

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLONUN C6 GLİOMA HÜCRE HATTINDAKİ SİTOTOKSİK,  
APOPTOTİK VE ANTI-PROLİFERATİF ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ

**Ekin BEKTAŞ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Ocak, 2022

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLONUN C6 GLİOMA HÜCRE HATTINDAKİ SİTOTOKSİK,  
APOPTOTİK VE ANTI-PROLİFERATİF ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ

Ekin BEKTAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 12.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU  
Yıldız Teknik Üniversitesi  
Danışman

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU, Danışman  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN, Üye  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Emre TEPELİ, Üye  
İstanbul Atlas Üniversitesi

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Danışmanım Prof. Dr. M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Juglonun C6 Glioma Hücre Hattındaki Sitotoksik, Apoptotik ve Anti-Proliferatif Etkilerinin İncelenmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ekin BEKTAŞ

İmza



*Aileme  
ve  
biricik eşime*

## TEŞEKKÜR

---

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni her konuda yönlendiren, bilgi ve sevgisini esirgemeyerek bana sürekli destek olan danışman hocam, Sayın Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU'na,

Tezimi iyileştirmem ve düzenlememde bana yardımcı olduğu ve aynı zamanda laboratuvarında yaşadığım sorunlarda desteklerini sunduğu için Arş. Gör. Mine KUÇAK'a,

En büyük destekçim, eşim Firuze ÜNLÜ BEKTAŞ'a,

Çalışmalarımızda karşılıklı bilgi alışverişi yaptığımız ve yardımlaştığımız Tolga ÖNTÜRK'e,

Tezin qPCR aşamasında yardımlarını esirgemedikleri için tüm Next Genetic Center, Moleküler Biyoloji Bölümü'ne,

Tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini yanımda hissettiğim Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümündeki değerli bilim insanlarına,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ekin BEKTAŞ

# İÇİNDEKİLER

<b>SİMGE LİSTESİ</b>	<b>vii</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b>	<b>vii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>ix</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>ÖZET</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiii</b>
<b>1 GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı .....	2
1.3 Hipotez .....	2
<b>2 GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1 Kanser Nedir .....	3
2.1.1 Onkogenomik .....	4
2.1.2 Kanser Tedavisi .....	6
2.2 Juglon .....	7
2.3 C6 Rat Glioma Hücre Hattı .....	10
2.4 MTT .....	11
2.5 WST-1 .....	12
2.6 Koloni Formasyon Testi.....	13
2.7 Yara İyileşme Testi .....	13
2.8 DAPI Boyama .....	14
2.9 RT-qPCR Yöntemi .....	14
2.10 RT-qPCR Yönteminde Kullanılan Genler .....	15
<b>3 MATERYAL VE METOT</b>	<b>17</b>
3.1 Materyal.....	17
3.1.1 Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....	17
3.1.2 Deneylerde Kullanılan Kimyasallar.....	17
3.2 Metot .....	18

3.2.1 Hücre Kültürü Yöntemleri .....	18
3.2.2 Juglon Stok Solüsyonu Hazırlanması .....	20
3.2.3 Sitotoksosite Analizleri .....	21
3.2.4 Proliferasyon Analizleri.....	22
3.2.5 DAPI Boyama.....	23
3.2.6 Moleküler Biyolojik Analizler .....	23
3.2.7 İstatistiksel Analizler .....	26
<b>4 BULGULAR</b>	<b>25</b>
4.1 Sitotoksosite Analizleri.....	27
4.1.1 MTT Yöntemi.....	27
4.1.2 WST-1 Yöntemi .....	28
4.2 Proliferasyon Analizleri .....	30
4.2.1 Koloni Oluşum Testi.....	30
4.2.2 Yara İyileşme Testi .....	31
4.3 DAPI Boyama .....	34
4.4 Moleküler Biyolojik Analizler .....	36
4.4.1 Total RNA Miktarının Belirlenmesi.....	36
4.4.2 Total RNA'nın Jel Üzerinde Analizi .....	36
4.4.3 cDNA Miktarının Belirlenmesi.....	37
4.4.4 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Yöntemi .....	37
<b>5 SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>39</b>
5.1 Sonuç.....	39
5.2 Tartışma.....	40
5.3 Öneriler.....	42
<b>KAYNAKÇA</b>	<b>43</b>
<b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR</b>	<b>54</b>

## SİMGE LİSTESİ

---

rpm	Dakikadaki devir sayısı
$\Delta$	Delta
g	Gram
V	Hacim
m	Kütle
IC <sub>50</sub>	Letal doz
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
n	Mol
M	Molar
m <sub>A</sub>	Moleküler Ağırlık
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Santigrat
xg	Yer çekimi ivmesinin katları
%	Yüzde

## KISALTMA LİSTESİ

---

BAX	BCL-2 İlişkili X Proteini
BCL-2	B hücreli lenfoma-2
BCR	Kesme Noktası Küme Bölgesi Proteini
cDNA	Komplementer DNA
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
Ct	Döngü Eşiği
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Di Etil Piro Karbonat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
dNTP	Deoksiribo nükleozit trifosfat
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
FBS	Fetal Bovin Serum
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
Log	Logaritma
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MOPS	3-(N-morfolino) Propan Sülfonik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiyazol-2yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid)
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
PARP1	Poli[ADP-riboz] Sentaz 1
PBS	Potasyum Fosfat Tamponu
RT-qPCR	Ters Transkriptaz Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UV	Ultraviyole
WST-1	Suda Çözünür Tetrazolyum Tuzları
XTT	2, 3 bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

## ŞEKİL LİSTESİ

---

Şekil 2.1 Juglonun Kimyasal Yapısı.....	8
Şekil 2.2 Işık mikroskopunda C6 hücreleri.....	11
Şekil 2.3 MTT'nin formazana dönüşümü. ....	12
Şekil 2.4 Gerçek zamanlı PCR'da bir SYBR Green floresan grafiği.....	14
Şekil 4.1 MTT yöntemi sonucu canlılığa göre mor renk alan hücreler.....	27
Şekil 4.2 Kontrol grubunun ve farklı doz uygulanmış deney gruplarının absorbens değerleri.....	27
Şekil 4.3 Normalize edilmiş absorbens değerlerinin juglonun logaritmik değerlerine göre grafik eğrisi .....	28
Şekil 4.4 WST-1 yöntemi sonucu canlılığa göre renk değiştiren hücreler .....	29
Şekil 4.5 Kontrol grubunun ve farklı doz uygulanmış deney gruplarının absorbens değerleri.....	29
Şekil 4.6 Normalize edilmiş absorbens değerlerinin juglonun logaritmik değerlerine göre grafik eğrisi .....	30
Şekil 4.7 Görünür hale getirmek için boyanan hücrelerin kolonileri .....	30
Şekil 4.8 Kontrol grubu ve deney gruplarının koloni sayıları ve aralarındaki farkın istatistiksel değerlendirmesi.....	31
Şekil 4.9 Hücrelerde yaranın oluşturulduğu günün ve 24 saat sonrasının sırasıyla görüntüleri.....	32
Şekil 4.10 Yara iyileşme yüzdelerinin grafiği .....	33
Şekil 4.11 Kontrole göre yara iyileşme oranlarının istatistiksel değerlendirmesi	33
Şekil 4.12 DAPI ile boyanan hücrelerin sırasıyla 5x ve 10x görüntüleri .....	34
Şekil 4.13 Doz uygulanmış kültürlerdeki hücre sayısının doza bağımlı istatistiksel değerlendirmesi .....	35
Şekil 4.14 Jel üzerinde yürütülen total RNA (sırasıyla kontrol, 5 $\mu$ M ve 10 $\mu$ M) sonuçları .....	36
Şekil 4.15 Belirlenen Genlerin Anlatım Seviyelerindeki Değişimler .....	37

