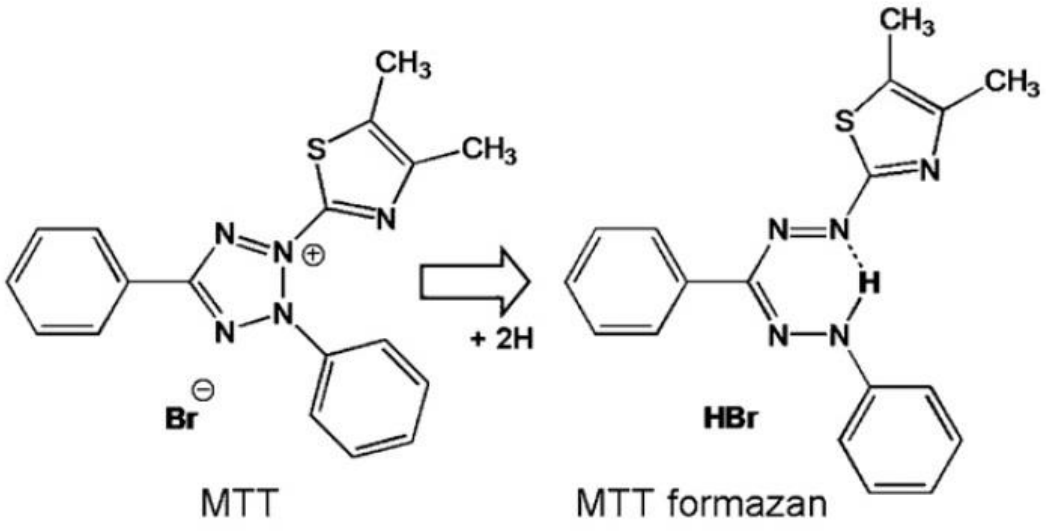
Çalışmamızda deguelinin etkisini kıyaslayabilmek için günümüzde serviks kanserinin tedavisinde geleneksel kemoterapötik ajan olarak kullanılan sisplatin (Sigma) (1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM) ve 5 florourasil (5-FU, Sigma) (1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM) dozları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontroller DMSO içerisinde çözülerek 50mM anastok hazırlanmış ve deneyde uygulanacak olan dozlar her deney öncesinde taze olarak uygun seyreltmelerle hazırlanmıştır.

Hücreler 100 µL içerisinde hazırlanan deguelin ve pozitif kontrol dozları ile 24 ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir.

### 3.2. Mitokondriyal aktiviteye dayalı hücre çoğalmasının belirlenmesi

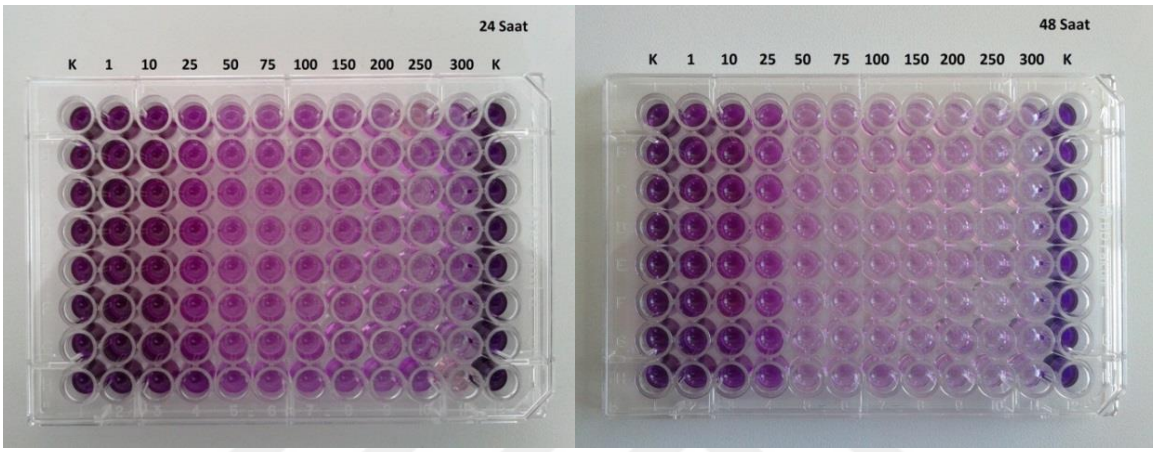
Deguelinin, hücre çoğalması üzerindeki etkilerini belirlemek için kolorimetrik ve kantitatif bir metot olan ve ilk kez Mossmann tarafından tanımlanan 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi kullanılmıştır (Mossmann, 1983). Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT hücre içerisine alındığında, hücre mitokondrisinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi yardımıyla formazan tuzlarına dönüştürülür (Şekil 3.1). Suda çözünemeyen mavi-mor renkteki formazan zardan geçemediği için hücre içinde toplanır. Uygun organik çözücüler (DMSO, izopropanol vb.) kullanılarak bu formazan tuzları çözünebilir ve oluşan mor renkli boya konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Berridge vd., 2005). Elde edilen absorbans canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilebilir. Çünkü hücrelerin MTT indirgeme özelliği mitokondrinin sağlamlığı ve metabolik aktivitesi ile doğrudan bağlantılıdır.

MTT yöntemi; hızlı, kolay, düşük maliyetli, hassas, güvenilir ve çok sayıda örnek ile çalışabilme imkânı sağladığı için hücre canlılığı, çoğalması ve sitotoksisite çalışmalarında çoğunlukla tercih edilen bir yöntemdir (Vellonen, 2004).




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

Deguelin, sisplatin ve 5-FU'nun farklı konsantrasyonlarının ilave edildiği kültür kapları inkübasyon süreleri sonunda, her bir kuyucuğa 20 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL, Sigma) ilave edilerek 4 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kültür kaplarının içerikleri boşaltılmış ve formazan tuzlarının çözünmesi için 100 µL DMSO koyularak, 5 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir (Şekil 3.2). Ardından 550 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında (BioTek) ölçüm yapılmıştır.




Şekil 3.2. HeLa hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca uygulanan deguelin dozlarının spektrofotometre cihazında okunmadan önceki mor renkli formazan tuzlarının görüntüsü

Canlı hücrelerdeki aktif mitokondrilerde oluşan formazan ürünü canlı hücre sayısı ile doğrudan ilişkili olduğu için, ilaç uygulanmayan kuyucuklardaki negatif kontrol hücrelerinin optik yoğunluğuna göre ilaç uygulanan kuyucuklardaki hücrelerin canlı hücre yüzdeleri hesaplanmıştır. Bu hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Cao, 2010).

$$\frac{\text{İlaç uygulanan her bir kuyucuktaki absorbans değeri x 100}}{\text{Negatif kontrol kuyucuğundaki absorbans değeri}}$$

### 3.3. Hücre morfolojisi üzerindeki etkilerin belirlenmesi

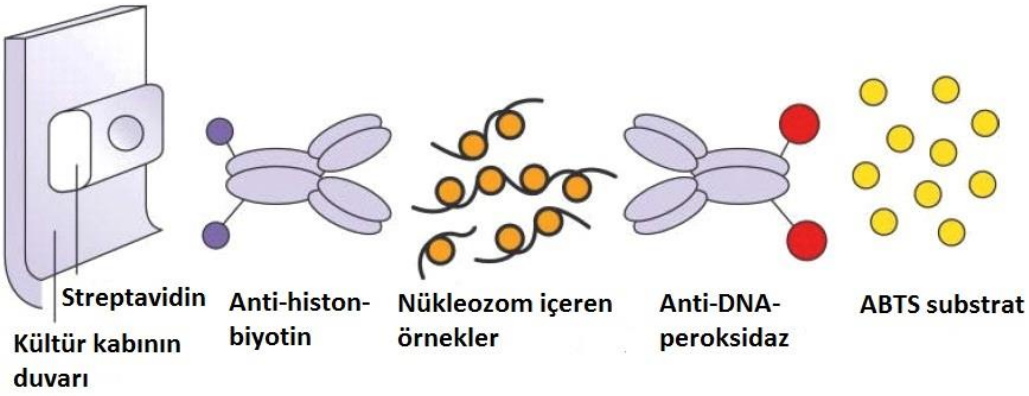
Canlıları oluşturan hücrelerin şekilleri köken aldıkları dokuya, bulundukları bölgeye ve görevlerine göre özelleşmiştir. Hücrenin şeklini belirleyen ve koruyan yapı hücre içi iskelet elemanlarıdır (Thery ve Bornens, 2006). Bölünme süreci veya hücre içi ya da dışından gelen bir takım uyarılar sebebiyle hücre morfolojisinde değişiklikler gerçekleşebilir. Bunlar normal hücre şeklinin değişmesi veya hücrenin boyut olarak küçülmesi şeklinde olabilir (Cadart vd., 2014). Tüm bu değişimler mikroskobik inceleme ile gözlemlenebilmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda uygulanan farklı maddelerin de deneye alınan hücrelerin morfolojisinde bir takım değişikliklere sebep olduğu belirlenmiştir (Paluch ve Heisenberg, 2009; Elliot ve Ravichandran, 2016).

Çalışmamızda, uygulanan deguelin dozlarının HeLa hücre morfolojisi üzerindeki değişiklikleri incelemek amacıyla 96 kuyucuklu kültür kaplarına 100 µL besi ortamı içerisinde $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmış ve hücrelerin tabana tutunması için 24 saat beklenmiştir. Deguelin dozlarının, hücre morfolojisi üzerindeki 24 ve 48 saatlik etkileri, ters ışık mikroskobunda incelenerek morfolojik değişiklikler Kameram 21 programı aracılığıyla görüntülenmiştir.

### 3.4. Hücre ölümünün belirlenmesi

Deguelinin, hücre çoğalması ve morfolojik etkileri doza ve zamana bağlı olarak değerlendirildikten sonra, belirlenen etkinin apoptotik hücre ölümü ile gerçekleşip gerçekleşmediğini incelemek amacıyla Hücre Ölümü Belirleme ELISA kiti (Roche) kullanılmıştır. Bu kit, hücre lizatlarının sitoplazmik bölümlerindeki tek- ve/veya çoklu-nükleozomların spesifik olarak belirlenmesi prensibine dayanır. Kitin içinde bulunan streptavidin kaplı kuyucuklara hücre lizatı, anti-histon-biyotin ve anti-DNA-peroksidaz koyularak inkübe edilir. Bu inkübasyon süresinde anti-histon antikoru nükleozomlardaki histon elemanlarına bağlanır ve biyotin aracılığıyla da streptavidin kaplı kuyucuğa tutunur. Aynı zamanda anti-DNA-peroksidaz antikoru ise nükleozomlardaki DNA ile reaksiyona girer. İmmüno-komplekse tutunmuş peroksidaz sayesinde nükleozomların miktarı

kantitatif olarak belirlenir. Peroksidaz ise ABTS substratı sayesinde spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Şekil 3.3).



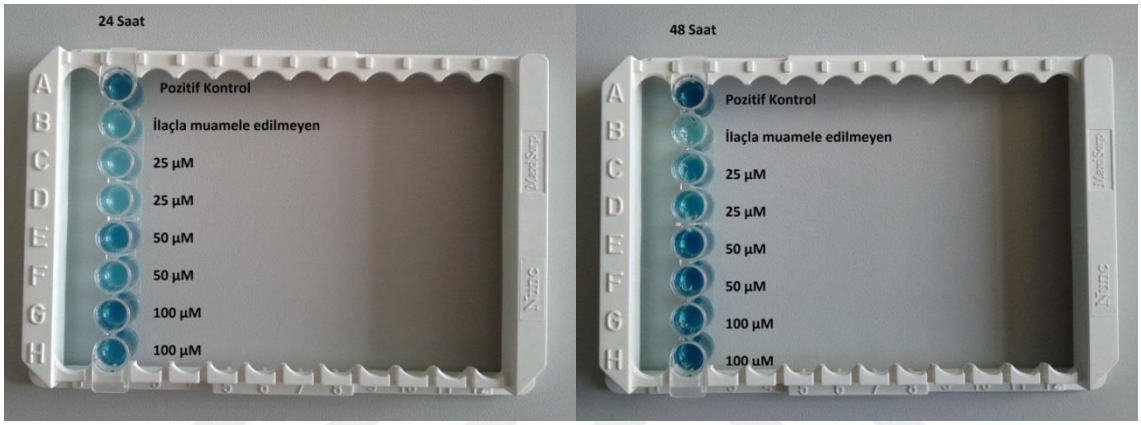

Şekil 3.3. Hücre ölümü belirleme kitinin çalışma prensibi

Çalışmamızda, hücre ölümünü belirleme yöntemi için 96 kuyucuklu kültür kaplarına 100 µL besi ortamı içerisinde $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Kültür kapları inkübatöre kaldırıldıktan sonra hücrelerin tabana tutunması için 24 saat beklenmiştir. Deguelinin, MTT yönteminden elde edilen sonuçları doğrultusunda hücre ölümünün belirlenmesi için 25, 50 ve 100 µM dozları seçilmiştir. Belirlenen deguelin dozlarının HeLa hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulamasının ardından hücre ölümü belirleme kiti üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır.

Kültür kapları 10 dakika 200 g'de santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant atıldıktan sonra her bir kuyuya apoptotik hücre ölümünü belirlemek için 200 µL liziz tamponu ilave edilerek karanlık ortamda 30 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda 96 kuyucuklu kültür kapları tekrar 200 g'de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir. Seçilen kuyulardaki içerik alınarak (20 µL) streptavidin kaplı kuyucuklara konularak üzerine anti-histon-biyotin ve anti-DNA-peroksidaz antikorları içeren reaktifler eklenmiştir. Bu kültür kapları oda sıcaklığında 300 devir/dakika çalkalanarak 2 saat bekletilmiştir. Bu süreçte anti-histon-biyotin antikoru histonlara ve streptavidin kaplı kuyucuklara tutunurken, anti-DNA-peroksidaz ise nükleozomlar arasındaki DNA' ya tutunmuştur. Ardından ortamda kalan bileşenleri uzaklaştırmak için 3 defa yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından 100 µL ABTS ilave edilmiş, 10-20 dk bekledikten sonra ABTS Stop solüsyonu eklenmiştir.

Peroksidazlar, ABTS substratı sayesinde 405-490 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür (Şekil 3.4). İmmünokomplekslere tutunmuş olan peroksidazların ölçülmesiyle nükleozom miktarı kantitatif olarak belirlenmiştir. Hücrelerdeki DNA parçalanma miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Kör; 20 µL inkübasyon tamponu + 80 µL antikor içeren reaktif tamponundan oluşmaktadır (Catalano vd., 2004).

Zenginleştirme (Enrichment) Faktörü: (Doz-Kör)/(Kontrol-Kör)

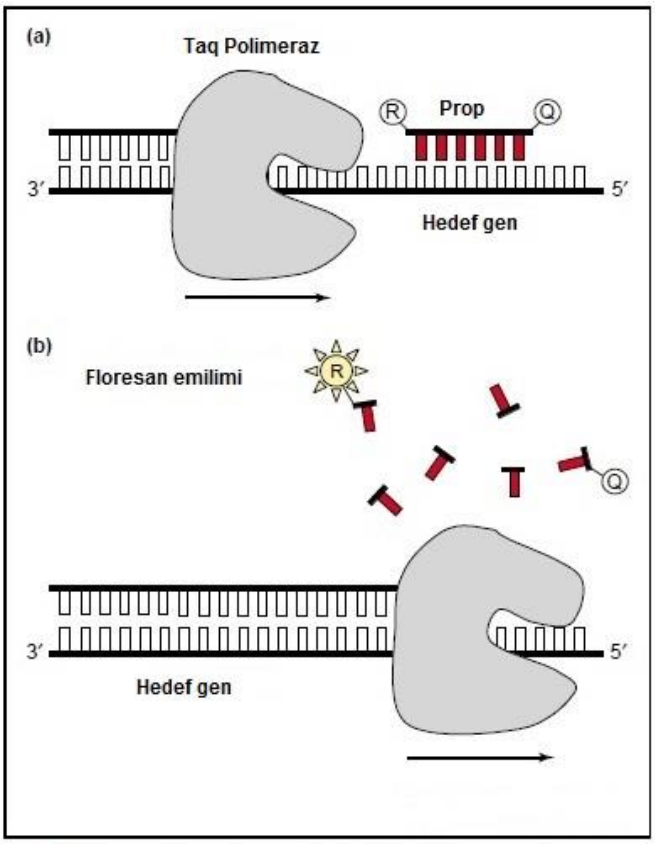



Şekil 3.4. HeLa hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca uygulanan deguelin dozlarının spektrofotometre cihazında okunmadan önceki görüntüsü

### 3.5. Gen anlatım düzeylerinin belirlenmesi

Deguelinin, apoptotik gen anlatım düzeylerine etkisini belirlemek amacıyla gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA' nın istenilen bir parçasının primer denilen 15-20 nükleotidlik bir oligonükleotit dizisi kullanılarak sıcaklığa dayanıklı polimeraz enzimi yardımı ile *in vitro* olarak çoğaltılmasıdır (Broeders vd., 2014). Moleküler çalışmalarda yaygın olarak tercih edilen bir yöntem olması sebebiyle teknolojik gelişmeler bu yöntemin hızla gelişmesine ve farklı türlerinin kullanıma sunulmasına yol açmıştır. Son dönemlerde pek çok araştırmacı tarafından tercih edilen türü gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu sistemleridir. Bu sistem, her bir döngüde yeterli miktarda ürünün verdiği floresan ışığa bağlı olarak reaksiyonu ve oluşan ürünü eş zamanlı olarak sonuna kadar takip etme imkânı sağlamaktadır (Şekil 3.5). Geniş bir uygulama alanı, daha az kontaminasyon riski, özgünlük, $10^7$ kat daha fazla hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve daha az zamanda sonuç

alınabilme gibi avantajları sebebiyle pek çok laboratuvarda güvenle kullanılmaktadır. Hücrelerde rölatif gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Broeders vd., 2014; Mocellin vd., 2003).




Şekil 3.5. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu çalışma prensibi (Mocellin vd., 2003)

Gen anlatım düzeylerinin belirlenmesi için ise, 24 kuyucuklu kültür kaplarına 500 µL besi ortamı içerisinde $1x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Kültür kapları inkübatöre kaldırıldıktan sonra hücrelerin tabana tutunması için 24 saat beklenmiştir. Deguelinin, (*TP53, SURVIVIN, FAS, KASPAZ 3*) gen anlatım düzeyleri üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi için 25 ve 100 µM dozları seçilerek 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır.

### 3.5.1. RNA izolasyonu

Hücrelerden total RNA izolasyonu, RNA izolasyon kiti (Ambion) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. Kitin içinden çıkan liziz tamponuna 1 mL' ye 10 µL 2-merkaptoetanol eklenmiş ve her gruba hücre miktarına göre 300 µL bu liziz tamponundan eklendikten sonra pipet ile karıştırılıp tüplerine aktarılmıştır. Hücre lizatına aynı miktarda % 70' lik etanol eklenmiş ve vorteks üzerinde çalkalanmıştır. İçerik, filtreli tüplere aktarılmış ve oda ısısında 15 saniye 12,000 g' de santrifüj (Eppendorf) yapılmıştır. Ardından yıkama tamponu 1 ve yıkama tamponu 2 ile 3 defa yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra sadece filtre 12,000 g' de 1-2 dakika santrifüj yapılmış ve filtre yeni bir tüpe yerleştirilmiştir. Sonra filtreye 50 µL RNaz içermeyen su konulmuş ve oda ısısında 1 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 2 dakika 12,000 g' den yüksek devirde santrifüj yapılmıştır. Bu esnada filtrede bulunan RNA su ile birlikte tüpte toplanmıştır. Elde edilen RNA' ların miktar ve kalitelerinin ölçümü Nanodrop cihazı (Thermo Nanodrop 1000) ile yapılmıştır. Her örnek 10 µL' de 1 µg RNA olacak şekilde sulandırılmıştır. RNA örnekleri -80 °C' de depolanmıştır.

### 3.5.2. cDNA sentezi

Çalışmamızda Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) ters transkriptaz enzimi kullanılarak total RNA' lardan mRNA moleküllerinin DNA komplamenterleri (cDNA) sentezlenmiştir. Her örneğe 1 µL random primer eklenerek 70 °C' de 10 dakika bekletilmiştir. Bu esnada cDNA sentezi için gerekli karışım hazırlanmıştır.

**cDNA reaksiyon karışımı:**

| **Reaksiyon karışımı** | **Konsantrasyon (µL)** | **Nihai miktar** |
|---|---|---|
| M-MLV tampon | 5 X | 4 µL |
| 25 mM dNTP karışımı | 10 mM | 2 µL |
| 0,1 mM Dithiothreitol (DTT) | 0,1 mM | 1 µL |
| Ters transkriptaz | 200 U/µL | 1 µL |
| RNaz inhibitör | 20 U/µL | 1 µL |
| $dH_2O$ | | |

Bu karışım ilk hazırlanan örnek karışımına eklendikten sonra 25 °C' de 10 dakika, 42 °C' de 60 dakika ve 70 °C' de 10 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda elde edilen cDNA molekülleri polimeraz zincir reaksiyonu aşamasında kalıp olarak kullanılmıştır. cDNA örnekleri -20 °C' de depolanmıştır.

### 3.5.3. Polimeraz zincir reaksiyonu

cDNA' ları elde edilmiş olan genlerin anlatım düzeylerindeki değişiklikler Universal Prob Library (UPL) probları kullanılarak kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile incelenmiştir. Bu reaksiyon için gerekli tüm bileşenleri içinde bulunan karışım hazırlanmıştır.

**RT-PZR reaksiyon karışımı:**

| **Reaksiyon karışımı** | **Konsantrasyon (µL)** | **Nihai miktar** |
|---|---|---|
| $dH_2O$ | | 1,8 µL |
| Primer F | 10 pikomol | 0,5 µL |
| Primer R | 10 pikomol | 0,5 µL |
| Master karışım (LC480) | 2X | 5 µL |
| Prob | 10 µM | 0,2 µL |

Polimeraz zincir reaksiyonu için cihaza özgü 96 kuyucuklu kabın işlem yapılacak her bir kuyucuğuna 8 µL bu karışımdan konulmuş ve üzerine 2 µL cDNA örnekleri eklenmiştir. Çalışmamızda tüm hücrelerde gen anlatımı olduğu bilinen *CYPA1* geni referans gen olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu (Roche LightCycler 480 System) gerçekleştirilmiştir.

**RT-PZR programı:**

| | |
|---|---|
| 95 °C' de 11 saniye | 1 döngü |
| 95 °C' de 10 saniye | |
| 60 °C' de 10 saniye | 45 döngü |
| 72 °C' de 1 saniye | |
| 40 °C' de 10 saniye | 1 döngü |

Gen anlatımlarının değerlendirilmesinde her gen için ışımanın başladığı Ct değeri kullanılmıştır. Housekeeping genin Ct değerinden hedef genlerin Ct değerleri çıkartılarak ΔCt değeri hesaplanmıştır ($\Delta Ct = Ct_{housekeeping} - Ct_{hedef\ gen}$). Elde edilen ΔCt değerinden her genin kendisine ait kontrol grubunun ΔCt değeri çıkarılarak ΔΔCt değeri elde edilmiştir ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{hedef\ gen} - \Delta Ct_{hedef\ gen\ kontrol}$). Ardından elde edilen ΔΔCt değeri ile $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplanmış ve istatistiksel analizler yapılmıştır. Çalışmada kullanılan primerlerin listesi çizelge 3.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Primer dizileri

| GEN | DİZİ | Uzunluk | Tm | % GC | Prob No |
|---|---|---|---|---|---|
| ***SURVIVIN*** | F: 5'TCTGCTTCAAGGAGCTGGA-3'<br>R: 5'AAAGTGCTGGTATTACAGGCGTA-3' | 19<br>23 | 59<br>60 | 53<br>43 | 36# |
| ***TP53*** | F: 5'CCCCAGCCAAAGAAGAAAC-3'<br>R: 5'AACATCTCGAAGCGCTCAC-3' | 19<br>19 | 59<br>59 | 53<br>53 | 58# |
| ***FAS*** | F: 5'GTGGACCCGCTCAGTACG-3'<br>R: 5'TCTAGCAACAGACGTAAGAACCA-3' | 18<br>23 | 60<br>59 | 67<br>43 | 60# |
| ***KASPAZ3*** | F: 5'CTGGTTTTCGGTGGGTGT-3'<br>R: 5'CCACTGAGTTTTCAGTGTTCTCC-3' | 18<br>23 | 59<br>60 | 56<br>48 | 34# |

### 3.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızda uygulanan her bir deney birbirinden bağımsız olarak 3 defa tekrar edilmiştir. Deney grupları arasındaki farklılıklar, Statistics Program for Social and Science 12.0 (SPSS) istatistik programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey' in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle değerlendirilmiştir. İlaç uygulanmayan negatif kontrole göre % 50 oranında hücre ölümüne neden olan doz hesaplanarak **$IC_{50}$ değeri** olarak kabul edilmiştir. DNA fragmentasyon oranı **zenginleştirme faktörü**ne göre hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirilen verilerin grafikleri Microsoft Excel (Office 2010) programı yardımıyla çizilmiştir.

Rölatif mRNA düzeyleri **ΔCt** metoduna göre hesaplanmıştır. Negatif kontrol ve dozlar arasındaki rölatif anlatım düzeylerindeki farklılıklar t-testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizler GraphPad Prism V ile yapılmış ve grafikler çizilmiştir. Tüm analizlerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Çizilen grafiklerde istatistiksel anlamlılıklar uygun işaretlerle gösterilmiştir.

# 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Serviks kanseri, dünyada kadınlarda görülen kanserler arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Günümüzde serviks kanserinin tedavisi için cerrahi müdahalenin ardından radyasyon tedavisi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Fakat kullanılan kemoterapötik ajanların pek çok yan etkisi görülmektedir (WHO, 2014). Bu sebeple daha az yan etkiye sahip, kanserli hücreler üzerinde seçici şekilde düşük dozlarda daha fazla sitotoksik etki gösteren yeni ilaç araştırmaları devam etmektedir. Bilimsel ve teknolojik gelişmelerin hızla arttığı günümüzde kanserle ilgili çalışmalar önem kazanmakta ve sayısı günden güne daha da artmaktadır.

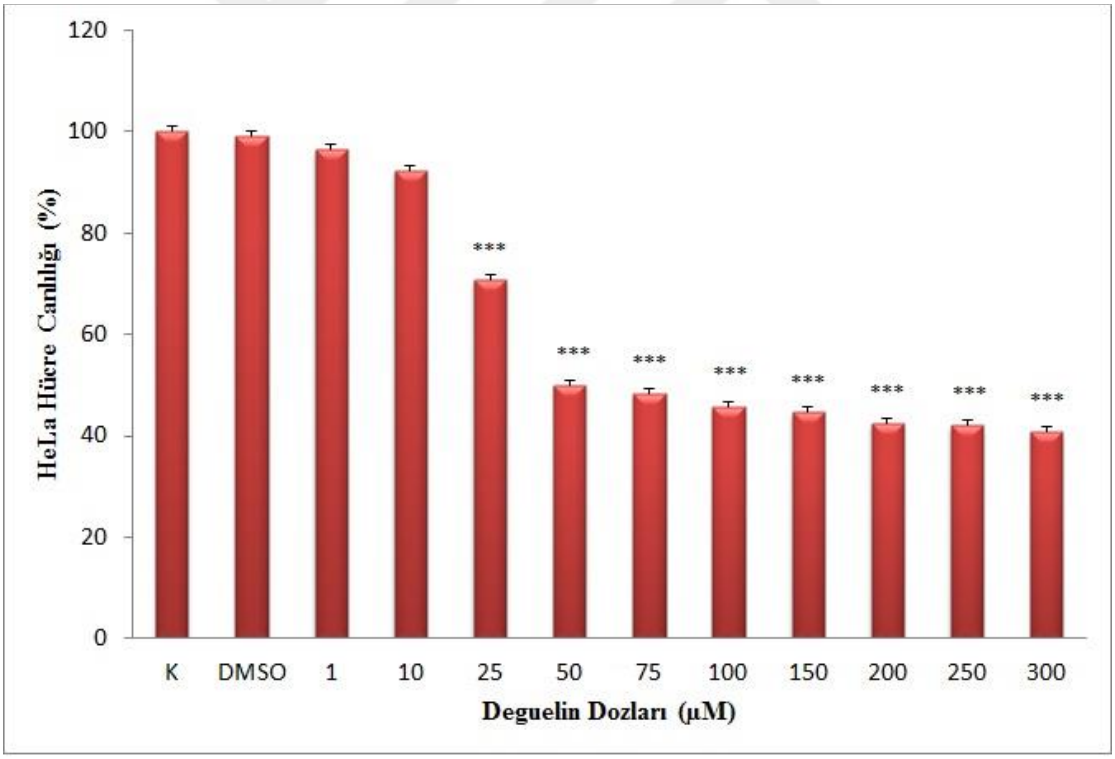
Son yıllarda kanserli hücrelerin çoğalmasını engellemek için yapılan çalışmalarda, özellikle bitkisel kökenli maddelerin araştırılması oldukça popülerdir. Deguelin de *Legüminosa* familyasına ait farklı pek çok bitkiden izole edilmiş flavonoid kökenli bir rotenoidtir. Deguelinin farklı kanser hücre dizileri üzerinde düşük dozlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu çalışmalarla rapor edilmiştir (Murillo vd., 2002). Yapılan literatür çalışmasında deguelinin insan serviks karsinoma (HeLa) hücre dizisi üzerindeki doza ve zamana bağlı sitotoksik ve apoptotik etkileri ile ilgili ayrıntılı herhangi bir çalışma olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışmamızda ilk olarak deguelinin HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini MTT yöntemi ile araştırdık. Ardından deguelinin HeLa hücre morfolojisi üzerindeki etkilerini ters ışık mikroskobu yardımıyla inceledik ve görüntüledik. Deguelinin, HeLa hücrelerindeki apoptotik etkilerinin araştırılması için DNA fragmentasyon elisa yöntemini kullanıldık. Son olarak da deguelinin HeLa hücrelerinde *TP53, SURVİVİN, FAS* ve *KASPAZ3* gen anlatım düzeyleri üzerindeki etkisini RT-PZR yöntemi ile araştırdık.

## 4.1. Deguelinin HeLa Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkileri

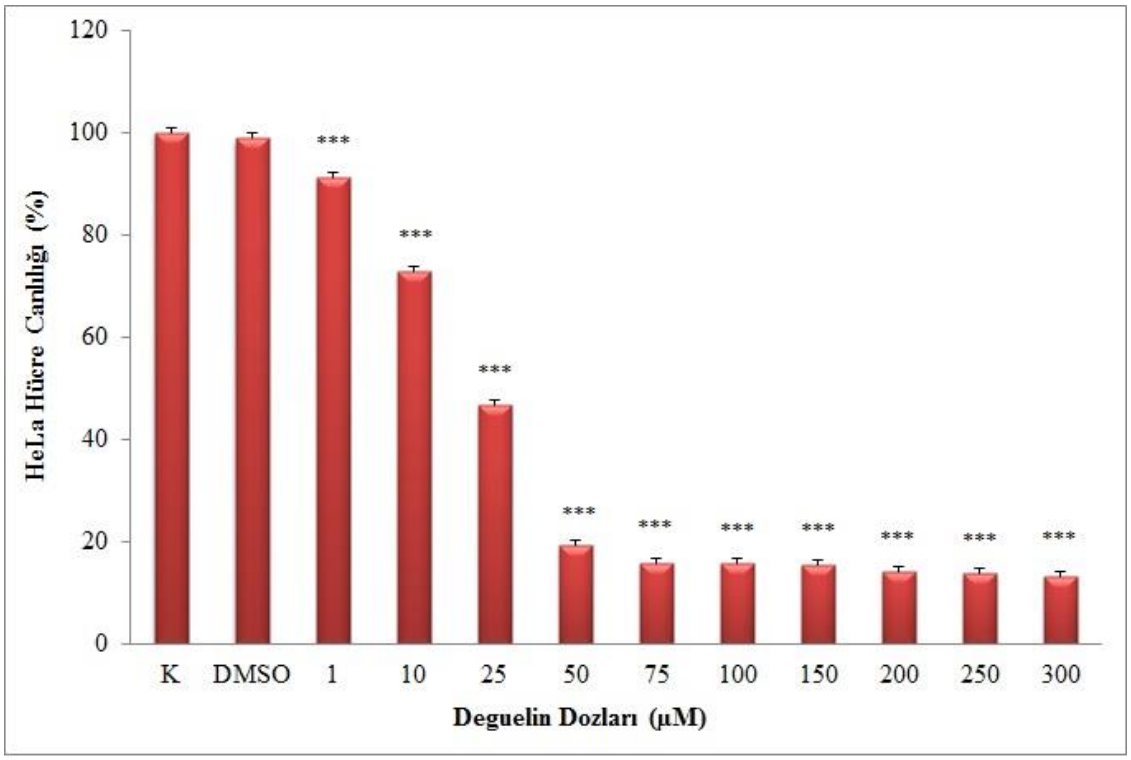
Çalışmamızda, 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM deguelin dozlarının 24 ve 48 saatte HeLa hücreleri üzerindeki çoğalmayı baskılayıcı etkilerinin belirlenmesi amacıyla ile MTT yöntemi uygulanmıştır.

Deguelinin, 24 saatte 1 ve 10 µM dozlarında çoğalmayı baskılayıcı etki görülmezken ($p>0,05$); 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM dozlarında sırasıyla % 30, 51, 52, 55, 56, 58, 58 ve 60 oranında HeLa hücre çoğalmasını baskıladığı belirlenmiştir ($p<0,001$, Şekil 4.1). Elde edilen veriler incelendiğinde, 50 µM dozundan sonraki tüm dozlarda sitotoksik etkinin aynı oranda sabit bir şekilde devam ettiği ve dozlar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı saptanmıştır. Kontrole göre % 50 oranında sitotoksik etki gösteren doz olarak $IC_{50}$ değeri, 24 saatte 50 µM olarak hesaplanmıştır.




Şekil 4.1. Deguelinin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 24 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. (K: Kontrol; DMSO: Çözücü kontrol; ***: $p<0,001$).

Denenen tüm deguelin dozlarının HeLa hücrelerinin çoğalmasını 48 saatte anlamlı bir şekilde baskıladığı görülmüştür ($p<0,001$; Şekil 4.2). Uygulanan dozların sırasıyla % 9, 28, 54, 81, 85, 85, 85, 86, 87 ve 87 oranında hücre çoğalmasını azalttığı belirlenmiştir. İstatistiksel veriler incelendiğinde, 50 µM dozundan sonraki tüm dozlarda sitotoksik etkinin aynı oranda sabit bir şekilde devam ettiği ve dozlar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı saptanmıştır. Deguelinin $IC_{50}$ değeri 48 saat için 23 µM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca en yüksek doz içinde bulunan DMSO miktarının her iki muamele süresinde de hücre yaşam oranında herhangi bir değişime neden olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$; Şekil 4.2).




Şekil 4.2. Deguelinin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 48 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. (K: Kontrol; DMSO: Çözücü kontrol; ***: $p<0,001$).

Bu sonuçlar doğrultusunda; deguelinin HeLa hücrelerinin canlılık oranlarını doza ve zamana bağlı olarak baskıladığı belirlenmiştir.

Benzer şekilde Li vd., deguelinin lösemi için terapötik etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada; deguelinin Jurkat hücreleri üzerindeki çoğalmayı

baskılayıcı etkilerini MTT yöntemi ile belirlemişlerdir. Çalışmaya göre 5-160 nM deguelin 0, 12, 24, 48 ve 72 saat süreyle Jurkat hücreleri ile muamele edildiğinde deguelinin hücre çoğalmasını doza ve zamana bağlı olarak azalttığı gösterilmiş ve 24 saat için $IC_{50}$ değeri 43,73 ± 0,35 nmol/L olarak hesaplanmıştır (Li vd., 2009).

Lee vd., ise 2008 yılında 3 farklı karaciğer kanseri hücre dizisi (HepG2, Huh-7 ve SK-Hep1) üzerinde 72 saat süreyle uygulanan 0,01-100 μM deguelin dozlarının çoğalmayı baskılayıcı etkilerini MTT yöntemi ile araştırıldığında deguelinin doza bağlı olarak karaciğer kanseri hücre dizilerinin çoğalmasını baskıladığı ve $IC_{50}$ değerlerinin sırasıyla 0,62; 0,74 ve 4,99 μM olarak hesaplandığını rapor etmişlerdir (Lee vd., 2008).