## TABLO LİSTESİ

---

<b>Tablo 3.1</b> Thermal Cycler reaksiyonu .....	25
<b>Tablo 3.2</b> RT- qPCR ileri ve ters primerler .....	25
<b>Tablo 3.3</b> qPCR için PCR cihazı programı .....	26
<b>Tablo 4.1</b> Kontrol ve deney gruplarının koloni sayıları .....	31
<b>Tablo 4.2</b> Test gruplarından 2 farklı zamanda alınan ölçüm sonucu .....	33
<b>Tablo 4.3</b> Hücrelerin 24 saat sonunda sayıları ve kapladığı alan yüzdeleri .....	35
<b>Tablo 4.4</b> Total RNA'ların nanodropla ölçüm sonuçları .....	36
<b>Tablo 4.5</b> Tamamlayıcı DNA'ların nanodropla ölçüm sonuçları .....	37

## Juglonun C6 Glioma Hücre Hattındaki Sitotoksik, Apoptotik ve Anti-Proliferatif Etkilerinin İncelenmesi

Ekin BEKTAŞ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Juglon, Juglandaceae ailesine üye bitkilerde yapraklarda, kökte, kabuklarda ve meyvelerinde doğal olarak bulunan bir organik bileşiktir. Birçok bitki türünde toksik ve büyüme durdurucu özelliğe sahiptir. Gıda ve kozmetik endüstrisinde boya maddesi olarak kullanılmaktadır. Juglon, ceviz türlerinden ekstrakte edilebildiği gibi yapay olarak da sentezi gerçekleştirilebilen bir bileşiktir. Açık havaya maruz kalması, juglonun degradasyona uğramasına sebep olmaktadır, ayrıca bazı bakteri türlerinin juglonu metabolize edebildiği de keşfedilmiştir. Glioma, glial hücrelerin çeşitli sebeplerle kontrolsüz bölünmeye başlamasıyla ortaya çıkan tümörleşme türüdür. Beyin kanseri olarak da adlandırılan bu tümörler, dört farklı kategoride sınıflandırılmaktadır. Dördüncü kategoride yer alan ve en saldırgan sınıf olan bu türe glioblastoma denilmektedir. C6 glioma hücre hattı *Rattus norvegicus*'tan izole edilmiş, beyin glial hücrelerinden köken alan bir tümör hattıdır. Bu çalışmada, C6 glioma hücre hattına juglon uygulaması yapılması ve sitotoksik etkilerin MTT ve WST-1 testleriyle gözlemlenmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, iki testin sonuçlarının birbirleriyle yakından ilişkili olduğunu ve juglonun sitotoksik etkilerinin bu hücre hattında

mevcut olduğunu göstermiştir. Belirlenen IC<sub>50</sub> değeri sonrasında koloni formasyon testiyle hücrelerin juglon dozajı uygulaması sonrası koloni oluşturma ve proliferasyon yetenekleri incelenmiştir. Yara iyileşmesi testiyle bu gözlemler pekiştirilmiş ve hücrelerin migrasyon yeteneği gözlemlenmiştir. DAPI boyama yapılarak hücrelerin floresan mikroskopunda morfolojik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Son aşama olarak RT-qPCR yapılarak belirlenen kanser ilişkili genler üzerindeki ifade seviyeleri karşılaştırılmıştır. Yapılan tüm incelemeler sonrası istatistiksel analizler gerçekleştirilerek, istatistiksel olarak anlamlı bulunan sonuçlar gösterilmiştir. Ortaya konulan veriler doğrultusunda, juglonun C6 Rat glioma hattında anti-proliferatif ve apoptotik etkileri belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Glioma, juglon, sitotoksosite, RT-qPCR, kanser.

# Investigation of Cytotoxic, Apoptotic and Anti-Proliferative Effects of Juglone on C6 Glioma Cell Line

Ekin BEKTAŞ

Department of Molecular Biology and Genetics

Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Juglone is an organic compound found naturally in the leaves, roots, bark and fruits of plants belonging to the Juglandaceae family. It has toxic and growth inhibiting properties in many plant species. It is used as a dyestuff in the food and cosmetic industry. Juglone is a compound that can be synthesized artificially as well as extracted from walnut species. Exposure to open air causes juglone to degrade, and it has also been discovered that some bacterial species can metabolize juglone. Glioma is a type of tumorigenesis that occurs when glial cells begin to proliferate uncontrollably because of various reasons. These tumors, also called brain cancer, are classified into four different categories. This type, which is in the fourth category and the most aggressive class, is called glioblastoma. C6 glioma cell line is a tumor line derived from brain glial cells derived from *Rattus norvegicus*. In this study, juglone application to C6 glioma cell line and observation of cytotoxic effects by MTT and WST-1 tests were performed. The data obtained showed that the results of the two tests were closely related and the cytotoxic effects of juglone were present in this cell line. After the determination

of IC<sub>50</sub> value, colony formation and proliferation abilities of the juglone treated cells were examined with the colony formation test. These observations were reinforced by the wound healing test and the migration ability of the cells was observed. Morphological examinations of the cell groups were performed under fluorescent microscopy by DAPI staining. As a final step, the expression levels on the cancer related genes determined by RT-qPCR were compared. After all the examinations, statistical analyzes were performed and the results that were found to be statistically significant were shown. In line with the data presented, the anti-proliferative and apoptotic effects of juglone were determined in the C6 Rat glioma line.

**Keywords:** Glioma, juglone, cytotoxicity, RT-qPCR, cancer.

### 1.1 Literatür Özeti

Kanser günümüzde insanlığa en çok etki eden ve ölümlerin büyük bir kısmından sorumlu olan tedavisi karmaşık ve uzun olan bir hastalıktır. Kanser türleri ve bunlara bağlı ölümler toplam ölümlerin yüzde 15,7'sinden sorumludur. [1]

Gelişen bilimsel yöntemler ve araştırma metotları sayesinde kanser araştırmaları son yıllarda hız kazanmıştır. Umut vadeden yeni sonuçlarla birlikte kanser eskisi kadar ölümcül ve çözümsüz bir hastalık olmaktan uzaklaşmaktadır. 1971'den bu yana sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde kanser araştırmalarına 200 milyar dolar harcanmıştır. Sonuç olarak kanserden ölüm oranları yüzde 5 oranında azalmıştır. [2]

Kanser araştırmalarında juglonun etkilerinin incelendiği birçok çalışma mevcuttur. Kolon kanseri hücre hattında juglonun hücre proliferasyonunu azaltan ve apoptozu arttırdığını gösteren çalışma vardır. [3] Juglon 21. Yüzyılda bulunmuş ya da yeni keşfedilmiş bir madde değildir. Juglonun kanser üstüne etkilerinin araştırılması son zamanlarda hız kazanmıştır. Juglonun çeşitli insan kanser hatlarında sitotoksik etkileri olduğu bulunmuştur. Bu kanser hatlarına prostat kanseri, göğüs kanseri, deri ve akciğer kanseri dahildir. [4]

Juglonun kombine ajan olarak kullanıldığı ve pankreas hücrelerinde yapılan çalışmalar da mevcuttur. [5] Bunun yanında, juglonun sadece insan kanser hatlarında değil aynı zamanda rat kanser hatlarına olan etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarla juglonun etki mekanizması ve ne yönde etki ettiği aydınlatılmaya çalışılmaktadır. [6]

Başka bir çalışmada ise juglonun rat melanoma hücrelerine sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. [7] Juglonun kanser hatlarına olan bu etkisi daha ileri araştırmalar yapılmasına öncülük etmektedir. Juglonun kanser hatlarına olan sitotoksik ve anti-proliferatif etkilerinin yanı sıra anti-bakteriyel

etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Özellikle antibiyotiklerle kombine olarak kullanıldığında antibiyotik etkinliğini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. [8, 9]

## **1.2 Tezin Amacı**

Bu çalışmada sekonder bir metabolit olan juglonun, rat glioma kanser hattında olan sitotoksik, apoptik ve anti-proliferatif etkilerini göstermek, gözlemek amaçlanmıştır. Juglon, doğal yollarla elde edilebilen ve uzun zamandır çeşitli sektörlerde kullanımı söz konusu olan bir madde olduğu için avantajlıdır. Günümüzün en büyük sorunlarından biri olan kansere olan etkisini gözlemek ve bilgi kütüphanesine katkılar sağlamak için bu çalışma yapılmıştır. Bu sayede juglonun daha ileriki çalışmalarda kullanılması ve potansiyel bir terapötik ajan olup /olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

## **1.3 Hipotez**

Juglonun C6 rat glioma kanser hattında sitotoksik etkilerinin gözlemlenmesi kurgulandı ve bu etkiye bağlı olarak juglonun bu hücre hattında anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin de var olacağı kurgulandı. Elde ettiğimiz verilerle yapılan istatistiksel anlam analizleri sonucunda bu etkilerin anlamlı seviyede olması beklendi. Yapılan RT-qPCR deneyiyle de bu etkilerinin gen regülasyonlarında farklılığa yol açacağı kurgulandı.

## 2.1 Kanser Nedir

Vücutun birçok bölgesine yayılabilen veya başka kısımlara yayılma potansiyelini barındıran anormal hücre büyümesine bağlı bir hastalık türüne kanser denilmektedir. Kanserin belirtilerinden birkaçı yumru oluşumu, uzun süreli öksürük, bağırsak hareketlerinde değişiklik ve kilo kaybı olarak söylenebilir. Bu belirtiler kanserin bir semptomu olabilirken başka rahatsızlıkları da işaret ediyor olabilir.[10] Günümüzde insanları etkilediği bilinen 100'den fazla kanser türü tanımlanmıştır.[11]

Yunanca kökenli eski bir kelimedir ancak modern tıp bilimine İngilizce olarak 17. Yüzyıldan sonra giriş yapmıştır. Kelimenin kökeni yengeç demektir, tümör anlamına da gelmektedir. [24]

Tütün ve türevlerinin kullanımı kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %22'sini oluşturmaktadır.[12] Diğer %10'luk kısım ise kötü beslenme, yetersiz fiziksel aktivite, obezite veya yüksek alkol tüketiminden kaynaklanmaktadır.[13, 14] Gelişmekte olan ülkelerde kanser sebeplerinin %15'ini insan papilloma virüsü enfeksiyonu, Helicobacter pylori, hepatit B, hepatit C, Epstein-Barr virüsü ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve bunlara bağlı enfeksiyonlar oluşturmaktadır.[12] İyonlaştırıcı radyasyon ve çevresel kirleticiler, kimyasallar da diğer etkenlerdendir. [15] Bu faktörler DNA hasarına yol açarak genlerde mutasyonların ortaya çıkmasına sebep olurlar. Bu mutasyonlar kanserle ilişkili genlerde meydana gelmişse ve geri dönüştürülemez şekildeyse kanserleşme başlamış demektir. [16] Kanserler kalıtsal olarak da ortaya çıkabilirler ama bu oran %5-10 civarındadır.[17]

Sigara kullanmamak, bol sebze ve meyve tüketerek sağlıklı beslenmek, bulaşıcı hastalıklara karşı aşılınmak ve güneş ışığına doğrudan maruz kalmanın önüne geçmek bazı kanser türlerine yakalanma ihtimalini azaltabilir. [18, 19] Kanser

genellikle radyoterapi, cerrahi yöntemler, kemoterapi ve hedefe yönelik tedavinin bazı kombinasyonlarıyla gerçekleştirilir. Ağrı ve semptomları azaltmak tedavinin önemli bir parçasıdır. Hastalığı ilerlemiş kişilerde palyatif bakımın önemi büyüktür. Hayatta kalma ihtimali, tedavinin başlandığı zamana, kanser tipine ve hastalığın ne kadar yayılmış olmasına bağlıdır. [16, 20]

2015 yılında kanser hastalığına sahip olan kişi sayısı yaklaşık 90,5 milyondur. [21] 2019 yılında yaklaşık olarak 18 milyon kanser vakası ortaya çıkmış ve 8,8 milyon kişi kanser ve buna bağlı nedenler sebebiyle hayatını kaybetmiştir. (Ölümlerin yaklaşık %15,7'si).[22] Erkeklerde en yüksek oranda görülen prostat kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri ve mide kanseridir. Meme kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri ve rahim ağzı kanseri kadınlarda en yüksek oranda görülen kanserlerdir. [23]

### **2.1.1 Onkogenomik**

Kanser temel olarak doku büyümesinin düzenlenmesinde meydana gelen sorunlardan kaynaklanan bir hastalıktır. Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşebilmesi için hücre büyümesinin ve farklılaşmasının düzenlenmesinden sorumlu genlerin değişikliğe uğraması gerekir.[25]

Kanser ilişkili genler başlıca üç kategoriye ayrılır:

- Onkogenler, hücre bölünmesini ve çoğalmasını teşvik eden genlerdir. Normalde proto-onko gen olarak bulunan hücreler mutasyona uğrayınca onkogen halini alır. [26]
- Tümör baskılayıcı olarak görev yapan genler, hücre çoğalmasını ve hücrelerin hayatta kalmasının önüne geçen genlerdir. Malign transformasyon, yeni onkogenlerin ortaya çıkmasını, düzgün onkogenlerin beklenmeyen fazla ifadesi veya tümör baskılayan genlerin yeterli seviyede anlatımı olmaması veya etkisiz hale getirilmesi yoluyla meydana gelebilir. Temel olarak, sağlıklı bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için birden fazla gende değişiklik olmuş olması gerekmektedir. [26]
- DNA tamir genleri, kanserli hücrelerde çalışmadıkları için hatalı hücreler bölünerek çoğalmaya devam eder. [25]

Genetik değişimler farklı miktarlarda ve farklı yollarla kendini gösterebilir. Mitozda oluşabilecek hatalar bütün bir kromozomun eksikliğine veya kaybına yol açabilir. Genellikle meydana gelen, genomik DNA'nın nükleotid dizisinde meydana gelen mutasyon türleridir.

Çoğu kritik seviyedeki mutasyon, bir kromozomun bir kısmının kaybı durumunu veya fazladan bir parçanın kazanılmasını durumunu içerir. Genomik uzama, bir hücre, çoğunlukla birden fazla onkogen ve yanyana genomik ürün içeren küçük bir kromozomal bölgenin kopyalarını kendisine dahil ettiğinde ortaya çıkar. Translokasyon genelde iki farklı kromozomal bölge, belirli bir lokasyonda beklenmeyen bir şekilde kaynaştığında meydana gelir. Bu duruma örnek olarak, Philadelphia kromozomunu veya kronik miyeloid lösemide ortaya çıkan ve 9 ve 22 numaralı kromozomların translokasyonunu verebiliriz.[28]

Hayatta olan hücrelerin DNA'sında bulunan verilerin replikasyonu, mutasyonların meydana gelmesi ihtimalini taşır. Kompleks hata önleme ve hata giderme mekanizmaları, bu aşamayı hatasız gerçekleştirebilmek için vardır ve hücrenin kansere yakalanmasını önler. Önemli bir sorun meydana gelirse, hasar almış olan hücre, apoptoz adı verilen programlanmış hücre ölümü ve bunların yollarıyla kendi kendini yok edebilir. Hata kontrol basamakları başarısız olursa veya çalışmazsa, mutasyonların varlığı devam edecek ve hatalar yavru hücrelere de geçecektir.