Lee vd., 2010 yılında deguelinin mide kanseri üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla SNU-484, AGS ve MKN-28 gastrik kanser hücre dizileri ile deguelini 72 saat süreyle muamele ettikten sonra MTT yöntemi uygulamışlar ve $IC_{50}$ değerinin sırasıyla 0,45; 1,38 ve 0,06 μM olarak hesaplamışlardır. Sonuçta deguelinin doza bağlı olarak gastrik kanser hücrelerinin çoğalmasını baskıladığını belirlemişlerdir (Lee vd., 2010).

Hafeez vd., 2016 yılında yaptıkları çalışmada *ERK1* ve *ERK2* siRNA ile trasfekte edilmiş HeLa hücreleri üzerinde deguelinin 1, 5, 10, 20 ve 40 μM dozlarının 24 saatlik etkisi MTT yöntemi ile belirlemiş ve sonuçta deguelinin dikkate değer şekilde HeLa hücre çoğalmasını baskıladığı bulunmuştur. Çalışmada $IC_{50}$ değeri hesaplanmamıştır (Hafeez vd., 2016).

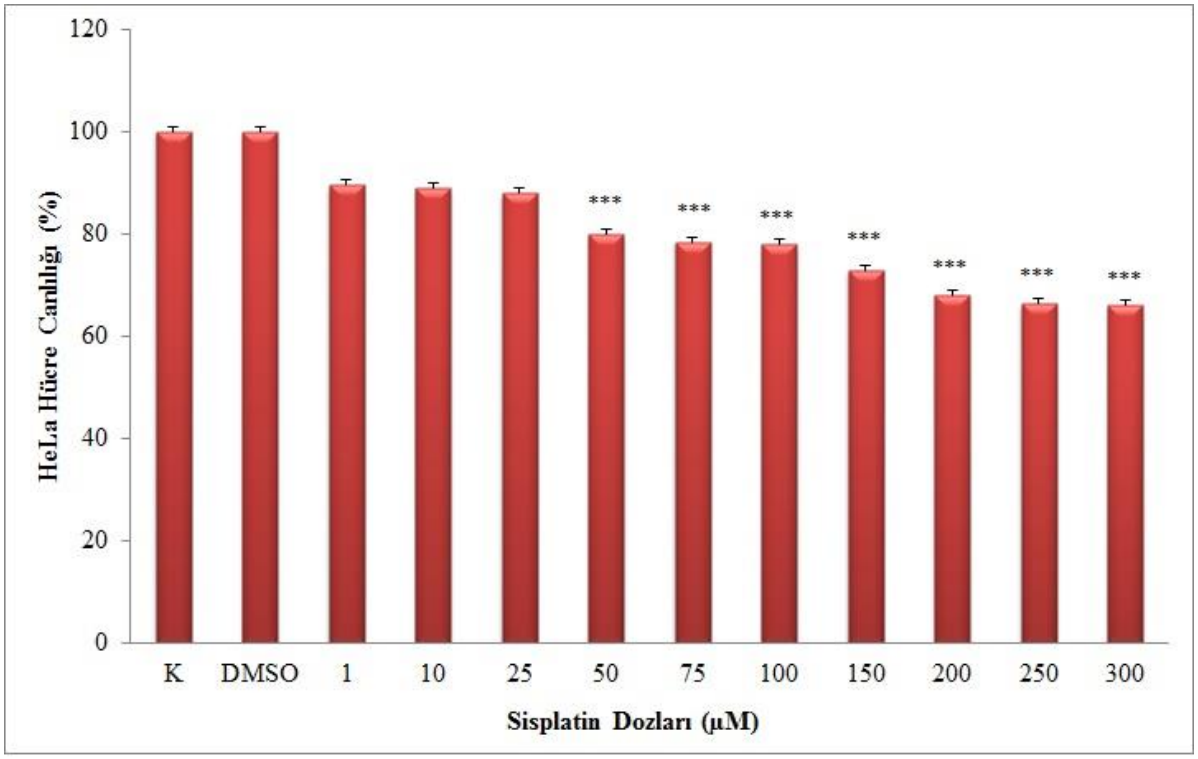
Chun vd., 2003 yılında deguelinin akciğer kanseri için potansiyel kemopreventif etkilerini belirlemek amacıyla premalignant ve malignant insan bronşiyal epitel hücreleri üzerinde deguelinin çoğalmayı baskılayıcı etkilerini MTT yöntemini kullanarak araştırmışlardır. Deguelinin premalignant ve malignat HBE hücreleri üzerinde doza ve zaman bağlı olarak çoğalmayı baskıladığı belirlenmiştir. Akciğer kanserinin erken evrelerinin modeli olan premalignant HBE hüceleri degueline karşı en duyarlı hücreler olarak belirlenmiştir. $10^{-7}$ M deguelin 1 günde çoğalmayı % 67,1 oranında baskıladığı hesaplanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada deguelinin çoğalmayı baskılayıcı etkisinin geri dönüşümlü olup olmadığını belirlemek amacıyla, premalignant hücreleri $10^{-7}$ M deguelin ile 1-3 gün muamele edildikten sonra deguelin bulunmayan medyum ile ek olarak 5 gün

daha kültüre edilmiş ve taze medyumla inkübe edilen hücrelerde çoğalmanın azalmaya devam ettiği görülmüştür. Dolayısıyla deguelinin hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisinin geri dönüşümsüz olduğu rapor edilmiştir (Chun vd., 2003).

Farklı kanserli hücre dizileri üzerinde denenen deguelinin hücreler üzerinde göstermiş olduğu sitotoksik etkinin farklı dozlarda olması hücrelerin farklı olmasından, deneye alınan hücre sayısındaki farklılıklardan ve uygulama sürelerinin farklılığından kaynaklanmaktadır.

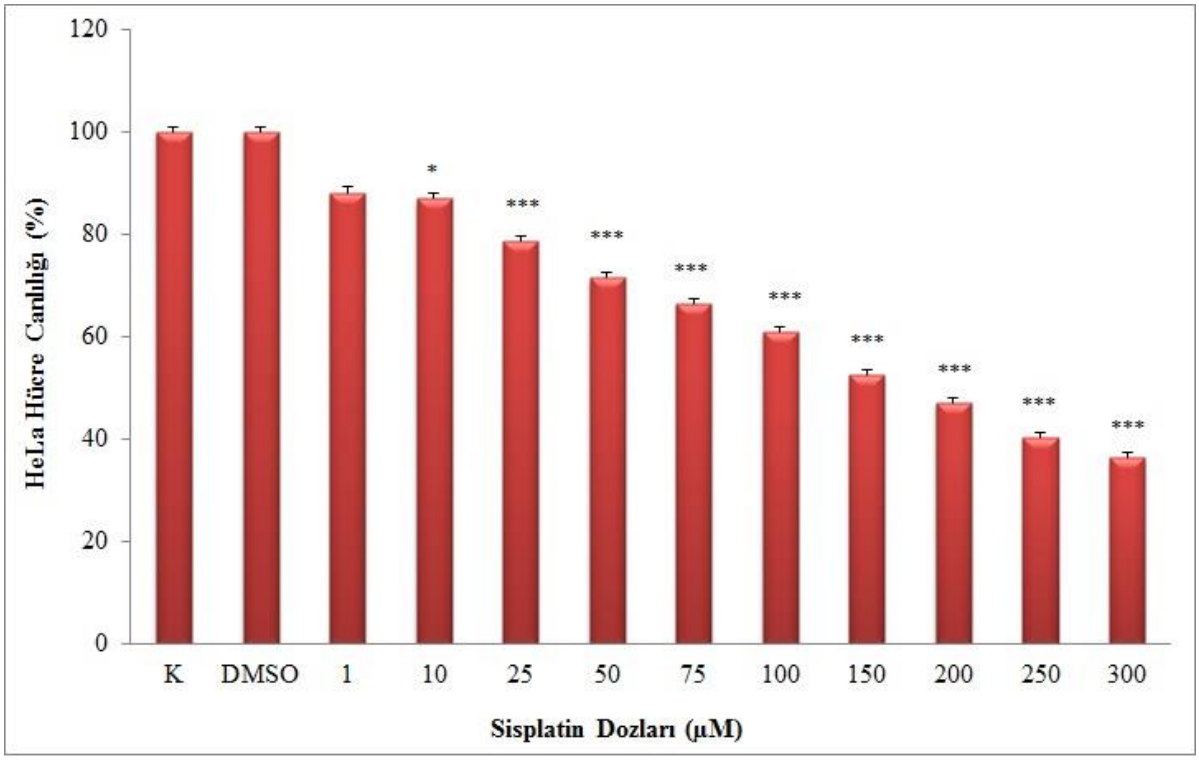
Serviks kanserinin tedavisi için günümüzde gerek tek gerekse de kombine kemoterapi uygulamalarında çoğunlukla kullanılan kemoterapötik ilaç sisplatindir. (Pectasides vd., 2008) Bizim de çalışmamızda deguelinin sitotoksik etkisini kıyaslamak için pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılmıştır.

Çalışmamızda denenen 1, 10 ve 25 μM sisplatin dozlarının 24 saatte herhangi bir sitotoksik etkisi görülmezken ($p>0,05$); 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 μM dozlarının HeLa hücre canlılığını sırasıyla % 21, 22, 23, 28, 32, 34 ve 34 oranında azalttığı belirlenmiştir ($p<0,001$, Şekil 4.3). Sisplatinin 24 saat süre ile denen dozlarında kontrole göre çoğalmayı % 50 oranında baskılayan dozu ($IC_{50}$) hesaplanamamıştır.



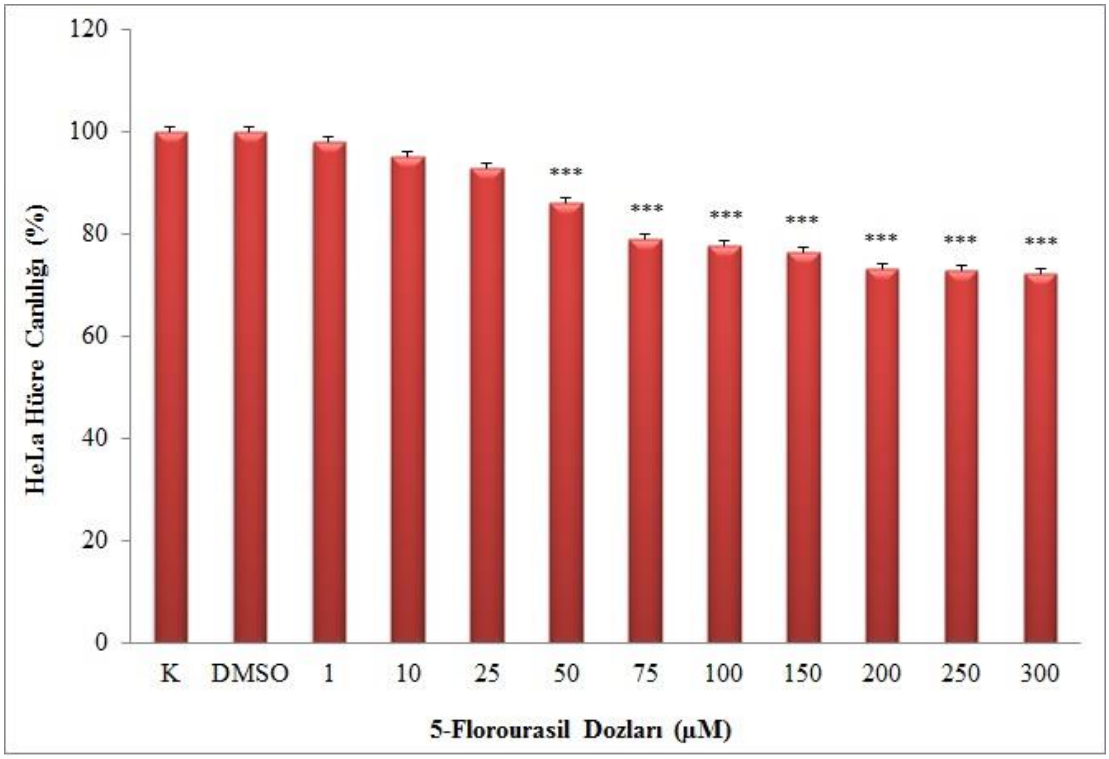

Şekil 4.3. Sisplatin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 24 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. (K: Kontrol; DMSO: Çözücü kontrol; ***: $p<0,001$).

Sisplatinin 48 saat süre ile uygulanması sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde ise, 1 µM dozunda herhangi bir etki görülmezken ($p>0,05$); 10 µM dozundan itibaren hücre canlılığını % 13 ($p<0,01$); 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM dozlarında ise sırasıyla % 22, 29, 34, 40, 48, 53, 60 ve 64 oranında azalttığı belirlenmiştir ($p<0,001$, Şekil 4.4). Sisplatinin $IC_{50}$ değeri 48 saatte ise 167 µM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca sisplatinin denenen en yüksek dozunun çözücüsü olarak kullanılan DMSO'in her iki muamele süresinde de hücre yaşam oranında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).



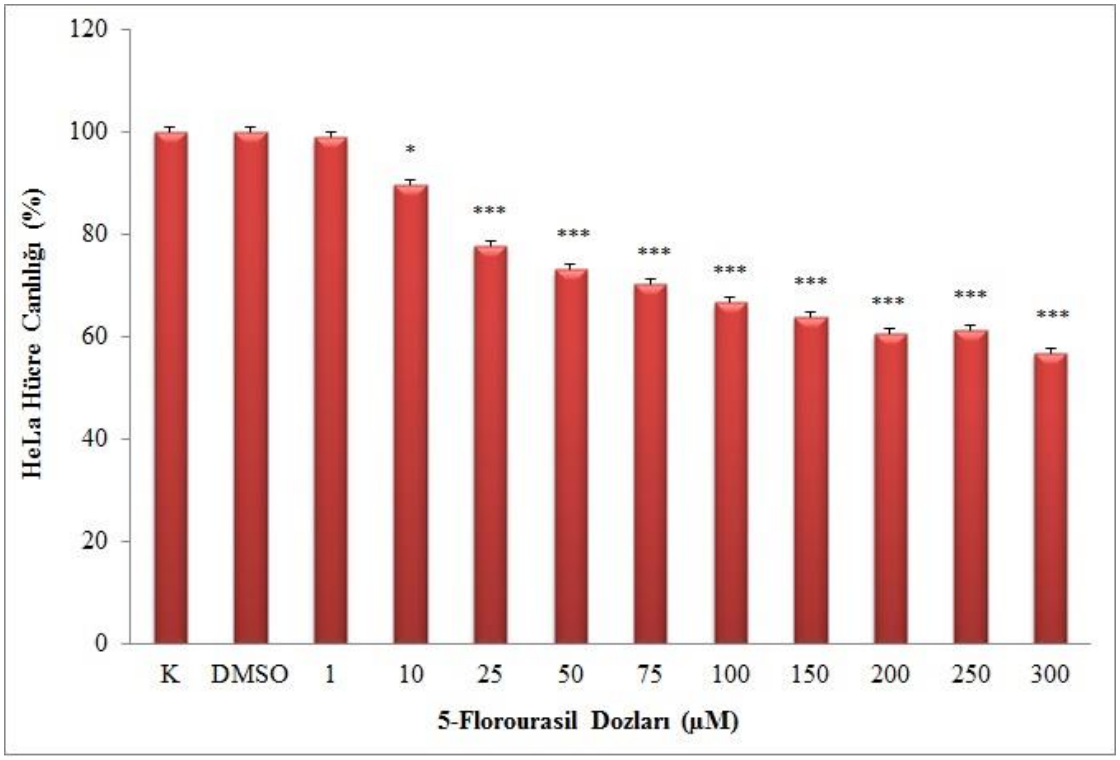

Şekil 4.4 Sisplatin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 48 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. (K: Kontrol; DMSO: Çözücü kontrol; *: $p<0,05$; ***: $p<0,001$).

Çalışmamızda yine serviks kanserinin tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılan 5-FU (Cadron, vd., 2007) ikinci pozitif kontrol olarak seçilmiştir. Denenen 1, 10 ve 25 µM 5-FU dozlarının, 24 saatte HeLa hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmezken ($p>0,05$); 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM dozlarında sırasıyla % 15, 21, 23, 24, 27, 28 ve 28 oranında hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir ($p<0,001$, Şekil 4.5). Sisplatine benzer şekilde, 24 saatte denenen tüm 5-FU dozlarında da kontrole göre çoğalmayı % 50 oranında baskılayan dozu ($IC_{50}$) hesaplanamamıştır.




Şekil 4.5. 5-FU dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 24 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. (K: Kontrol; DMSO: Çözücü kontrol; ***: $p<0,001$).

48 saatte 5-FU'in 1 µM dozunda HeLa hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etki görülmezken ($p>0,05$); 10 µM dozunda hücre canlılığının azalmaya başladığı ($p<0,05$); 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM dozlarında ise sırasıyla % 23, 27, 30, 34, 37, 40, 40 ve 44 oranında hücre canlılığını azalttığı hesaplanmıştır ($p<0,001$, Şekil 4.6). Bununla beraber hücre canlılığını azaltmasına rağmen 48 saatte de 5 FU'nun $IC_{50}$ değeri hesaplanamamıştır. Ayrıca 5-FU'in denenen en yüksek dozunun çözücüsü olarak kullanılan DMSO'nun her iki muamele süresinde de hücre yaşam oranında herhangi bir değişime uğratmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).




Şekil 4.6. 5-FU dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 48 saatlik çoğalmayı baskılayıcı etkisi. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. (K: Kontrol; DMSO: Çözücü kontrol; *: $p<0,05$; ***: $p<0,001$).

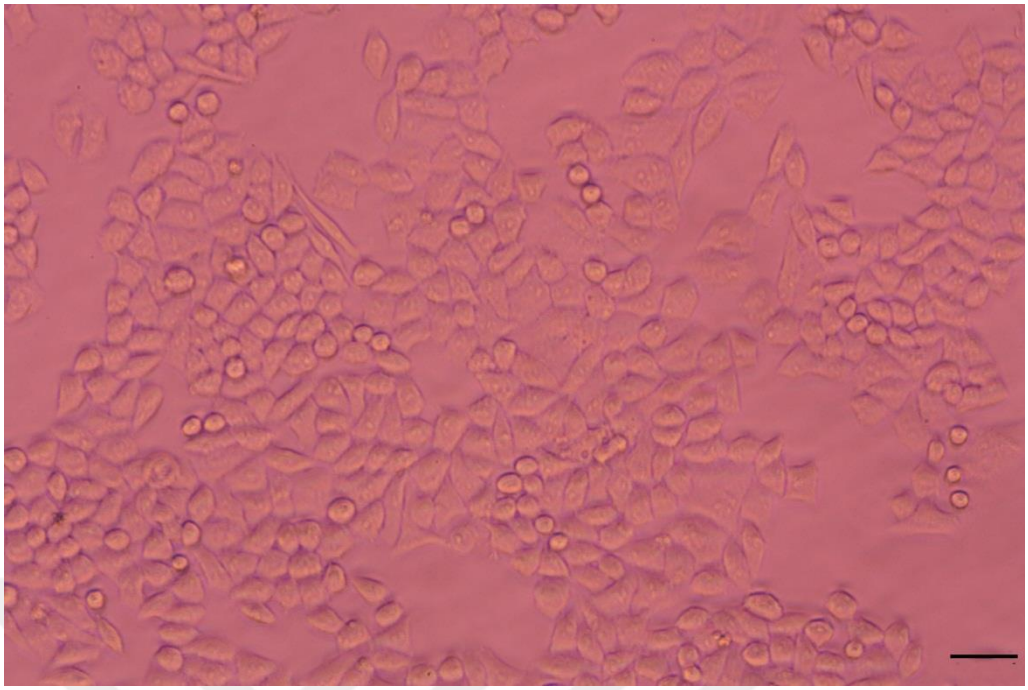
Yapılan literatür tarama çalışmasında farklı antikanser ajanlarla kombine olarak denenmiş fakat bu ajanlar tek başlarına hücre dizilerine verilip hücre canlılığı üstündeki etkileri deguelin ile karşılaştırılarak araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda ilk kez serviks kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan iki farklı kemoterapötik ajan ile deguelinin sitotoksik etkileri doza ve zamana bağlı olarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde, deguelinin serviks kanseri hücreleri üzerinde günümüzde hastalığın tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılan sisplatin ve 5-FU' e göre daha güçlü sitotoksik bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

## 4.2. Deguelinin HeLa Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkileri

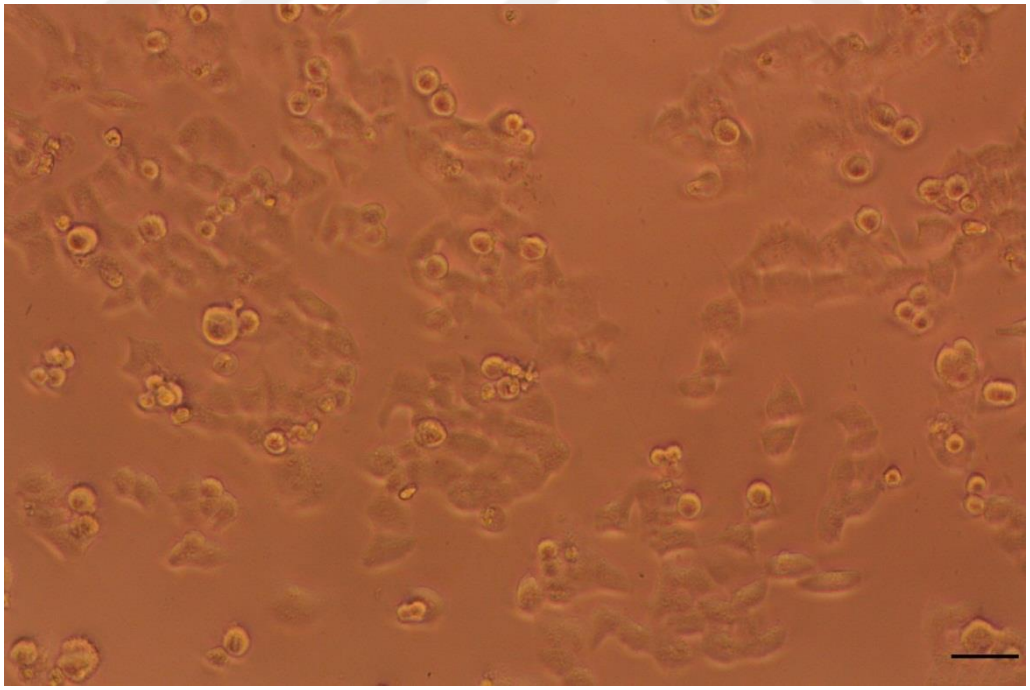
Hücre morfolojisinde yapısal olarak görülen bazı değişiklikler bize hücrede moleküler ve hücresel düzeyde bazı değişimlerin olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda bu amaçla deguelinin HeLa hücrelerinde morfolojik olarak herhangi bir değişikliğe sebep olup olmadığı araştırılmıştır. Epitelyal morfolojiye sahip HeLa hücreleri farklı deguelin dozları ile inkübe edildikten 24 ve 48 saat sonra ters ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Morfolojik ve sayısal değişiklikler ters ışık mikroskobu yardımıyla görüntülenmiştir.

Uygulanan 1 ve 10 μM deguelin dozlarının, kontrol grubu (Şekil 4.7) ile karşılaştırıldığında, morfolojik ve sayısal olarak HeLa hücrelerinde 24 saatte herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Morfolojik ve sayısal değişikliklerin 25 μM dozundan itibaren başladığı ve doz artışına bağlı olarak hücre morfolojisinde ve sayısında değişikliklerin arttığı belirlenmiştir.

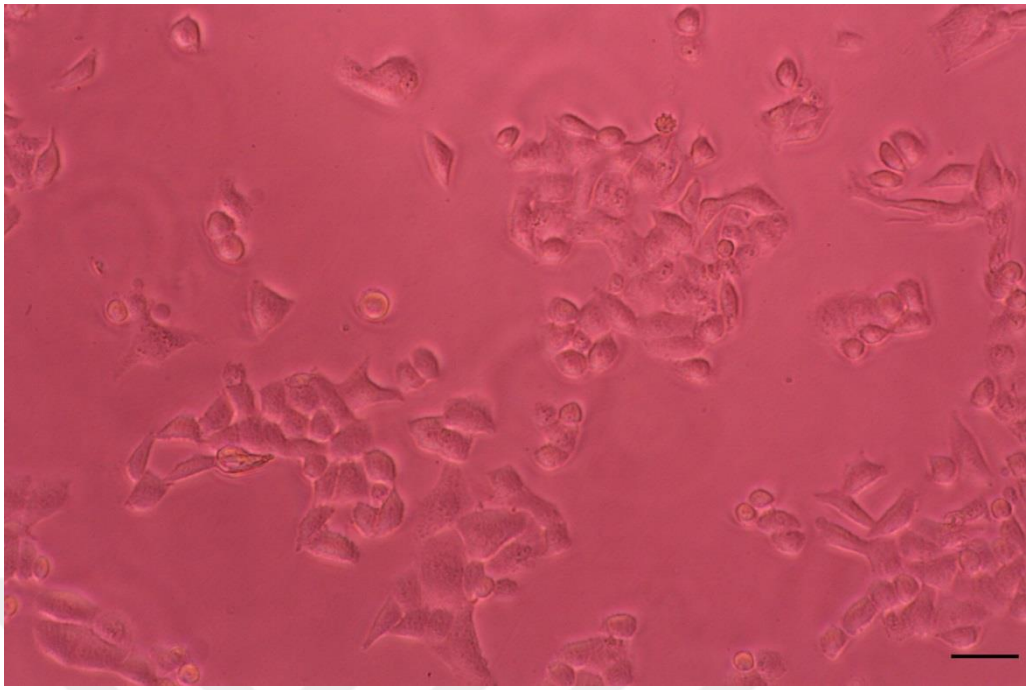
Deguelinin 25 μM dozunda kontrol grubu hücreleri ile kıyaslandığında hücrelerin tipik epitelyal morfolojilerini kaybedip; daha yuvarlak şekil aldıkları ve hücreler arasındaki bağlantıların azaldığı ve hatta hücrelerin birbirlerinden ayrılmaya başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Deguelinin 50 (Şekil 4.9) ve 75 μM (Şekil 4.10) dozundan itibaren ise hücre sayısının kontrol grubuna göre neredeyse yarı yarıya azaldığı ve hücrelerin yuvarlak bir şekil aldığı tespit edilmiştir. Deguelinin 100 μM dozundan itibaren morfolojik değişikliklerin benzer şekilde devam ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).



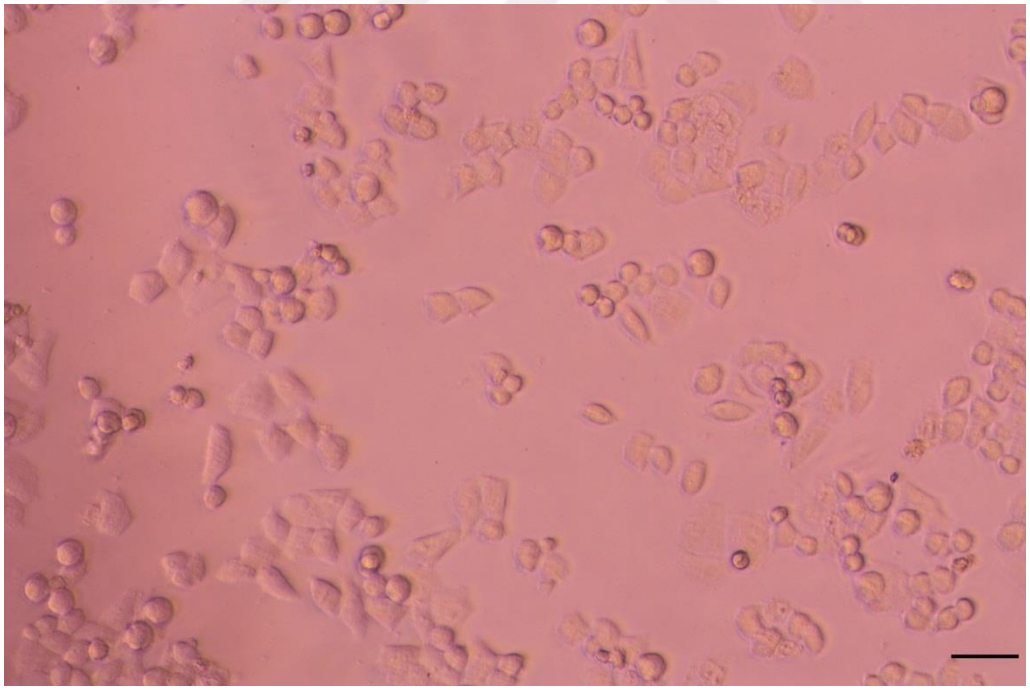
Şekil 4.7. HeLa hücrelerinin kontrol grubunun 24 saatteki morfolojik görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm.



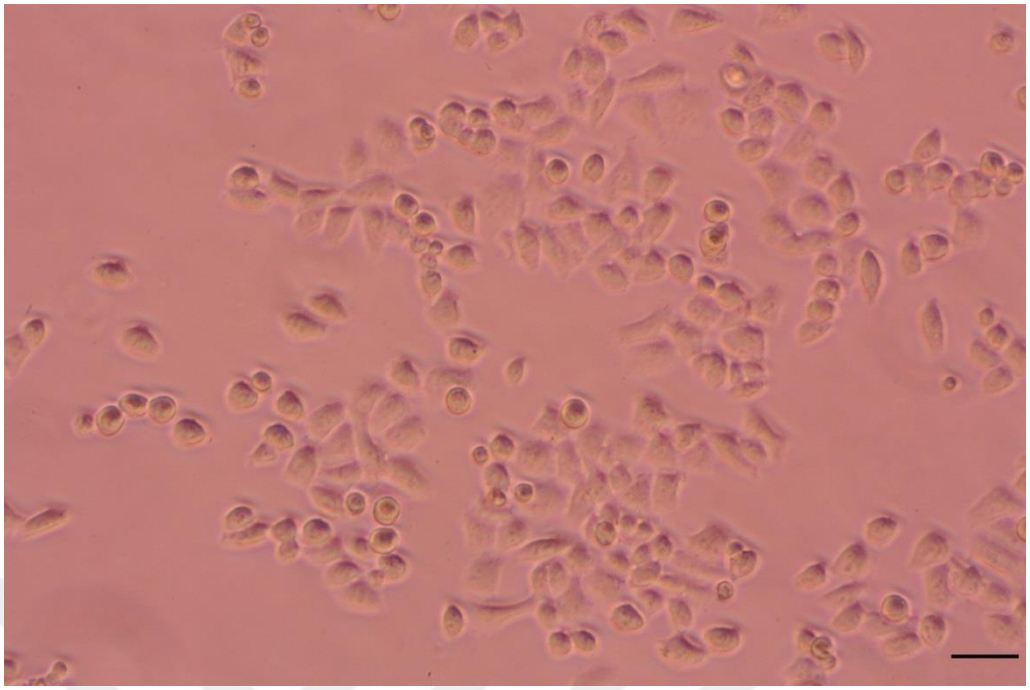
Şekil 4.8. HeLa hücreleri üzerinde 25 µM deguelin dozunun 24 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm.



Şekil 4.9. HeLa hücreleri üzerinde 50 µM deguelin dozunun 24 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm.

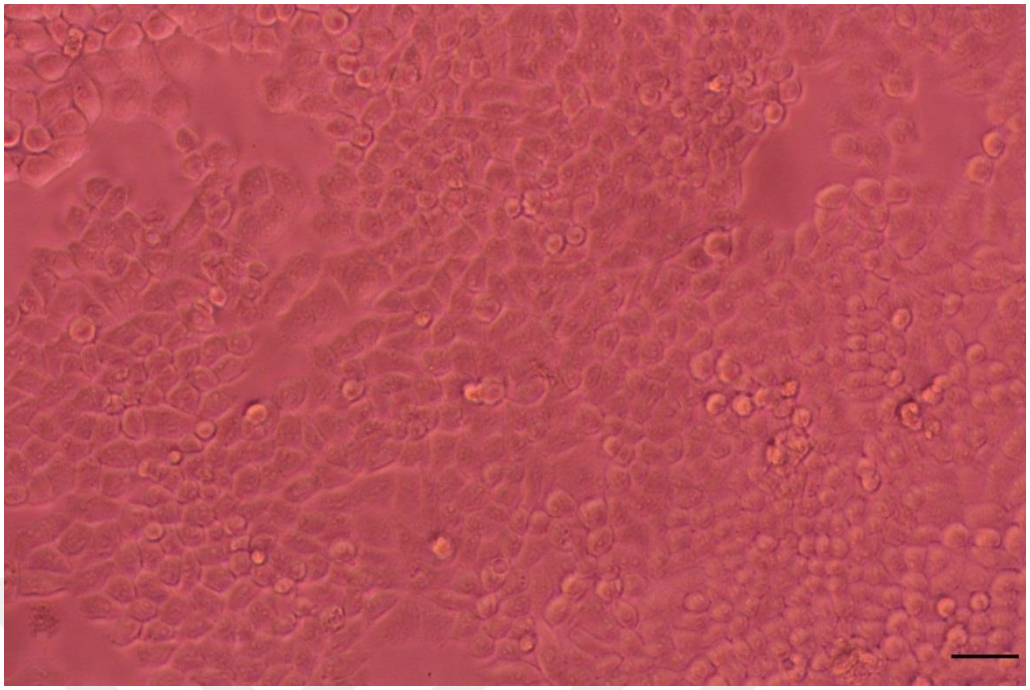


Şekil 4.10. HeLa hücreleri üzerinde 75 µM deguelin dozunun 24 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm.

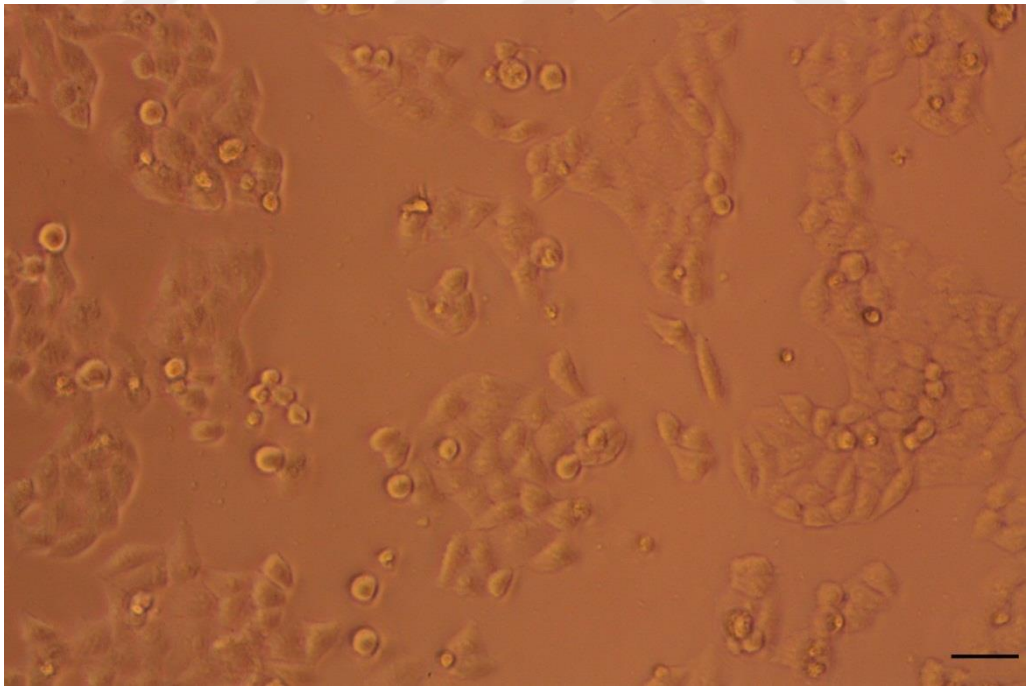


Şekil 4.11. HeLa hücreleri üzerinde 100 µM deguelin dozunun 24 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm.