Bazı durumlar, hataların ortaya çıkma ve yayılma ihtimalini yükseltir. Bunlara örnek olarak, kanserojenler olarak adlandırılan maddeleri ve bunların temasını, tekrar eden doku yaralanmaları, iyonlaştırıcı radyasyonu, ısıyı veya hipoksi durumunu barındırabilir. [27]

Kanser kaynağı olan hatalar birikebilirler. Eğer hücrenin hata düzeltme mekanizmasında bir mutasyon meydana gelirse, o hücrede ve yavru hücrelerde hataların daha hızlı birikmesine sebep verebilir. Onkogene meydana gelen başka bir mutasyon, hücrenin orijinal kopyalarından daha hızlı üremesine neden olabilir. Başka bir mutasyon da apoptozun sinyal yolunun düzgün çalışmasını engelleyerek ve bu sayede hücreyi ölümsüzleştirerek bir tümör baskılayıcı genin kaybolmasına sebep verebilir.

Sağlıklı bir hücrenin kanserli bir hücreye dönüşümü, adım adım hücrenin düzgün doku oluşumunu kısıtlayan daha çok kontrolden kaçmasını sağlayan, daha ciddi hatalara sebep olan baştaki hataların yol açtığı bir zincirleme tepkimeyi andırır. Bu hücre isyanına benzer durum, uygun olmayanın istenmeyen bir hayatta kalmasıdır. Kanser büyümeye başladığında, klonal evrim denilen bu devamlı süreç, ilerlemeyi daha istilacı ve saldırgan kısımlara iletir. [29]

Kanserin karakteristik yetenekleri, apoptozdan kaçınma, kendi kendine büyüme sinyali oluşturma, büyümeyi engelleyen sinyallere karşı duyarsızlık, devamlı damar oluşumu, sınırsız seviyede kendini kopyalama potansiyeli, metastaz yapabilme yeteneği, enerji metabolizmasının değişmesi ve yeniden programlanması, bağışıklık sisteminden kaçınma olarak farklı kategorilere sınıflandırılabilir. [30]

### **2.1.2 Kanser Tedavisi:**

Günümüzde kanserin tedavisinde kullanılan birçok araç ve yöntem mevcuttur. Bunlar cerrahi müdahale, radyoterapi, hedefe yönelik tedavi, hormon tedavisi ve palyatif bakımı içerir. Kullanılacak olan tedavi yöntemleri doktorlar tarafından hastanın durumuna bağlı olarak kararlaştırılır.

Kemoterapi, sitotoksik ve anti-neoplastik ilaçların (kemoterapötik ajanlar) kanserin tedavisinde kullanımınıdır. Alkilleyici kimyasallar ve antimetabolitler gibi büyük kategorilere ayrılan birçok ilaç türü bu yöntemde kullanılmaktadır. [31]

Geleneksel kemoterapötik kimyasallar ve maddeler, kanser hücrelerinin ortak özelliği olan hızlı bir şekilde bölünme yeteneği olan hücreleri öldürerek, etkisiz hale getirerek etkisini gösterir. Sitotoksik etkili ilaçların tek tedavi ajanı olarak değil de kombine olarak verilmesinin törepatik etkiyi arttırdığı bulunmuştur; kombinasyon tedavisi adı verilen bu süreç, sağkalım ve tümöre yanıt oranlarında ve hastalığın ilerlemesini engellemede avantaja sahiptir. [32]

Bir incelemeye göre, kombine tedavinin metastaz yapmış meme kanserini tedavi etmede daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Hayatta kalma ve toksisite düşünüldüğünde, kombine kemoterapinin daha iyi sonuçlara yol açıp açmadığı tartışmalıdır. [33]

Hedefe yönelik tedavi, normal ve kanser hücreleri arasındaki özel moleküler farklılıkları hedef alan bir kemoterapi türüdür. Bcr-Abl inhibitörleri kronik miyeloid lösemnin (KML) tedavisinde kullanılır ve örnek olarak gösterilebilir. [20] Günümüzde birçok kanser türü için hedefe yönelik tedaviler mevcuttur. Kemoterapi tedavisinin ne derecede başarılı olduğu diğer doku ve organlar verdiği hasarın ne seviyede olduğu ile ilişkilidir. Kemoterapi nihai bir çözüm sağlamasa da ilerde ameliyatın uygun olacağı beklentisiyle ağrı gibi semptomları baskılamak veya ameliyatı uygun olmayan bir tümörün boyutunu küçültmek için tercih edilebilir.

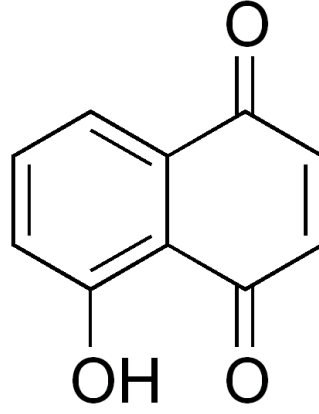
Radyoterapi, iyonlaştırıcı radyasyonun kullanılmasıdır ve semptomları hafifletmek veya tedavi için uygulanır. Kanserli dokunun DNA'sına zarar vererek kanser hücrelerini öldürmeyi amaçlar. Kemoterapide olduğu gibi, farklı kanser türleri radyasyon tedavisine farklı sonuçlar vermektedir. [34]

Radyasyonla tedavi etme yöntemi yani radyoterapi birçok hastada tedavi etme amaçlı bir yöntem olarak kullanılır. Radyasyon, cilt kanserlerini tedavi etmek için genellikle düşük enerji seviyesinde bulunan X-ışınlarını kullanırken, vücuttaki kanserler için daha yüksek enerjili X-ışınları kullanılır. [35]

Cerrahi yöntem, izole olan kanser kitlelerinin çoğu için öncelikli tedavi yöntemidir ve hasta refahında ve hayatta kalım süresinde etkili olabilir. Lokalize kanserde, cerrahi yöntem genel olarak belirli durumlarda bölgedeki lenf düğümleri ile birlikte tüm kitleyi çıkarmaya çalışır. [36]

## 2.2 Juglon

5-hidroksi-1,4-naftaledion (IUPAC) olarak da adlandırılan Juglone, moleküler formülü  $C_{10}H_6O_3$  olan organik bir bileşiktir. Juglon, Juglandaceae familyasındaki bitkilerin, özellikle kara ceviz yapraklarında, köklerinde, kabuklarında, meyvelerinde ve kabuğunda doğal olarak bulunur ve birçok bitki türü için toksiktir veya büyümeyi geciktirir. [37] Juglon endüstride boya maddesi olarak ya da herbisit olarak kullanılabilir.



**Şekil 2.1** Juglonon kimyasal yapısı. [74]

Ceviz ağaçlarının diğer bitkiler üstünde oluşturduğu zararlı etkileri insanlar çok uzun zamanlardan beri incelemektedir. Yunanistan ve Roma gibi eski uygarlıklar, cevizi sitotoksik özellikleri için, Güney Amerika'da yaşayanlar da kesilmiş kabukları suya atarak kolayca balık avlamak için kullandılar. [38]

Buna rağmen, juglon 19. yüzyıla kadar izole edilmedi. İki bilim insanı olan, A. Vogel Jr. ve C. Reischauer, bileşiği 1851'de ceviz ağacından izole etmeyi başardılar. O zamanlar juglon nusin olarak bilinmekteydi. Juglon daha sonra ilk kez 1887'de A. Bernthsen ve A. Semper tarafından sentezlendi ve karakterize edildi.

1921 yılında M.T. Cook, Juglans nigra türü çevresindeki domates bitkilerinin, özellikle solmuş yapraklarından olumsuz etkilendiğini buldu. [39] Schneiderhan, Juglans nigra ve Juglans cinerea'nın elma ağaçlarına birtakım zararlı etkilerinin olduğunu gözlemledi. Ceviz ağaçlarının ortalama 11,9 metre yakınında bulunan ağaçların ölü olduğu belirlendi. Ayrıca, elma ağaçlarının bazı yerel çeşitlerinin cevizlere karşı daha dirençli olma eğiliminde olduğunu keşfetti. [40]

A.B. Massey, yonca tarlalarındaki ceviz ağaçları çevresindeki yoncaların öldüğünü gözlemledi. Birkaç deneyden sonra, Massey ceviz ağaçlarında toksik etkili olduğunu düşündüğü maddenin suda çözünmediği çıkarımına vardı, bu nedenle köklerdeki ve kabuktaki bileşiğin ağaçtan ayrıldıktan sonra kimyasal olarak farklılaşması gerektiğini belirtti. [41] Bileşik, 1928 yılında E.F. Davis tarafından tanımlandı ve diğer bitkiler için toksik olduğu doğrulanmış oldu. [42]

1942'de B.I. Brown, domates ve yoncanın çimlenmesinin ve fide büyümesinin ceviz köklerinin parçalarıyla temas ettiğinde yavaşladığını gösterdi ve juglonun biyolojik hasarına bilimsel olarak daha fazla kanıt sunmuş oldu. [43]

Ceviz ağacı ilk tarihlerden beri geleneksel tıp alanında kullanılmıştır. 1900'lerin başında Amerika'da hekimler bazı cilt hastalıklarının tedavisi için juglon reçete ettiler.[44]

Juglon, enzimatik hidrolizden sonra hidrojuglon, 1,5-dihidroksinaftalinin oksidasyonu ile elde edilir. [45] 5,8-dihidroksi-1-tetralonun gümüş oksit (Ag<sub>2</sub>O), manganez dioksit (MnO<sub>2</sub>) veya 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokinon (DDQ) ile oksidasyonu ile de elde edilebilir. [46]

Juglone, taze ağırlıkça %2-4 oranında ceviz meyvesinin kabuğundan elde edilebilir. [47,48]

Oksitlenmeden önce, ceviz türü bitkilerde juglon renksiz hidroksijuglon formunda bulunur. Havaya maruz kaldığında hızla juglona oksitlenir. Hidroksijuglonun kolayca bozduğuna dair kanıt olarak ceviz kabuklarının tazeleyen kesildikten sonra sarıdan siyaha değişmesinde belirgindir. [49]

Kara ceviz köklerinin bulunduğu toprakta yaşayam yerel bakteriler, özellikle de Pseudomonas putida J1, juglonu metabolize edebilir ve onu birincil enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilir. [50] Bu yüzden juglon, iyi havalandırılmış topraklarda çok etkili bir sitotoksin değildir. [51]

Juglon allelopatik bileşiktir, başka bir bitkinin büyümesini engelleyen bir bitki tarafından üretilen bir maddedir. Juglon, bitkilerin çimlenmesini kök ve gövde sistemlerinin büyümesini etkilediğinden daha az etkiler. Bazı altındaki konsantrasyonlarda birtakım iğne yapraklı bitki tohumlarında çimlenme oranını artırmıştır. [52]

Juglone, metabolik yollar için gerekli olan bazı enzimleri inhibe ederek etkisini gösterir. Bu da mitokondride solunumu engeller, mısır ve soya gibi yaygın bitkilerde fotosentezi engeller. [53, 54] Bunların yanı sıra, juglonun stoma işlevi üzerindeki etkisi nedeniyle bitkiler ve su arasındaki etkileşimi etkilediği gösterilmiştir. [55]

Çalışmalar, juglonun mısır ürünlerinin verimini etkilediğini göstermiştir; ancak budama ve kök engellerinin kullanımı bu etkileri büyük ölçüde azaltmaktadır. [56] Bazı akçağaç (Acer), huş (Betula) ve kayın (Fagus) türleri de dahil olmak üzere bir dizi bitki ve ağaç juglona dayanıklıdır.

Birçok otobur böcek için son derece zehirlidir. Bununla birlikte, bazıları, örneğin *Actias luna* (Ay güvesi), juglonu (ve ilgili naftokinonları) toksik olmayan 1,4,5-trihidroksinaftalin'e detoksifiye edebilir. Ayrıca farelerde olgun ve olgunlaşmamış *Hymenolepis nana* üzerinde antelmintik (parazitik solucanları dışarı atan) aktivite göstermiştir. [57]

Naftokinonik bileşikler ayrıca antimikrobiyal aktivite gösterirler. [58, 59, 60]

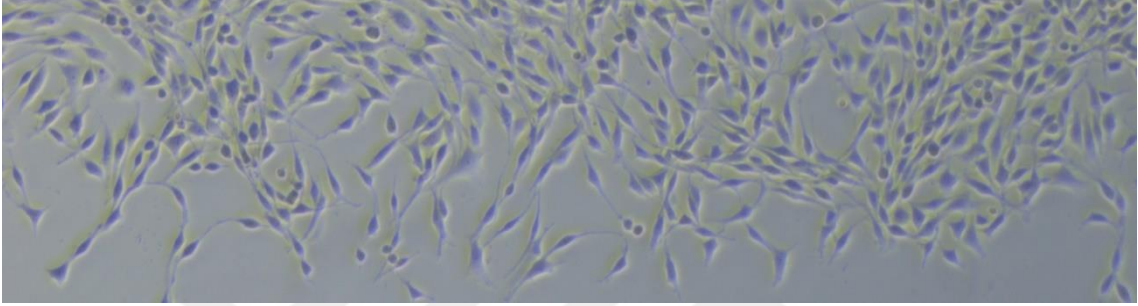
Juglone günümüzde antikanser özellikleri için araştırılmaktadır. [61] Karsinojenlere maruz kalmış sıçanlarda bağırsak tümörü olasılığını azalttığı gösterilmiştir.[62] Juglonun antikanser özelliklerini gösterdiği potansiyel yollardan biri, semikinon radikalinin oluşumudur; semikinon radikali, yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu apoptoza yol açabilen süperoksit anyon radikallerinin oluşmasına neden olur.[63] Süperoksit anyon radikalinin oluşmasına neden olan juglondan semikinon radikaline doğru gerçekleşen bu dönüşüm sitozolde ve mitokondride gerçekleşir. [64]

### **2.3 C6 Rat Glioma Hücre Hattı**

Gliomalar, glial hücrelerden köken alan tümörlerdir ve merkezi sinir sisteminin sık görülen tümörleridir.[65] Glioma hücre biyolojisini anlamak için kullanılan birçok model hücre kullanılmaktadır. Bunlar arasında en bilindik ve kullanımı yaygın olanlardan biri de C6 glioblastoma hücreleridir. C6 glioblastoma hücreleri ilk kez Benda ve 7 arkadaşları (1968) tarafından N-nitroso metil üre ile glioblastom oluşturularak Wistar furth türü sıçan beyinlerinden elde edilmiştir. [66]

C6 hücreleri fibroblast benzeri morfoloji sergiler, poligonal formdadır ve tutundukları yüzeyde iyi çoğalırlar. Aktin filamentleri, C6 hücrelerinde plazma zarının hemen altında bir kortikal ağ oluşturur ve ayrıca kas dışı hücrelerin sitoplazmasında gözlenen kontraktıl aktin stres lifleri demeti oluşturur.