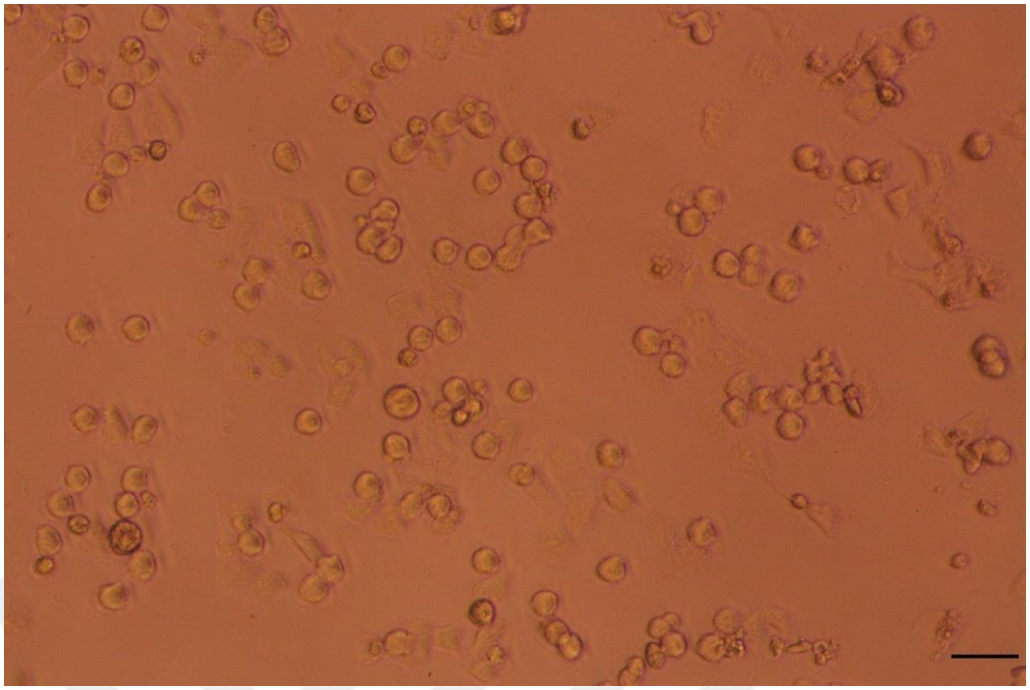
Deguelinin, HeLa hücreleri üzerinde 48 saatteki morfolojik etkileri değerlendirildiğinde; 1 µM dozunda kontrole (Şekil 4.12) göre morfolojik ve sayısal olarak herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Hücre sayısındaki azalma ve morfolojisindeki değişikliklerin 10 µM dozundan itibaren başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Benzer şekilde 25 µM deguelin dozunda hücrelerinin sayısındaki belirgin azalış devam ederken, hücre morfolojilerinin de bozulduğu tespit edilmiştir. 24 saatte olduğu gibi hücreler arasındaki bağlantıların azaldığı ve hücrelerin birbirlerinden ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.14). 50 µM dozundan (Şekil 4.15) itibaren artan tüm dozlarda (75 (Şekil 4.16), 100 (Şekil 4.17), 150, 200, 250 ve 300 µM) hücre sayısının iyice azaldığı ve hücre morfolojilerinin de tamamen bozulduğu görülmüştür. Fakat bu üst dozlar kendi aralarında kıyaslandığında ise, morfolojik olarak herhangi bir farklılık gözlenmediği için üst dozların fotoğrafları konulmamıştır.



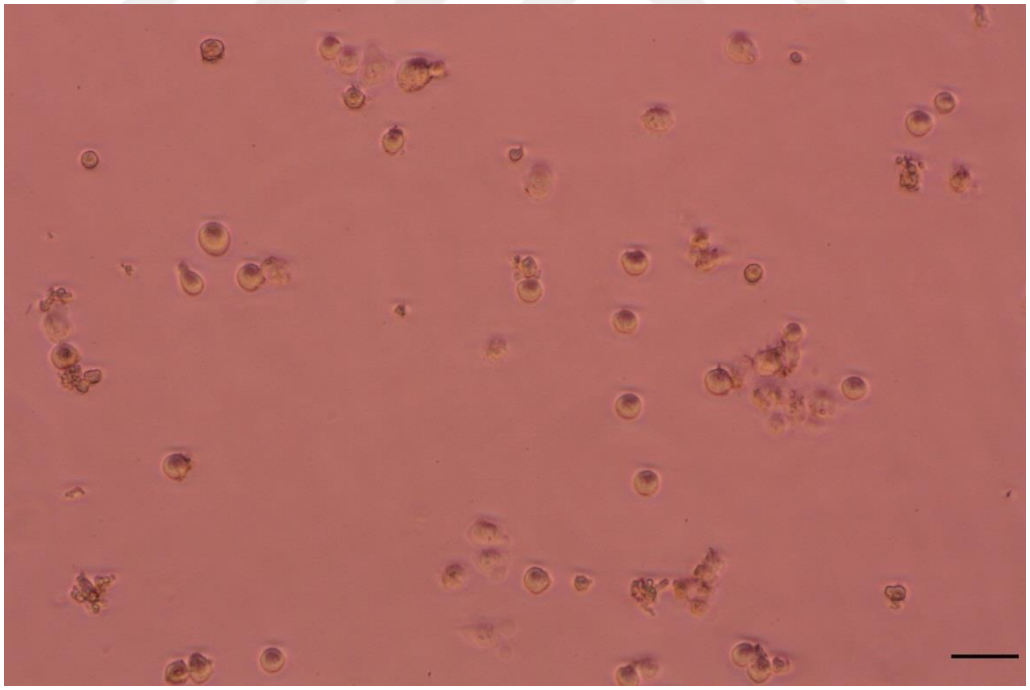
Şekil 4.12. HeLa hücrelerinin deguelin uygulanmamış kontrol grubunun 24 saatteki morfolojik görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm.



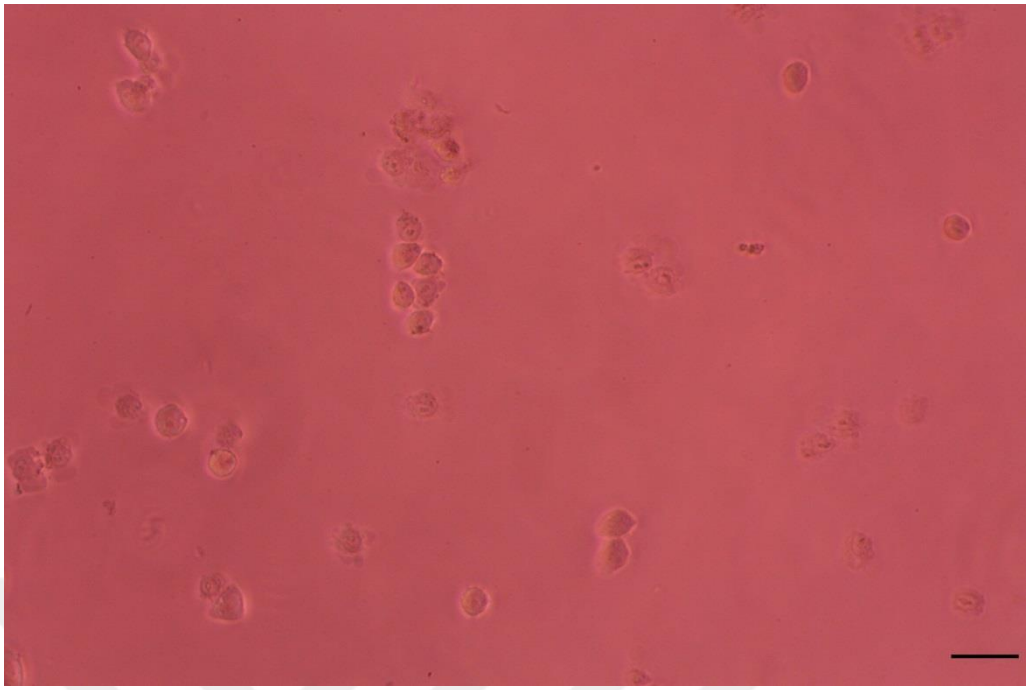
Şekil 4.13. HeLa hücreleri üzerinde 10 µM deguelin dozunun 48 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm.



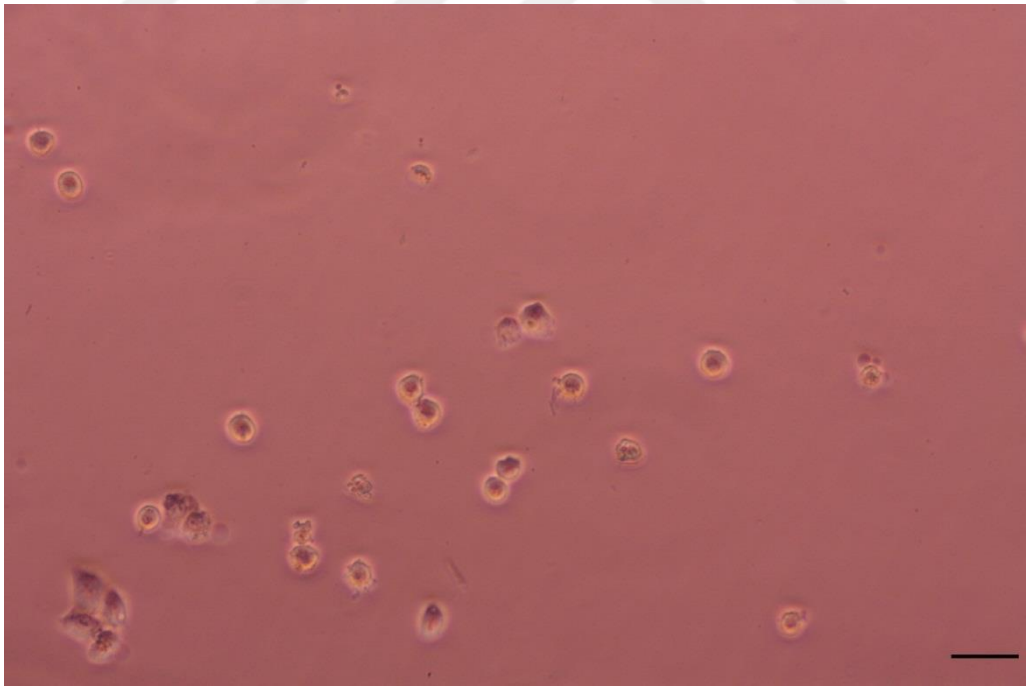
Şekil 4.14. HeLa hücreleri üzerinde 25 µM deguelin dozunun 48 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm



Şekil 4.15. HeLa hücreleri üzerinde 50 µM deguelin dozunun 48 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm



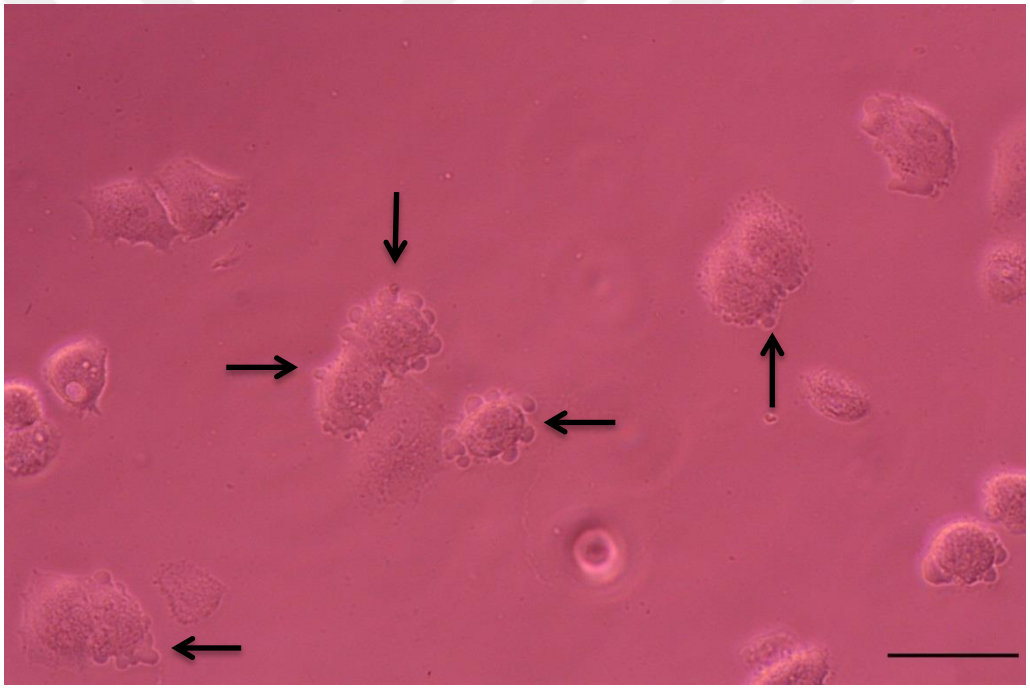
Şekil 4.16. HeLa hücreleri üzerinde 75 µM deguelin dozunun 48 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm



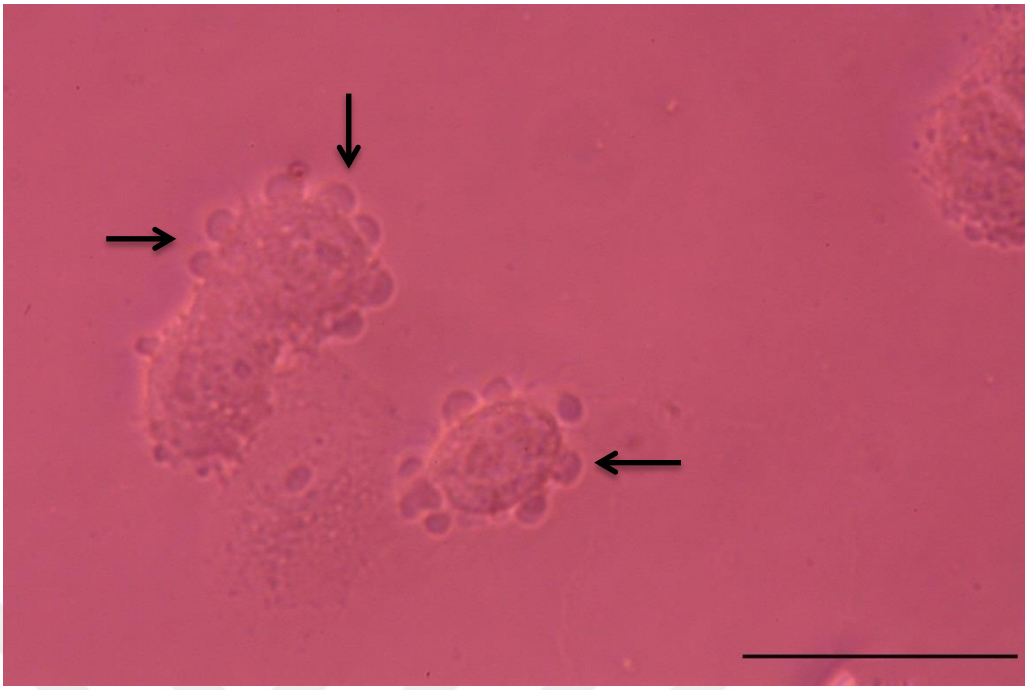
Şekil 4.17. HeLa hücreleri üzerinde 100 µM deguelin dozunun 48 saatteki morfolojik etkilerinin görüntüsü. Ölçü birimi: 50µm

Yapılan literatür araştırmasında deguelinin HeLa ya da farklı hücreler üzerindeki morfolojik etkilerine dair herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, deguelinin HeLa hücre morfolojisi üzerindeki doza ve zamana bağlı etkisi ilk kez gösterilmiştir.

Yapılan mikroskop incelemelerinde hücrelerin apoptoza benzer morfoloji gösterdiği belirlenmiştir. Bu hücreler daha yüksek mikroskop büyütmelerinde ayrıntılı olarak incelendiğinde, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'de görüldüğü gibi, hücrelerin büzüldüğü, hücre zarlarında kabarcıkların ve apoptotik cisimlere benzer yapıların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).

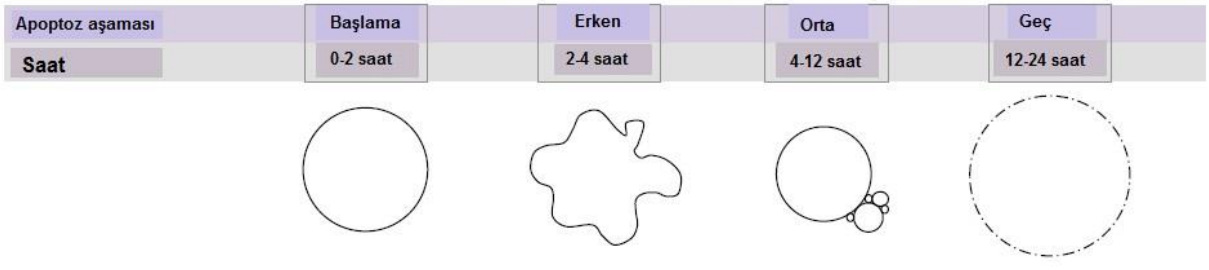


Şekil 4.18. 24 saat 75 µM deguelin dozu ile muamele edilen hücrelerin zarlarında oluşan kabarcıkların ve apoptotik cisimciklere benzer yapıların görüntüsü. (Ölçü birimi: 50µm, → hücre zarında görülen apoptoza benzer kabarcıklar, 200X)



Şekil 4. 19. 24 saat 75 µM deguelin dozu ile muamele edilen hücrelerin zarlarında oluşan kabarcıkların ve apoptotik cisimciklere benzer yapıların daha ayrıntılı görüntüsü. (Ölçü birimi: 50µm, → hücre zarında görülen apoptoza benzer kabarcıklar, 400X)

Yapılan pek çok araştırmada, apoptoza özgü morfolojik değişiklikler tanımlanmış ve Şekil 4.20'de gösterildiği gibi, apoptoza uğrayan hücrelerin apoptozun aşamasına göre sırasıyla büzülme, membranda kabarcık oluşumu ve ardından apoptotik cisimlerin oluşumu gibi karakteristik morfolojik özellikler gösterdiği rapor edilmiştir (Elliott ve Ravichandran, 2016; Atkin-Smith ve Poon, 2017).




Şekil 4. 20. Apoptotik süreçte hücrelerde görülen morfolojik değişiklikler

Ters ışık mikroskobu ile yapılan inceleme sonuçlarına göre deguelin epitelyal morfolojiye sahip HeLa hücrelerinin sayı ve morfolojilerini doza ve zamana bağlı olarak

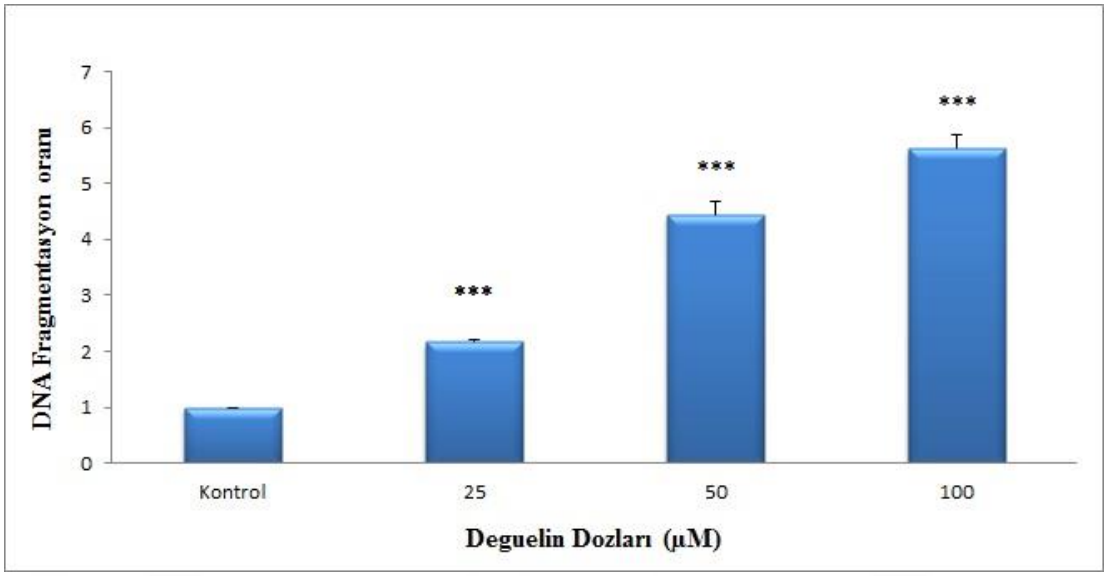
değişikliğe uğratmış ve apoptoza benzer morfoloji görülmüştür. Ancak, bu değişikliklerin apoptotik hücre ölümü sebebiyle olup olmadığı apoptozu belirlemeye yönelik farklı yöntemlerle araştırılmalıdır. Bu sebeple çalışmamızın bir sonraki aşamasında deguelinin apoptotik etkileri araştırılmıştır.

### 4.3. Deguelinin HeLa Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkileri

Apoptotik hücre ölümünü diğer hücre ölüm yöntemlerinden ayıran spesifik bazı özellikler vardır. Bunlar arasında kromatin kondensasyonu, DNA fragmentasyonu, hücre zarında kabarcık oluşumu ve apoptotik cisimlerin oluşumu sayılabilir. Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi için bu karakteristik özelliklere dayalı morfolojik, biyokimyasal, moleküler biyolojik ve genetik birçok yöntem bulunmaktadır (Taatjes vd., 2008). Biz de çalışmamızda deguelinin neden olduğu apoptotik hücre ölümünü DNA fragmentasyonunun ölçümüne dayalı kolorimetrik bir yöntem olan hücre ölümünü belirleme kiti kullanarak araştırdık.

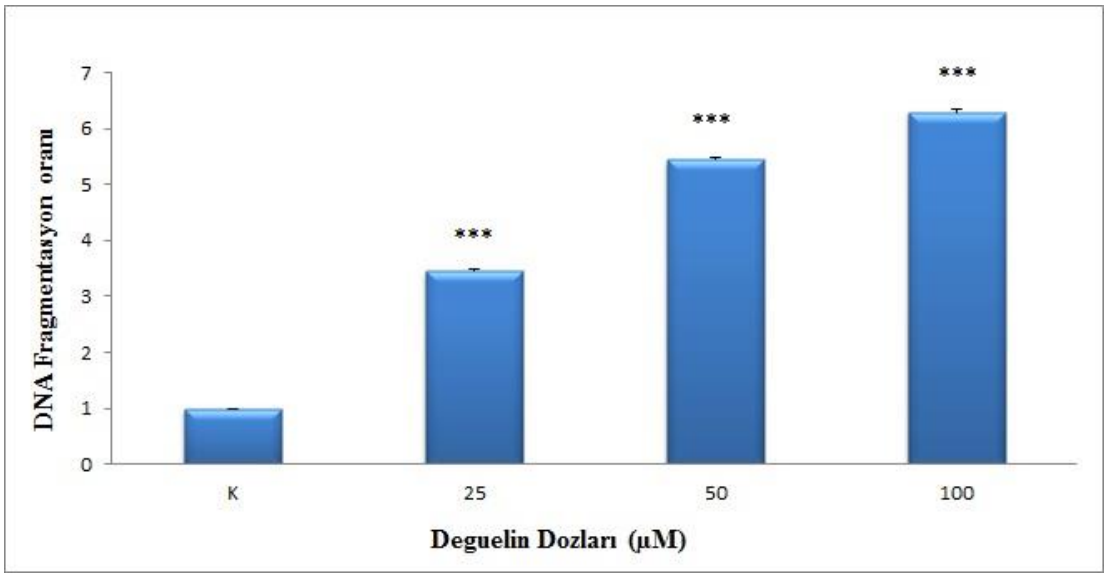
Çalışmamızda, deguelinin apoptotik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, HeLa hücre yaşam oranı üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu belirlenen üç farklı deguelin dozu (25, 50 ve 100 μM) seçilmiştir.

HeLa hücrelerinde 24 saatte görülen DNA fragmentasyonu oranının, deguelin uygulanmayan kontrole göre 25, 50 ve 100 μM dozlarında sırasıyla 2,2; 4,5 ve 5,6 kat arttığı hesaplanmıştır ($p<0,001$, Şekil 4. 21).




Şekil 4.21. Seçilen deguelinin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 24 saatlik DNA fragmentasyon oranları. (K: Kontrol; ***: p<0,001).

HeLa hücrelerinde 48 saatte görülen DNA fragmentasyonu oranı ise, kontrole göre kıyaslandığında 25, 50 ve 100 µM dozlarında sırasıyla 3,5; 5,5 ve 6,3 kat arttığı saptanmıştır (p<0,001, Şekil 4.22).




Şekil 4.22. Seçilen deguelinin dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki 48 saatlik DNA fragmentasyon oranları. (K: Kontrol; ***: p<0,001).

Seçilen deguelin dozlarının hem 24 hem de 48 saatte apoptotik hücre ölümünü arttırdığı kontrol hücreleri ile kıyaslandığında tespit edilmiştir. Fragmentasyona uğrayan

DNA oranının 48 saatte daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle deguelinin hücre ölümüyle benzer şekilde doza ve zamana bağlı olarak apoptotik hücre ölümünü de arttırdığı belirlenmiştir.

Shu vd.'nin yapmış olduğu çalışmada 24 ve 48 saat süre ile uygulanan deguelinin (10, 20, 40 ve 60 nmol/L) Jurkat hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri akım sitometri, DNA fragmentasyon kiti ve Hoechst 33258 boyama yöntemleri ile doza ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarında deguelinin doza bağlı olarak Jurkat hücrelerinde apoptozu uyardığı rapor edilmiştir (Shu vd., 2008). Farklı bir çalışmada ise deguelinin premalignant ve malignant insan bronşiyal epitel hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri TUNEL, DNA fragmentasyon kiti ve Annexin V akım sitometrisi ile değerlendirilmiş ve deguelinin apoptotik hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir (Chun vd., 2003).

Lee vd., 2010 yılında yaptıkları çalışmada 24 saatte deguelinin (0,1; 1; 2,5; 5 ve 10 μM) gastrik kanser hücreleri (SNU-484) üzerindeki apoptotik etkilerini belirlemek için morfolojik olarak DAPI ve TUNEL yöntemlerini, akım sitometri analizi için ise Annexin V metodunu uygulamışlardır. Araştırma sonucunda deguelinin SNU-484 hücrelerinde G2/M fazında hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptotik hücre ölümünü uyardığını belirlemişlerdir (Lee vd., 2010).

Yapılan bu çalışmalar da göstermektedir ki; deguelin farklı hücre dizilerinde apoptotik hücre ölümünü tetiklemiştir. Çalışmamızda da bu çalışmalara benzer şekilde deguelinin HeLa hücrelerinde apoptotik etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir.

### 4.4. Deguelinin HeLa Hücreleri Gen Anlatım Düzeyleri Üzerindeki Etkileri

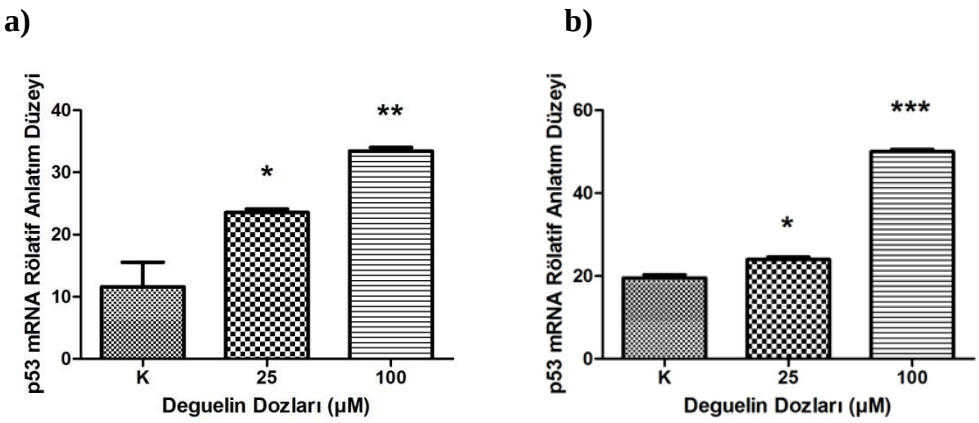
Deguelinin apoptotik etkilerinin belirlenmesinin ardından bu etkinin moleküler düzeyde hangi genler ve yolaklar üzerinden gerçekleştiğini saptamak için *TP53, SURVİVİN, FAS* ve *KASPAZ3* gen anlatım düzeyleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılmıştır.

Serviks karsinogenez sürecinde, yüksek risk oluşturan HPV tiplerinden E6'nın, TP53 proteinlerini bozarak hücre döngüsünü durdurduğu ve aynı zamanda apoptozu engelleyerek proliferasyonun kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Lagunas-Martinez vd., 2010). Yapılan araştırmalarda serviks kanseri hücrelerinde *TP53* gen anlatımının düşük olduğu ve hastalığın gelişmesinde önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir (Cardosa vd., 2017). Dolayısıyla *TP53* gen anlatım düzeyinin arttırılması serviks kanseri tedaviisnde potansiyel bir yöntem olabilir. Bu sebeple çalışmamızda HeLa hücrelerinde deguelinin *TP53* gen anlatım düzeyi üzerindeki etkisi doza ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır.

Çizelge 4.1. RT-PZR sisteminde *TP53* gen anlatım sonuçları

| **Muamele süresi** | **Doz** | **Relatif gen anlatım düzeyi (%)** | **Standart sapma** | **p değeri** |
|---|---|---|---|---|
| **24 saat** | 25 μM | 23,57 | ± 0,5608 | 0,0401 |
| | 100 μM | 33,44 | ± 0,5774 | 0,0055 |
| **48 saat** | 25 μM | 23,98 | ± 0,5774 | 0,0107 |
| | 100 μM | 50,00 | ± 0,5774 | < 0,0001 |

HeLa hücrelerine uygulanan 25 ve 100 μM deguelinin *TP53* gen anlatım düzeyini 24 saatte sırasıyla 2,04 ($p<0,05$) ve 2,89 ($p<0,01$) kat arttırdığı; 48 saatte ise sırasıyla 1,23 ($p<0,05$) ve 2,56 ($p<0,001$) kat arttırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.1;Şekil 4.23).




Şekil 4.23. Deguelinin HeLa hücrelerinde *TP53* gen anlatım düzeyleri üzerindeki etkisi. ( a) 24 saat; b) 48 saat; K: Kontrol; *:p<0,05; **: p<0,01; ***:p<0,001).

Sonuçta çalışmamızda deguelinin HeLa hücrelerinde *TP53* gen anlatımını doza bağlı olarak arttırdığı ilk kez belirlenmiştir. Bununla beraber görülen artışın ilk 24 saatte olduğu, zamana bağlı olarak etkinin artmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgularımızı destekler şekilde Eva vd. tarafından 100 nM deguelinin K562 ve U962 lösemi hücrelerinde 6 ve 24 saatteki *TP53* gen anlatım düzeyi RT-PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuçta deguelinin *TP53* gen anlatımını arttırdığını rapor edilmiştir (Eva vd., 2007).

Yapılan farklı çalışmalarda kanserli hücrelerde düşük *TP53* ekspresyonunun yanısıra yüksek *SURVİVİN* ekspresyonu belirlenmiştir. Mirza vd., tarafından *SURVİVİN* ve *TP53* arasında hem mRNA hem de protein seviyesinde ters bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Mirza vd., 2002).

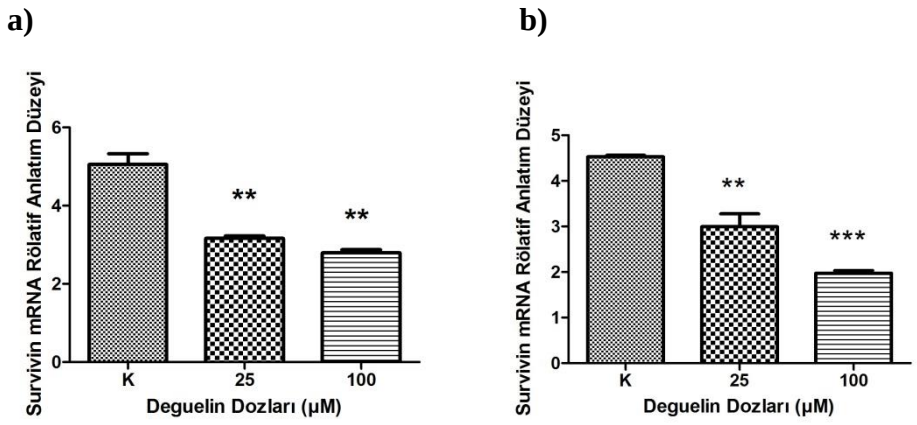
*SURVİVİN* ilk kez 1997 yılında tanımlanan apoptoz inhibitör protein (IAP) ailesinin bir üyesidir. Embriyonik ve fetal gelişim süresince ve çeşitli kanser hücrelerinde gen anlatımı bildirilmiştir. Diğer apoptoz inhibitör proteinlerin aksine *SURVİVİN*in farklılaşmış normal dokularda gen anlatımı olmadığı rapor edilmiştir (Ambrossini vd., 1997). Aynı zamanda, Espinosa vd. 2006 yılında yaptıkları çalışmada insan normal serviks hücrelerinde ve insan servikal kanser hücrelerindeki *SURVİVİN* gen anlatım düzeylerini karşılaştırmış ve sonuçta normal hücrelerde *SURVİVİN* anlatımı tespit edilemezken serviks kanser hücrelerinde açık bir şekilde *SURVİVİN* anlatımının yüksek olduğu rapor edilmiştir

(Espinosa vd., 2006). Dolayısıyla serviks kanserinde *SURVİVİN* gen anlatımının baskılanması hastalığın tedavisi için potansiyel bir yöntem olabilir. Bu sebeple çalışmamızda deguelinin HeLa hücrelerinde *SURVİVİN* gen anlatım düzeyi üzerindeki etkisini doza ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır.

Çizelge 4.2. RT-PZR sisteminde *SURVİVİN* gen anlatım sonuçları

| **Muamele süresi** | **Doz** | **Relatif gen anlatım düzeyi (%)** | **Standart sapma** | **p değeri** |
|---|---|---|---|---|
| **24 saat** | 25 μM | 3,16 | ± 0,05781 | 0,0024 |
| | 100 μM | 2,79 | ± 0,08095 | 0,0013 |
| **48 saat** | 25 μM | 3,00 | ± 0,2838 | 0,0059 |
| | 100 μM | 1,97 | ± 0,05779 | < 0,0001 |

HeLa hücrelerine uygulanan 25 ve 100 μM deguelinin *SURVİVİN* gen anlatım düzeyini 24 saatte sırasıyla 1,5 ($p<0,01$) ve 1,8 ($p<0,01$) kat azalttığı; 48 saatte ise sırasıyla 1,5 ($p<0,05$) ve 2,3 ($p<0,001$) kat azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2; Şekil 4.24).




Şekil 4.24. Deguelinin HeLa hücrelerinde survivin gen anlatım düzeyleri üzerindeki etkisi. ( a) 24 saat; b) 48 saat; K: Kontrol; **: $p<0,01$; ***:$p<0,001$).

Sonuç olarak çalışmamızda, deguelinin HeLa hücrelerindeki *SURVİVİN* gen anlatım düzeyini doza bağlı olarak azalttığı, fakat zamana bağlı olarak anlamlı bir değişiklik yapmadığı saptanmıştır.

Benzer şekilde Peng vd. meme kanseri hücre dizileri (SK-BR-3 ve MCF-7) üzerinde deguelinin hücre çoğalmasını baskılayıcı ve apoptotik etkilerini araştırmışlar ve deguelinin meme kanser hücrelerinde seçici bir şekilde çoğalmayı baskıladığı ve apoptozu uyardığını belirlemişlerdir. Ardından RT-PZR yöntemi ile 10-100 nM deguelinin meme kanseri hücrelerinde *SURVİVİN* gen anlatım düzeyini azaltarak apoptozu uyardığını rapor etmişlerdir (Peng vd., 2007).

Ito vd.'nin 2010 yılında yaptığı başka bir çalışmada ise, deguelinin insan lösemi hücrelerinde (KUT-1 ve MT-2 hücre dizileri) RT-PZR yöntemiyle *SURVİVİN* gen anlatımını azaltarak hücre çoğalmasını baskıladığı bildirilmiştir (Ito vd., 2010). Farklı bir çalışmada ise Jin vd., deguelinin akciğer karsinogenezi boyunca insan bronşiyal epitel hücrelerin malignant hücrelere dönüşümünde *SURVİVİN* anlatımının uyarılmasını araştırmışlardır. Sonuçta *SURVİVİN*'in premalignant ve malignant HBE ve NSCLC hücrelerinin yaşamsal ve tümörijenik potansiyelinde kritik role sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışma bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemesinin yanında birde, deguelinin *SURVİVİN* gen anlatımını azaltmasının, sadece genetik düzeyde değil protein seviyesinde de western blot yöntemini uygulayarak ölçülebildiğini göstermesi açısından da önem arz etmektedir (Jin vd., 2007).