Fosfomiyosin II, stres liflerinde ve hücre zarının altında tespit edilebilir. Hücreler, iyi tanımlanmış bir lamellipodium tarafından polarize edilir. Fosforillenmiş miyozin hafif zincirini (MLC) ve aktin filamentlerini bozan bir aktin bağlayıcı protein olan düşük kofilin seviyeleri, çok sayıda lamellipodia oluşumunu teşvik ederek hücre polarizasyon kaybına, stres lifi ayrılmasına ve hücre hareketine neden olur. Hücreler küresel hale gelir ve iskeletleri birleşerek uzunlamasına büyüme gösterir. Yüzey alanlarına kıyasla yuvarlak hücrelerin hacmi büyüktür. F-aktin çoğunlukla hücre yüzeyinde ve uzama sırasında yoğunlaşır.[67]



**Şekil 2.2** Işık mikroskobunda C6 hücreleri

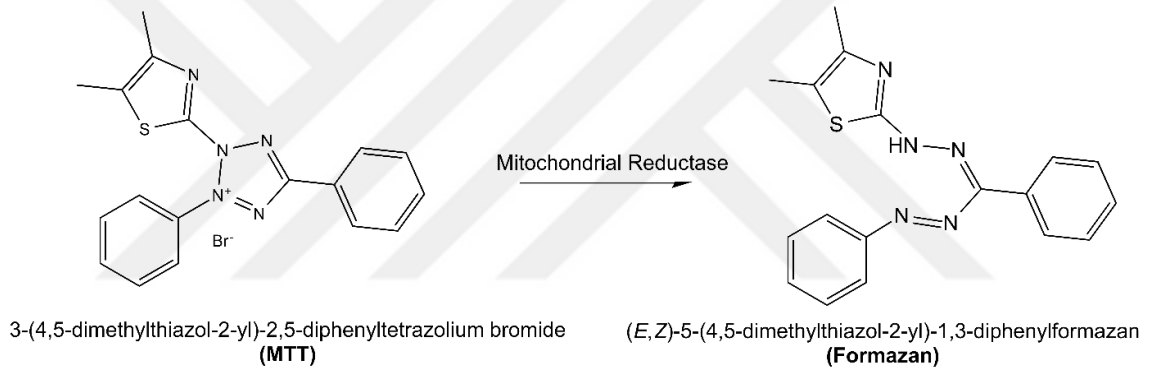
## 2.4 MTT

MTT testi, hücre metabolik aktivitesini ölçmek için renk değişimine dayanan bir yöntemdir. MTT'nin yanı sıra WST ve XTT testleri de benzer mekanizmaları kullanarak ölçüm gerçekleştirir. [68] NAD(P)H'ye bağlı oksidoredüktaz enzimleri, belirli koşullar altında, canlı olan toplam hücrelerin sayısını gösterebilir. Bu enzimler, tetrazolyum boyası MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromürü, rengi mor olan çözünmeyen formazana indirgeme özelliğine sahiptir. [69] Tetrazolium boyasına dayanan deneyler potansiyel tıbbi ajanların ve toksik materyallerin sitotoksitesini veya sitostatik aktivitesini ölçmek için kullanılır. MTT reaktifi ışığa hassas olduğundan testler genellikle karanlıkta yapılır. XTT testi WST'nin de olduğu gibi suda çözünürdür.[68]

MTT sarı renkli bir tetrazoldür, canlı hücrelerde mor formazana indirgenir. Çözünmemiş mor formazan ürününün renkli bir çözelti haline gelmesi için bir çözücü (genellikle ya dimetil sülfoksit, asitleştirilmiş bir etanol çözeltisi ya da seyreltilmiş hidroklorik asit içinde deterjan sodyum dodesil sülfat çözeltisi) eklenir. Bu renkli son çözeltinin absorbansı, bir spektrofotometre ile belirli bir

dalga boyunda (genellikle 500 ve 600 nm arasında) ölçülür. Işık absorpsiyonunun seviyesi, hücre içinde ve yüzeyinde biriken formazan konsantrasyonunun seviyesine bağlıdır. Formazan konsantrasyonu ne kadar derişikse, mor renk o kadar yoğun olur ve absorbans o kadar yüksek olur. [70]

Tetrazolium boya indirgemesi büyük ölçüde hücrenin sitozolik bölgesindeki NAD(P)H'ye bağlı oksidoredüktaz enzimleriyle ilişkilidir. Bu nedenle, MTT ve diğer tetrazolyum boyalarının indirgenmesi, NAD(P)H dolaşımına bağlı hücre metabolik aktiviteyi ifade eder. Timositler ve splenositler gibi düşük metabolizmalı hücreler MTT'yi çok az indirger. Hızla bölünen hücreler, yüksek MTT indirgenme oranları sergiler. Test koşullarının metabolik aktiviteyi değiştirebileceğini vebuna bağlı olarak hücre canlılığını etkilemeden tetrazolyum boyasını azaltabileceğini göz ardı etmemek gerekir. [71]



**Şekil 2.3** MTT'nin formazana dönüşümü. [73]

## 2.5 WST-1

WST'ler suda çözünür tetrazolyum tuzlarıdır, ortaya çıkan formazanların farklı absorpsiyon spektrumlarını vermektedirler. MTT'ye alternatif başka suda çözünür boyadır. WST-1 ve özellikle WST-8 (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum), MTT'ye göre avantajlıdır. İndirgenmeleri hücre dışında gerçekleşir ve suda çözünür bir formazan oluştururlar. WST testleri doğrudan okunabilir (bir çözündürme aşamasına ihtiyaç duymazlar. MTT'den daha etkili sinyal verebilirler ve hücrelere olan toksisiteleri azdır. [72]

## 2.6 Koloni Formasyon Testi

Koloni formasyon testi, belirli ajanların hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması üzerindeki etkisini incelemek için kullanılan bir tekniktir. Kanser araştırması çalışılan laboratuvarlarda, ilaçların veya radyasyonun çoğalmakta olan tümör hücreleri üzerindeki etkisini belirlemek ve virüs stoklarında Hücre Öldüren Partüküllerin titrasyonu için yaygın olarak kullanılır. İlk olarak 1955 yılında Colorado Üniversitesi'nde T.T. Puck ve Philip I. Marcus tarafından geliştirilmiştir. [75]

Deney üç ana adımdan oluşur. Doz bir hücre örneğine uygulanır. Hücreler bir doku kültürü kabına alınır ve büyümesine izin verilir. Oluşan koloniler sabitlenir, boyanır ve sayılır.

Bir deneyde herhangi bir hücre türü kullanılabilir ama onkolojik araştırmalardaki bu deneylerin amacı daha etkili kanser tedavilerinin bulunması olduğundan, insan tümör hücreleri yaygın bir seçimdir. Hücreler ya iyi çalışılmış ve genel özellikleri iyi bilinen hazır hücrelerden ya da bir hastadaki bir tümör biyopsisinden gelir.

## 2.7 Yara İyileşme Testi

Yara iyileşme testi, hücrelerin göç etme yeteneğini ve hücre-hücre etkileşimini incelemek için kullanılan bir araştırma metodudur. Tek katman haline gelmiş hücre üzerinde düz bir çizgi yaratarak ve mikroskop ile görüntüleri çekerek gerçekleştirilir. Çizik testi olarak da adlandırılır. [76]

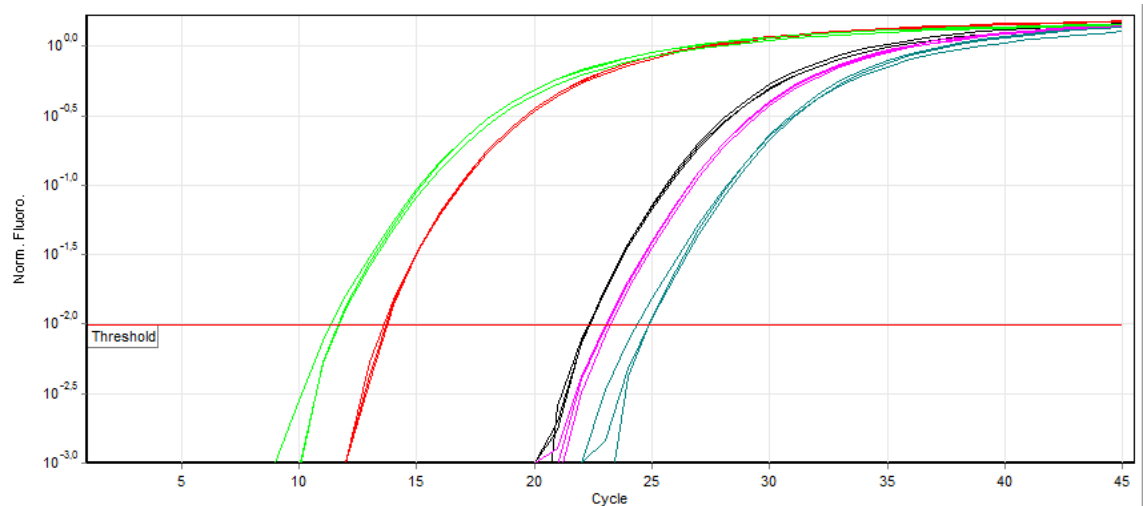
Özel olarak hücre tabakasının hücre göçünü yarı nicel olarak ölçmek için bir 2 boyutlu hücre göçü incelemesidir. Bu yara, mekanik, termal veya kimyasal hasar gibi çeşitli yöntemlerle oluşturulabilir. Bu yaranın amacı, hücrelerin göç etmesini ve boşluğu kapatmasını bekleyerek hücresiz bir alan oluşturmaktır. Çizik testi yalnızca epitel tabakaları olarak göç eden, yayılan hücre türleri için uygundur ve yapışık olmayan hücreler için kullanışlı değildir. Özellikle, bu test kemotaksi çalışmaları için uygun değildir. [77]

## 2.8 DAPI Boyama

DAPI veya 4',6-diamidino-2-fenilindol, DNA'daki adenin-timin bazlarından zengin bölgelere kuvvetli bir şekilde bağlanan floresan boyasıdır. Floresan mikroskopisinde yaygın olarak kullanılır. DAPI sağlam bir hücre zarından geçebilir hem canlı hem de sabit hücreleri boyamak için kullanılabilir. Çift sarmallı DNA'ya bağlandığında, DAPI 358 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyona sahiptir ve maksimum emisyon 461 nm'dir. Bu nedenle, floresan mikroskobu için DAPI, ultraviyole ışıkla uyarılır ve bir mavi/camgöbeği filtresi aracılığıyla tespit edilir. DAPI aynı zamanda RNA'ya da bağlanır, ancak ışması o kadar güçlü değildir. Emisyonu, RNA'ya bağlandığında yaklaşık 500 nm'ye kayar. [78]

## 2.9 RT-qPCR Yöntemi

Yaşayan canlılardaki hücrelerin tamamı gen ifadesini tek zincirli RNA aracılığıyla kontrol eder. Bir hücrede genin ifade edilme seviyesi, bir örnekte mevcut olan o genin bir RNA çıktısının kopyalarının miktarı ile ölçülebilir. RNA düşük miktarlarda mevcuttur ve bu miktardan gen ifadesini uygun bir şekilde saptamak ve ölçmek için gen transkriptinin çoğaltılması gereklidir. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (PCR), DNA'yı çoğaltmak için kullanılır; bu nedenle RNA başlangıçlı PCR için RNA materyali önce ters transkriptaz ile tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) sentezlenir. [79]



**Şekil 2.4** Gerçek zamanlı PCR'da bir SYBR Green floresan grafiği [80]

Küçük miktarlarda DNA'yı amplifiye etmek için, bir DNA şablonu, en az bir çift özel primer, deoksiribonükleotit trifosfat, uygun bir tampon solüsyonu ve bir termostabil DNA polimerazı içeren geleneksel PCR ile aynı süreç kullanılır. Bu karışıma, istenen dalga boyunda uyarıldıktan sonra ışımayı izlemek için sensörler içeren bir termal döngüleyicide florofor etkili bir malzeme eklenir ve bir veya daha fazla belirli ürünün üretim hızının takibine izin verir. Bu, amplifiye ürünün üretim hızının her PCR döngüsünde değerlendirilmesine izin verir. Ortaya çıkan veriler, birkaç örnek boyunca karşılaştırmalı gen ifadesini (veya mRNA kopya numarasını) ölçmek için bilgisayar yazılımı ile analiz edilebilir. Kantitatif PCR, bu numunelerde belirli bir DNA dizisinin varlığını ve bolluğunu değerlendirmek için numunelerdeki DNA'yı belirlemek ve miktarını belirlemek için de kullanılabilir. Bu ölçüm her amplifikasyon döngüsünün sonunda gerçekleşir, bu nedenle bu teknoloji gerçek zamanlı PCR olarak bilinir. [81]

## **2.10 RT-qPCR Yönteminde Kullanılan Genler**

**Beta-Actin:** Beta-actin son derece korunmuş genlerden birisidir. RT-qPCR yöntemlerinde kalibratör olarak kullanılan genler birisidir. Hücre yapısı ve bütünlüğün sağlanmasından sorumludur. [82]

**BAX:** BAX geni apoptoz regülatör gen ya da BCL2 benzeri protein 4 olarak da bilinir. Apoptotik aktivasyondan sorumludur ve BCL2 ailesine üye bir genidir. Regülasyonu p53 geni tarafından düzenlenir. [83]

**BCL-2:** BCL2, BCL2 ailesine üye genlerden bir diğeridir. Hücre ölümünü regüle eden genlerden birisidir. Pro-apoptotik genlerin aktivasyonunu engelleyerek hücrelerin hayatta kalmasını sağlamakta önemli bir rolü vardır. Kanser hücrelerinde artmış bir anlatım söz konusudur. [84]

**Kaspaz3:** Kaspaz gen ailesine üye genlerden birisidir. Hücre ölümünün yani apoptozun gerçekleştirilme aşamasında önemli bir rol oynar. Apoptozdan sorumlu genlerin sıralı aktivasyonu ile gerçekleşen aşamalarda kritik bir konumu vardır. Normal koşullar altında bu gen tarafından üretilen enzimler proenzim olarak inaktif formda bulunurlar. [85]

**PARP1:** PARP1 geni hücre farklılaşmasında ve proliferasyonunda görev alır. DNA hasarı meydana geldiğinde, DNA tamiri gerçekleştirilmesinde görev alır. PARP1

kanser hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Nöroblastoma hücreleri de bunlara dahildir. [86]

MMP8: Matriks metaloproteinaz gen ailesine üye genlerden birisidir. Memelilerde dokularda kolejen yıkımdan sorumludur. Bu görev normal bir biyolojik süreçtir ve embriyo gelişimi, hücre çoğalması, doku oluşumu, damar oluşumu ve metastaz gibi süreçlerle ilişkilidir. Tümör formasyonunda ve hücre proliferasyonu ile ilişkilidir. Kanser hücrelerinde yüksek derecede eksprese edilmektedir. [87]