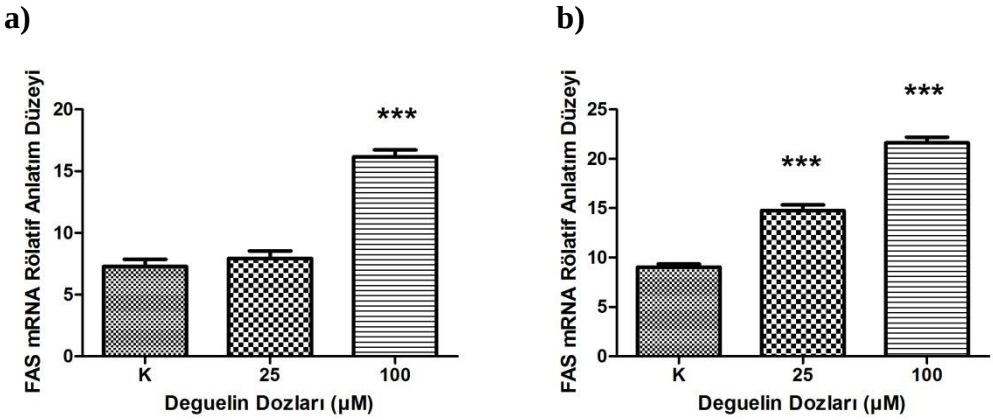
Hücrede, apoptoz yolakları ve düzenlenmesiyle ilgili pek çok mekanizma olduğu ve bunların birbirleriyle farklı ilişkiler içinde olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin Müller vd. 1998 yılında yaptıkları çalışmada *FAS* reseptör geninin ilk intronunda *TP53* duyarlı bir bölge tanımlanmış ve *FAS* reseptör anlatımının arttırılması için *TP53* anlatımının da gerekli olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada FAS yolağını aktive eden antikanser ilaçların etkisini gösterebilmesi için TP53 anlatımının da gerekli olduğu belirtilmiştir (Müller vd., 1998). Ayrıca serviks karsinogenez sürecinde etkili HPV'nin E5 geni aracılığıyla apoptotik hücre ölümünün FAS yolağını baskıladığı bildirilmiştir (Fuantes-Gonzales vd., 2013). Bunun dışında Das vd. 2000 yılında yayınladıkları araştırmada içinde serviks kanserinin de bulunduğu jinekolojik kanserlerde *FAS* gen

anlatım düzeyinin düşük *FASL* gen anlatım düzeyinin ise yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Das vd., 2000). Yani, serviks kanserinin gelişmesinde FAS aracılı apoptozun baskılanması, *FASL* ekspresyonu ile değil *FAS* reseptör ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda farklı bir çalışmada ise; serviks kanserinin oluşması ve gelişmesi sürecinde, *SURVİVİN* ve *FASL* ekspresyonunun arttığı fakat *FAS* ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Wu vd., 2012) Dolayısıyla serviks kanserinin tedavisi için apoptotik yolağın uyarılmasında *FAS* gen anlatımının arttırılması potansiyel bir yöntem olabilir. Bu sebeple çalışmamızda deguelinin HeLa hücrelerindeki *FAS* gen anlatım düzeylerine etkisini araştırılmıştır.

Çizelge 4.3. RT-PZR sisteminde *FAS* gen anlatım sonuçları

| **Muamele süresi** | **Doz** | **Relatif gen anlatım düzeyi (%)** | **Standart sapma** | **p değeri** |
|---|---|---|---|---|
| **24 saat** | 25 μM | 7,93 | ± 0,6176 | 0,4803 |
| | 100 μM | 16,15 | ± 0,5774 | 0,0004 |
| **48 saat** | 25 μM | 14,76 | ± 0,5774 | 0,0009 |
| | 100 μM | 21,61 | ± 0,5774 | < 0,0001 |

HeLa hücrelerine uygulanan 25 ve 100 μM deguelinin FAS gen anlatım düzeyini 24 saatte sırasıyla 1,1 ($p>0,05$) ve 2,2 ($p<0,001$) kat arttırdığı; 48 saatte ise sırasıyla 1,6 ($p<0,001$) ve 2,4 ($p<0,001$) kat arttırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3; Şekil 4.25).




Şekil 4.25. Deguelinin HeLa hücrelerinde FAS gen anlatım düzeyleri üzerindeki etkisi. ( a) 24 saat; b) 48 saat; K: Kontrol; ***:p<0,001).

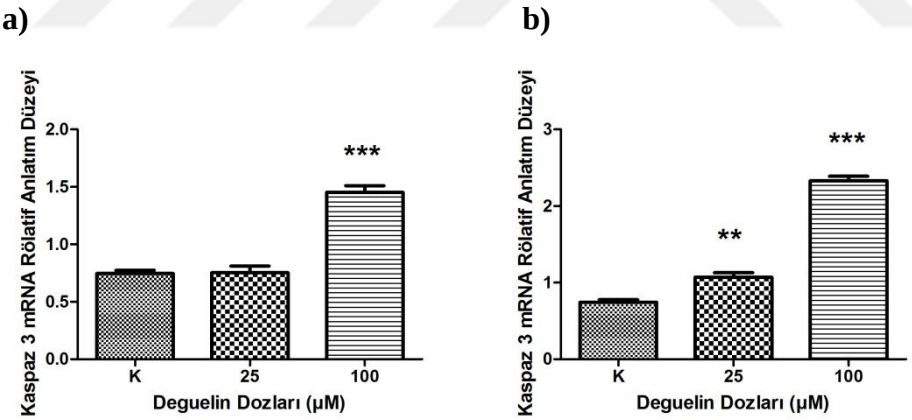
Sonuçlarımıza göre deguelinin HeLa hücrelerinde, *FAS* gen anlatım düzeyini doza bağlı olarak arttırdığı ilk kez belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırmasında deguelinin *FAS* gen anlatım düzeyleri üzerindeki etkilerine dair herhangi bir araştırmaya rastlanamamıştır. Dolayısıyla çalışmamız deguelinin HeLa hücrelerinde dış apoptotik yolağın başlatılmasından sorumlu TNF ailesi üyelerinden biri olan *FAS* gen anlatım düzeyini arttırdığını göstermesi açısından önemlidir.

KASPAZ3 apoptozun önemli belirteçlerinden biri olup, spesifik hücre içi substratları keserek apoptozun ilerletilmesinden sorumludur. Son olarak çalışmamızda, deguelinin HeLa hücrelerinde ilerletici *KASPAZ3* gen anlatım düzeyi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

Çizelge 4.4. RT-PZR sisteminde *KASPAZ3* gen anlatım sonuçları

| **Muamele süresi** | **Doz** | **Relatif gen anlatım düzeyi (%)** | **Standart sapma** | **p değeri** |
|---|---|---|---|---|
| **24 saat** | 25 μM | 0,75 | ± 0,05783 | 0,9157 |
| | 100 μM | 1,45 | ± 0,05779 | 0,0004 |
| **48 saat** | 25 μM | 1,07 | ± 0,05776 | 0,0076 |
| | 100 μM | 2,33 | ± 0,05777 | < 0,0001 |

Deguelinin 25 ve 100 μM dozlarının *KASPAZ3* gen anlatım düzeyini 24 saatte sırasıyla 1,0 ($p>0,05$) ve 2,0 ($p<0,001$) kat arttırdığı; 48 saatte ise sırasıyla 1,4 ($p<0,01$) ve 3,1 ($p<0,001$) kat arttırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4; Şekil 4.26).




Şekil 4.26. Deguelinin HeLa hücrelerinde *KASPAZ3* gen anlatım düzeyleri üzerindeki etkisi. ( a) 24 saat; b) 48 saat; K: Kontrol; **: $p<0,01$; ***:$p<0,001$).

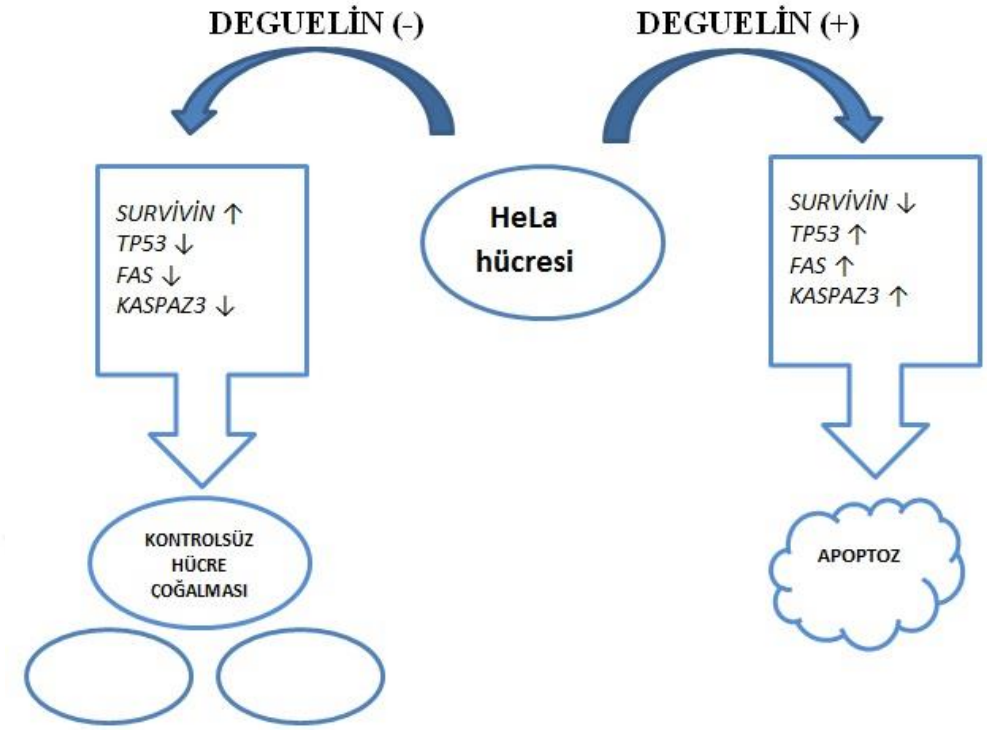
Çalışmamızın sonuçlarında, deguelinin HeLa hücrelerinde *KASPAZ3* gen anlatım düzeyini doza ve zaman bağlı olarak arttırdığı ilk kez belirlenmiştir.

Benzer şekilde Ito vd. yaptığı çalışmada immünblot yöntemiyle deguelinin KUT-1 ve MT-2 hücrelerinde kesilmiş (clevaged) kaspaz 3 seviyesi araştırılmıştır. Sonuçta

deguelinin en az 24 saatte KUT-1 ve MT-2 hücrelerinde KASPAZ3 kesilmesi yoluyla apoptozu uyardığı rapor edilmiştir (Ito vd., 2010). Farklı bir çalışmada ise Lee vd. mide kanseri (SNU-484) hücrelerinde western blot yöntemi ile deguelinin KASPAZ9 ve KASPAZ3 yolakları üzerinden apoptozu uyardığını bildirmişlerdir (Lee vd., 2010). Bu sonuçlar bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Ancak, Peng vd. deguelin ile muamele edilen insan meme kanserli hücrelere (SK-BR-3 ve MCF-7) kaspaz aktivite ölçümü yapmışlardır. Sonuçta deguelinin yalnız başına KASPAZ3 aktivitesini arttırmadığı, fakat dokdorobisin ve doksateksel ile birlikte kombine şekilde uygulandığında kemoterapötik ajanların KASPAZ3 aktivitelerini çok arttırdığını bildirmişlerdir. Sonuçta deguelinin meme kanserli hücrelerin kemoterapötik ajalara karşı duyarlılığını zenginleştirdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamız ile bu sonuçlar birbirini tamamen desteklememektedir. Çünkü bizim sonuçlarımızda deguelinin Hela hücrelerinde *KASPAZ3* gen anlatım düzeyini arttırdığı belirlenmiş fakat bu çalışmada deguelinin meme kanserli hücrelerde *KASPAZ3* aktivitesini arrtırmadığı bildirilmiştir. Çalışmalar arasındaki bu farklılık öncelikle kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanabilir. Aynı zamanda denenen hücreler de birbirinden farklıdır. Her hücre grubunda farklı ajanlarla farklı mekanizmalar aktifleşebilir. Yani HeLa hücrelerinde deguelinin etki mekanizması *KASPAZ3* üzerinden, meme kanseri hücrelerinde ise farklı bir mekanizma üzerinden gerçekleşebilir. Bunun yanı sıra kaspaz enzimlerinin aktivasyonları hızlı bir şekilde gerçekleşip kısa süre içinde kaspazların inaktif olduğu bilinmektedir. Bu yüzden çalışmada belki de kaspazların aktif olduğu süre yakalanamamış olabilir.

Tüm verilerimiz değerlendirildiğinde, çalışmamızda deguelinin doza ve zamana bağlı olarak HeLa hücre çoğalmasını baskıldığı, HeLa hücrelerinde morfolojik değişikliklere sebep olduğu ve DNA fragmentasyonunu arttırarak apoptozu uyardığı ilk kez belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, deguelinin HeLa hücrelerinde *SURVİVİN* gen anlatım düzeyini azalttığı, *TP53, FAS* ve *KASPAZ3* gen anlatım düzeyini ise arttırdığı ilk kez gösterilmiştir (Şekil 4.27).




Şekil 4.27. Deguelinin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin olası mekanizması

Sonuçta, serviks kanserinin gelişmesi ve ilerlemesinde kritik öneme sahip yüksek *SURVİVİN* gen anlatımı deguelin sayesinde azalmıştır. Ayrıca yine serviks karsinogenez sürecinde anahtar rol oynayan düşük *TP53, FAS* ve *KASPAZ3* gen anlatımları ise artmıştır. Deguelinin HeLa hücrelerinde apoptozu uyarması *SURVİVİN*, *TP53, FAS* ve *KASPAZ3* gen anlatımlarını yeniden düzenlenmesi ve birbirleriyle etkileşimleri sayesinde gerçekleşmiştir.

# 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser, hala tüm dünyada en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Teknolojik gelişmelere ve araştırmalara rağmen hala teşhis ve tedavisinde tam olarak sonuç alınamamakta ve bu nedenle ölümle sonuçlanan hastalıklar grubunun başında gelmektedir. Kadınlarda en sık görülen kanser türleri içerisinde serviks kanseri dördüncü sırada yer almaktadır. Farklı tedavi yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen hastalığın tedavi edilme oranlarına bakıldığında yeterli düzeyde olmadığı görülmektedir. Bu nedenle hastalığın tedavisinde daha etkili, yan etkileri az yeni kimyasal maddelerin/ajanların arayışı halen devam etmektedir.

Bitkilerin yapılarında bulundurdukları farklı madde ve metabolitler sayesinde değişik kanser hücre dizilerinin çoğalmasını baskıladığı yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur. Günümüzde pek çok araştırmacı bu tip maddeleri izole ederek sitotoksik etkilerini araştırmaktadır.

Bizde çalışmamızda, bitkisel kökenli deguelin maddesinin HeLa hücre dizisi üzerindeki doza ve zamana bağlı antiproliferatif etkilerini MTT yöntemi ile araştırdık. Ardından deguelinin HeLa hücre morfolojisi üzerindeki etkilerini ters ışık mikroskobu yardımıyla görüntüledik. Deguelinin HeLa hücrelerindeki apoptotik etkilerinin araştırılması için DNA fragmentasyon ELISA yöntemini kullandık. Son olarak da, deguelinin HeLa hücrelerinde *TP53, SURVİVİN, FAS* ve *KASPAZ3* gen anlatım düzeyleri üzerindeki etkisini RT-PZR yöntemi ile araştırdık.

Deguelinin doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik, morfolojik ve apoptotik hücre ölümünü arttırdığı ilk kez belirlenmiştir. Bununla beraber apoptozla bağlantılı 4 farklı gen anlatım düzeyinin de doza bağlı olarak *SURVİVİN* de azalma; *TP53, FAS* ve *KASPAZ3* genlerinde ise artma şeklinde yeniden düzenlendiği ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca 2 farklı kemoterapötik ajanla karşılaştırıldığında deguelinin HeLa hücrelerinde daha güçlü sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ilk kez incelenmiştir.

Farklı çalışmalarla deguelinin normal serviks hücreleri üzerindeki sitotksik ve apoptotik etkilerinin de araştırılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Ayrıca deguelinin farklı kemoterapötik ilaçlarla kombine olarak verilmesi ile kemoterapötik ajanların etkinliğini artırıp arttırmadığı başka bir araştırma konusu olabilir.

Bunun dışında çalışmamızda deguelinin gen anlatım düzeyleri üzerinde etkili olduğu belirlenen genlerin, aktif proteinlere dönüşüp dönüşmediğinin belirlenmesi için protein düzeylerindeki etkilerinin de araştırılması faydalı olabilir.

Çalışmamızda *TP53* ve *FAS* gen anlatımlarının birlikte artmasının serviks kanserinin tedavisi için umut verici olmasıyla birlikte deguelinin moleküler mekanizmasını çözmek için farklı gen anlatım ifadelerinin ve bunların birbirleriyle etkileşimlerinin ileri metodlarla araştırılması çalışmaya açık bir konudur.

Deguelinin güçlü hücre çoğalmasını baskılayıcı ve apoptotik etkilere sahip olmasından dolayı kemoterapötik ilaç olarak geliştirilebilir olduğunu düşünmekteyiz.

Dahası serviks karsinogenez sürecinde HPV tarafından baskılanan *TP53* gen anlatımının deguelin tarafından arttırılması, deguelinin serviks kanserinin oluşma ve/veya gelişme sürecinde kemopreventif etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple deguelinin serviks kanseri için kemopreventif etkilerinin de araştırılmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Verilerimizin serviks kanseri ile ilgili ileride yapılacak olan çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, apoptotik moleküler mekanizmaların geliştirilerek yeni tedavi stratejileri tasarlanmasına öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

# KAYNAKLAR DİZİNİ

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002, The Cell, Garland Science, p.1313-1363.

Alison, M.R., 2001, Cancer, Nature publishing group, p 1-8.

Ambrossini, G., Adida, C., Altieri, D., 1997, A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma, Nature medicine, 3, 917-921.

Andrea, B., Anderson, T.M-L., Lambert, P.C., Kemetli, L., Silfverdal, L., Strander B., Ryd, W., Di,llner, J., Törnberg, S., Sparen, P., 2012, Screening and cervical cancer cure: population based cohort study, doi: 10.1136/bmj.e900.

Atkin-Smith, G.K. ve Pooni I.K.H., 2017, Disassembly of the dying: mechanism and functions, Trends in cell biology, 27(2), 151-162.

Aydıner, A., Aslay, I., Berkman, S., 2016, Jinekolojik tümörler el kitabı tanı-tedavi-takip, Nobel tıp kitabevi, s69-88.

Berridge, M.J., 2014, Cell signaling biology, modüle 9, p 1-45.

Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S., 2005, Tetrazoliun dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, Biotechnology annual review, 5, 127-152.

Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Tavirniers, I., Mazzara, M., Roosens, N., Morisset, D., 2014, Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods, Trends in food science & technology, 37, 115-126.

Cadart, C., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Berre, M.L., Piel, M., Matthews, H.K., 2016, Exploring the function of cell shape and size during mitosis, Developmental cell, 29, 159-169.

Cadron, I., Gorp, T.V., Amant, F., Leunen, K., Neven, P., Vergote, I., 2007, Chemotherapy for recurrent cervical cancer, Gynocologic oncology, 107, 113-118.

Cao, W., Li, X.-Q., Wang, X., Fan, H.-T., Zhang, X.-T., Hou, Y., Liu, S.-B., Mei, Q.-B., 2010, A novelpolysaccharide isolatedfrom Angelica sinensis (Oliv.) Dielsinduces the apoptosisofcervicalcancerHeLacellsthroughanintrinsicapoptotic pathway, Phtomedicine, 17, 598-605.

Cardosa, M.F.S., Castelletti, C.H.M., Lima-Filho, J.L., Martins, D.B.G., Teixeira, J.A.C., 2017, Putative biomarkers for cervical cancer: SNVs, methylation and expression profiles, Mutation research, 773, 161-173.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Catalano, M.G., Fortunati, N., Pugliese, M., Costantino, L., Poli, R., Bosco, O., Boccuzzi, G., 2004, Valproic Acid Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Poorly Differentiated Thyroid Cancer Cells, The journal of metabolism endocrinology, 90(3), 1383-1389.

Caverly, W., 2012, The immortal life of Henrietta Lacks, Research management review, 19(1), 1-2.

Chang, H.Y. ve Yang, X., 2000, Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases, Microbiology and molecular biology reviews, 821-846.

Chelimo, C., Wouldes, T.A., Cameron, L.D., Elwood, J.M., 2013, Risk factors for and prevention of human papillomavirus (HPV), genital warts and cervical cancer, Journal of infection, 66, 207-217.

Chen, Y., Wu, Q., Cui, G., Chen, Y., Li, R., 2009, Deguelin blocks cells survival signal pathways and induces apoptosis of HL-60 cells in vitro, International Journal of hematology, 89, 618-623.

Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, B.K., 2008, Caspases – an update, Comparative biochemistry and physiology, 151, 10-27.

Chun, K-H., Kosmeder, II JW., Sun, S., Pezzuto, J.M., Lotan, R., Hong, W.K., Lee, H-Y., 2003, Effects of deguelin on the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells, Journal of the national cancer institute, 95, 291-302.

Cichorek, M., 2008, Mechanism of tumor's cell ability to avoid apoptosis, Dermatologia estetiyczina, 10(6), 1-9.

Coleman, W.B. ve Tsongalis, G.J., 2006, Molecular mechanism of human carcinogenesis, Cancer, 321-349.

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

Curtin, J.F. and Cotter, T.G., 2003, Live and let die: regulatory mechanism in Fas-mediated apoptosis, Cellular signaling, 15, 983-992.

Das, H., Koizumi, T., Chakraborty, S., Ichimura, T., Hasegawa, K., Nishimura, R., 2000, Quantitation of Fas and Fas ligand gene expression in human ovarian, cervical and endometrial carcinomas using real-time quantitative RT-PCR, British journal of cancer, 82(10), 1682-1688.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Dempsey, P.W., Doyle, S:E., He, J.Q., Cheng, G., 2003, The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily, Cytokine & Growth factor reviews, 14, 193-209.

Donepudi, M. Ve Grutter, M.G., 2002, Structure and zymogen activation of caspases, Biophysical Chemistry, 102, 145-153.

Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P., 2009, Major cell death pathways at a glance, Microbes and infection, 11, 1050-1062.
Elliot, M.R. ve Ravichandran, K.S., 2016, The Dynamics of apoptotic cell clearance, Developmental cell, 38, 147-160.

Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, Toxicology and pathology, 35(4), 495-516.

Espinosa, M., Cantu, D., Herrera, N., Lopez, C.M., De la Garza, J.G., Maldonado, V., Melendez-Zajgla J., 2006, Inhibitors of apoptosis proteins in human cervical cancer, Biomed central cancer, 6(45), 1-10.

Eva, R.D., Ambrosini, C., Minghelli, S., Noonan, D.M., Albini, A., Ferrari, N., 2007, The Akt inhibitör deguelin, is an angiopreventive agent also acting on tha NFκB pathway, Carcinogenesis, 28(2), 404-413.

Freshney, R.I., 2000, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3rd edition; Wiley-Liss, New York.

Galluzzi, L., Vitale, I., et al., 2018, Molecular mechanism of cell death: recommendations of the Nomenclature Committe on cell death 2018, Cell Death & Differantiation, doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.

Garewal, H.S. ve Meyskens, F.L., 1991, Chemoprevention of cancer, Hematology oncology clinics of North America, 5, 69-77.

Garrett, M.D., 2001, Cell cycle control and cancer, Current science, 81, 515-522.

Gewies, A., 2003, Introduction to apoptosis, Aporeview, 1-26.

Ghatage, D.D., Gosavi S.R., Ganvir S.M., Hazarey V.K., 2012, Apoptosis: molecular mechanism, Journal of orofacial science, 4(2), 103-107.

Hafeez, S., Urooj, M., Saleem, S., Gillani, Z., Shaheen, S., Qazi, M. H., Naseer, M.I., Iqbal, Z., Ansari, S.A., Haque, A., Asif, M., Mir, M.A., Ali, A., Pushparaj, P.N., Jamal, M.S., Rasool, M., 2016, BAD, a Proapoptotic Protein, Escapes ERK/RSK Phosphorylation in Deguelin and siRNA-Treated HeLa Cells, Plos one, 11(1), 1-9.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hail, N. Ve Lotan, R., 2004, Apoptosis induction by the natural product cancer chemopreventive agent deguelin is mediated through the inhibition of mitochondrial bioenergetics, Apoptosis, 9(3), 437-447.

Harrington, K.J., 2015, The biology of cancer, Cancer biology and imaging, 44(1), 1-5.

International cancer research on cancer, 2013, Latest world cancer sytatiscs, World Health Organization, p 1-3.

Ito, S., Oyake, T., Murai, K., Ishida, Y., 2010, Deguelin supresses cell proliferaion via the inhibition of survivin expression and STAT3 phosphorylation in HTLV-1-transformed T cells, Leukemia research, 34, 352-357.

Jin, Q., Feng, L., Behrens, C., Bekele, B.N., Wistuba, I.I., Hong, W.-K., Lee, H.-Y., Implication of AMP-Activated protein kinase and Akt-Regulated survivin in lung cancer chemopreventive activitied of deguelin, Cancer research, 67, 11630-11639.

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

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.L., Currie, A.R., 1972, British journal of cancer, Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics, 26, 239-257.

Kiraz, Y., Adan, A., Yandim M.K., Baran, Y., 2016, Major apoptotic mechanism and genes involved in apoptosis, Tumor biology, 37, 8471-8486.

Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, A., Nagata, S., Melino, G., 2005, Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death, Cell death and differantiation, 12, 1463-1467.

Lagunas-Martinez, A., Madrid-Marina, V., Gariglio, G., 2010, Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer, Biochimia et biophysica acta, 1805, 6-16.

Lee, H., Lee, J-H., Jung, KH., Hong, S-S., 2010, Deguelin promotes apoptosis and inhibits angiogenesis of gastric cancer, Oncology reports, 24, 957-963.

Lee, H.-Y., 2004, Molecular mechanisms of deguelin-induced apoptosis in transformed human bronchial epithelial cells, Biochemical Pharmacology, 68, 1119–1124.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Lee, H.Y., Suh, Y.A., Kosmeder J.W., Pezzuto, J.M., Hong, W.K., Kurie, J.M., 2004, Deguelin-induced inhibition of cyclooxygenase-2 expression in human bronchial epithelial cells, Clinical cancer research, 10, 1074-1079.

Lee, J.-H., Lee, D.-H., Lee, H.-S., Choi, J.-S., Kım, K.-W., Hong, S.-S., 2008, Deguelin inhibits human hepatocellular carcinoma by antiangiogenesis and apoptosis, Oncology Reports, 20, 129–134.

Li, J. ve Yuan, J., 2008, Caspasses in apoptosis and beyond, Oncogene, 27, 6194-6206).

Li, R., Chen,Y., Shu, W.-X., Chen Z., Ke, W.-J., 2009, Involvement of SRC-3 in deguelin-induced apoptosis in Jurkat cells, ınternational journal of hematology, 89, 628-635.

Liu, H-l., Chen, Y., Cui, G-h., Wu, Q-l., He, J., Chen, W-i., Zhou, J-f., 2005, Deguelin regulates nuclear pore complex proteins Nup98 and Nup88 in U937 cells in vitro, Acta pharmacologica sinica, 26(10), 1265-1273.

Lockseley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., 2001, The TNF and TNF reseptor superfamilies: Integrating mammalian biology, 104, 487-501.

Lockshin, R.A. ve Williams, C.M., 1964, Journal of insect physiology, Programmed cell death-II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths, 10, 643-649.

Louie, K.S., de Sanjose, D., Diaz, M., Castellsague, X., Herrero, R., Meijer, M.J., Shah, K., Franceschi, S., Munoz, N., Bosch, F.X., 2009, British journal of cancer, 100, 1191-1197.

Manzo-Merino, J., Contreras-Paredes, A., Vanquez-Ulloa, E., Rocha-Zavaleta, L., Fuantez-Gonzalez, A.M., Lizano, M., 2014, The Role of Signaling pathways in cervical Cancer and molecular therapeutic targets, Archives of Medical Research, 45, 525-239.

Merlo, L. M. F., Pepper, J.W., Reid, B.J., Maley, C.C., 2006, ancer is a evolutionary and ecological process, Nature reviews cancer, 6, 924-935.

Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T.N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., Wen, S.F., Wang, L., Kirschmeier, P., Bishop, W.R., Nielsen, L.L., Pickett C.B., Liu, S., 2002, Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway, Oncogene, 21, 2613-2622.

Mita, A.C., Mita, M.M., Nawrocki, S.T., Giles, F.C., 2008, Survivin: key regulators of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics, 14(16), 5000-5005.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Mocellin, S., Rossi, C.R., Pilati, P., Nitti, D., Marincola, F.M., 2003, Quantative real time PCR; a powerful ally in cancer research, Trends in molecular medicine, 9(5), 189-195.

Mohamed, M.S., Bishr, M.K., Almutairi, F.M., Ali, A.G., 2017, Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer, Apoptosis, 22, 1487-1509).

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

Murillo, G., Peng, X., Torres, K.E.O., Mehta, R.G., 2009, Deguelin Inhibits Growth of Breast Cancer Cells by Modulating the Expression of Key Members of the Wnt Signaling Pathway, Cancer Prevention Research, 2(11), 942–950.

Murillo, G., Salti, G.I., Kosmeder, J.W., Pezzuto, J.M., Mehta, R.G., 2002, Deguelin inhibits yhe growth of colon cancer cells through the induction of apoptosis and cell cycle arrest, 38, 2446-2454.

Müller, M., Wilder, S., Bannash, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, G., Oren, M., Krammer, P.H., 1998, p53 activates the CD95(APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs, Journal of experimental medicine, 188(11), 2033-2045.

Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S., 2009, Natural compounds for cancer treatment and prevention, Pharmocological research,59, 365-378.

Oh, S.H., Woo, J.K., Yazici-Dakak, Y., Myers, J.N., Kim, W.-Y., Jin, Q., Hong, S.S., Park, H.-J., Suh, Y.-G., Kim, K.-W., Hong, W.K., Lee, H.-Y., 2007, Structural Basis for Depletion of Heat Shock Protein 90 Client Proteins by Deguelin, Journal of the National Cancer Institute, 99, 949-961.

Paluch, E., Heisenberg, C.-P., 2009, Biology and Physics of cell shapes in devolepment, Current biology, 19, 790-799.

Pectaides, D., Kamposioras, K., Papaxoinis, G., Pectasides, E., 2008, Chemotherapy for recurrent cervical cancer, Cancer treatment reviews, 34, 603-613.

Peery, R.C., Liu, J.Y., Zhang, J.T., 2017, Targeting survivin for theurapeutic discovery: pasti present and future promises, Drug discovery today, 22(10), 1466-1477.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Peng, X.-H., Karna, P., O'Regan, R.M., Liu, X., Naithani, R., Moriarty, R.M., Wood, W.C., Lee, H.-Y., Yang, L., 2007, Down-Regulation of Inhibitor of Apoptosis Proteins by Deguelin Selectively Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells, Molecular Pharmacology, 71, 101–111.

Pihan, P., Carreras-Sureda, A., Hetz, C., 2017, Bcl-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demişe, Cell death and differantiation, 14, 1478-1487.

Poon, I.K.H., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Ravichandran, R.S., 2014, Apoptotic cell clearence: basic biology and therapeutical potential, Nature, 14, 166-180.

Sabuncuoğlu, S. ve Özgüneş, H., 2010, Sisplatin toksisitesi: Oksidatif stresin önemi ve antioksidanların etkisi, İstanbul üniversitesi tıp fakültesi dergisi, 73(3), 18-25.

Saikumar, P., and Venkatachalam, M.A., 2009, Apoptosis and cell death, Basic consepts of molecular pathology, 29-40.

Sankari, S.L., Masthan K.M.K., Babu, N.A., Bhattacharjee, T., Elumalai, M., 2012, Apoptosis in cancer – An update, Asian pasific cancer journal prevention, 13(10), 4873-4878.

Shu, W., Chen, Y., Wu, Q., Li, R., Cui, G., 2008, Deguelin represses both the expression of nucleophosmin and some nucleoporins: Nup88 and Nup214 in Jurkat cells, Biological and pharmaceutical bulletin, 31(1), 27-32.

Stockerta, J.C., Blazquez-Castroa, A., Canetea, M., Horobinb,R.W., Villanuevaa, A., 2012, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, Acta Histochemica, (114), 785– 796.

Suhaili,S.H, Karimian, H., Stellato, M., Lee, T-H., Aguilar, M.I., 2017, Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization, Biophysical reviews, 9, 443-457.

Suzuki, A., Ito, T., Kawano, H., Hayashida, M., Hayasaki, M., Tsutomi, Y., Akahane, M., Nakano, M., Miura, M., Shiraki, K., 2000, Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death, Oncogene, 19, 1346-1354.

Taatjes, D.J., Sobel, B.E., Budd, R.C., 2008, Morphological and cytochemical determination of cell death, Histochemical cell biology, 129, 33-43.

Thery, M., ve Bornens, M., 2006, Cell shape and cell division, Current opinion in cell biology, 18, 648-657).

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tummers, B. ve Van Der Burg, S.H., 2015i High-risk human papillomavirus targets crossroads in immun signaling, 7, 2485-2506.

Udeani, G.O,, Gerhäuser, C., Thomas, C.F., Moon, R.C., Kosmeder, J.W., Kinghorn, A.D., Moriarty. R.M., Pezzuto. J.M., 1997, Cancer Chemopreventive Activity Mediated by Deguelin, a Naturally Occuring Rotenoid, Cancer Research, 57, 3424-3428.

Udeani, G.O., Zhao, G.-M., Shin, Y.G., Kosmeder II, J.W., Beecher, C.W.W., Kinghorn, A.D., Moriarty, R.M., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., 2001, Pharmacokinetics of deguelin, a cancer chemopreventive agent in rats, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 47, 263-268.

Vallonen, K.-S., Honkakoski, P., Urtti, A., 2004, Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity, European Journal of Pharmaceutical Sciences, (23), 181–188.

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

Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003, Non-apoptotic Fas signaling, Cytokine & Growth factor reviews, 14, 53-66.

Wiens, G.D. and Glenney G.W., 2011, Origin and evolution of TNF and TNF reseptor superfamilies, 35, 1324-1335.

World Health Organization, 2014, Compherensive cervical cancer control a guide to essential practise, p25-47.

Wu, H., Medeiros, M.J., Young, K.H., 2018, Apoptosis signaling and Bcl-2 pathways provide oppurtinities for novel targeted therapeutic strategies in hematologic malignances, Blood reviews, 32, 8-28.

Wu, S.-F., Zhang, J.-W., Qian, W.-Y., Yang, Y.-B., Liu, Y., Dong, Y., Zhang, Z.B., Zhu, Y.-P., Feng, Y.-J., 2012, Altered expression of survivin, Fas and FasL contributed to cervical cancer development and metastasis, European review of medical and pharmacological science, 16, 2044-2050.

Yan, Y., Wang, Y., Tan, Q., Lubet, R.A., You, M., 2005, Efficacy of Deguelin and Silibinin on Benzo(a)pyrene-Induced Lung Tumorigenesis in A/J Mice, Neoplasia, 7(12),1053-1057.

Yi, T., Li, H., Wang, X., Wu, Z., 2008, Enhancment radiosensitization of breast cancer cells by deguelin, Cancer biotherapy & Radiopharmaceuticals, 23(3), 355-362.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yuan, S. ve Akey, C.W., 2013, Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation, Structure review, doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024, 501-515.

Zamaraev, A.V., Kopeine, G.S., Prokhorova, E.A., Zhivotovsky, B., Lavrik, I.A., 2017, Post translational modification of caspases: The other side of apoptosis regulation, Trends in cell biology, 27(5), 322-339.