### 3.1 Materyal

#### 3.1.1 DeneYlerde Kullanılan Cihazlar

- Biyogüvenlik Kabini – Mikrotest MLF120
- Buzdolabı – Arçelik A+
- Sıvı Azot Tankı – International Cryogenics IC-20D
- Işık Mikroskobu – Soif
- Santrifüj Cihazı – Nüve Nf 400
- CO<sub>2</sub> İnkübatör – Esco CelCulture
- Hassas Terazı – OHAUS Pioneer PA214C
- Elisa Reader – BioTek PowerWave XS2
- Saf Su Cihazı – Sartorius
- Çalkalayıcı – JSR JSSB-30T
- Floresan Mikroskop – ZEISS AxioVert01
- Soğutmalı Santrifüj Cihazı – Hettich D78532
- Mini Santrifüj Cihazı – Inovia
- Nanodrop – Thermo Scientific™ ND-ONE-W
- Elektroforez Güç Kaynağı – Thermo Electron Corporation Ec250-90
- UV Masası – Uvitec BXT-F20.M
- Thermal Cycler – Bio-Rad T100
- qPCR Cihazı – Applied Biosystem 7500

#### 3.1.2 DeneYlerde Kullanılan Kimyasallar

- Etil Alkol – Alkomed
- Dulbecco's Medified Eagle Medium (DMEM) – SİGMA D6429-500ML
- Penisilin/Streptomisin – CAPRICORN PS-B
- Fetal Sığır Serumı – Thermo Fisher / 10500064

- Tripsin EDTA – WISENT 325-542 EL
- Fosfat Tamponlu Solüsyon (PBS) – WISENT 311-012LL
- Juglon – Acros Organics CAS: 481-39-0
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) – GOLDBIO 298-93-1
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) – BioUltra 41639
- WST-1 Kiti – Cayman 10008883
- Gram Kristal Viyole Çözeltisi – MERCK 109218
- Metanol – MERCK 106008
- DAPI – Cayman 14285
- Total RNA İzolasyon Kiti – GENEALL 305-101
- Kloroform – Sigald 34854
- Agaroz (HMA) – Sigma A9539
- Syber Safe Boya – EZView Stain A4205
- 2X RNA Yükleme Boyası – Thermo Scientific™ R0641
- Formaldehit – AMRESCO 0493
- cDNA Sentez Kiti – E0804-02/EURx
- Primer – Senteligo(TM)
- Syber Green Master Mix – BioLine BIO-98020

## 3.2 Metot

### 3.2.1 Hücre Kültürü Yöntemleri

#### 3.2.1.1 Hücre Kültür Besiyerinin Hazırlanması

Son konsantrasyonda %89 DMEM, %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin olacak şekilde 500 ml DMEM içerisine 56,2 ml FBS ve 5,6 ml Penisilin/Streptomisin eklenerek stok besiyeri hazırlandı. Hazırlanan stok besiyeri +4 °C'de saklandı. Kontaminasyon riskini en aza indirmek için 50 ml'lik alikotlar halinde kullanılmıştır.

#### 3.2.1.2 C6 Rat Glioma Hücre Soyu

Deneylerde kullanılan glioma hücre soyu Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden temin edilmiştir. *Rattus Norvegicus* beyin tümöründe izole edilmiş olan donmuş hücreler çözündürüldükten

sonra 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarında büyütülmüş ve optimal metabolizmaya ulaştıklarında pasaj işlemi sonrası 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarına ekimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda 25 pasajın altındaki hücreler kullanıldı.

### **3.2.1.3 C6 Rat Glioma Hücre Açma İşlemi**

Azot tankından alınan donmuş hücreler 37°C'ye gelince Biyogüvenlik kabini içerisinde hücreler eppendorftan alınıp boş falkona aktarılır ve üzerine 3 ml tam besiyeri eklenir. Hücreler 5 dakika 1000 rpm hızda santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır ve pellet üzerine 3 ml tam besiyeri eklenir. Dikkatli pipetaj yapılan hücreler T25 hücre kültür kabına aktarılır ve üzerine 2 ml tam besiyeri eklenerek 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> atmosferli inkübatöre kaldırılır.

### **3.2.1.4 C6 Rat Glioma Hücre Dondurma**

Metabolizması optimal seviyeye ulaşmış hücreleri yedekleme amacıyla dondurma işlemi uygulanmıştır. Dondurma solüsyonu için %10 DMSO ve %90 tam besiyeri kullanılmıştır. Biyogüvenlik kabini içerisinde T75 kültür kaplarında pasajı gelen hücrelerden besiyerleri çekilmiş ve 12 ml 1X PBS ile yıkanmışlardır. 1X PBS uzaklaştırıldıktan sonra 3 ml tripsin eklenerek 2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübatörden çıkarılan hücrelerin üzerine yüzeyden kaldırma reaksiyonunu durdurmak için 6 ml tam besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Oluşan karışım falkona alınarak santrifüj cihazına yerleştirilmiş ve 1000 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında pelleti kaldırmadan süpernatant çekilmiş ve üzerine hazırlanan dondurma solüsyonundan 2 ml eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. 1'er ml 2 adet eppendorfa eklenmiş ve hızlıca -20°C'ye kaldırılmıştır. Hücreler donduktan sonra 1 gece -80 °C'de bekletilmiş ve ardından azot tankına kaldırılmıştır.

### **3.2.1.5 C6 Rat Glioma Pasaj İşlemi**

Işık mikroskopunda incelenen hücrelerin yüzeyi tek katman halinde kapladığı belirlendikten sonra pasaj işlemi uygulanarak yeni kültür kaplarına alınır. Biyogüvenlik kabini içerisinde kültür kabındaki besiyeri çekilir ve 12 ml 1X PBS ile tüm yüzey hızlıca yıkanır. Yıkama işleminin ardından 3 ml tripsin eklenerek 2 dakika boyunca inkübatörde hücrelerin yüzeyden kalkması beklenir. İnkübatörden alınan hücrelerin yüzeyden kalktıklarından emin olunduktan sonra

tripsinin üzerine 6 ml tam besiyeri eklenerek yüzeyden kaldırma işleminin durması sağlanır. Kültür kabının içerisinde pipetaj yapılarak tüm hücreler çekilip boş falkona aktarılır. Falkonda tekrar pipetaj yapılarak hücrelerin birbirlerinden ayrılmaları sağlanır. Yeni T75 kültür kabına istenen oranda hücre eklenerek kültür kabında 12 ml tam besiyeri olacak şekilde üzeri tamamlanır. Hücreler 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> atmosferli inkübatöre kaldırılır

### 3.2.1.6 Hücre Sayma İşlemi

Pasaj aşamasına gelmiş olan hücreler yüzeyden kaldırılıp falkona aktarılır ve 5 dakika 1000 rpm hızdan santrifüj yapılır. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp üzerine 10 ml tam besiyeri eklenerek hücreler birbirlerinden tamamen ayrılana kadar pipetaj yapılır. Pipetajın ardından 10 µl çekilerek Thoma lamına aktarılır ve ışık mikroskopunda sayım yapılır. 1 ml içerisinde bulunan hücre sayısı;

$$\text{Hücre Sayısı} = A \times 10^4$$

A: Thoma lamında sayılan hücrelerin ortalaması

formülüyle hesaplandı ve her test öncesi bu işlem tekrar edilerek ekilmesi gereken hücre miktarları belirlendi.

### 3.2.2 Juglon Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Molekül ağırlığı 174,16 g/mol olan ve moleküler formülü C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> olan juglon hassas terazide tartılır. Tartılan değere göre;

$$n = \frac{m}{m_A}$$

n: Mol değeri

m: Tartılan maddenin ağırlığı (gram)

m<sub>A</sub>: Tartılan maddenin moleküler ağırlığı (g/mol)

olacak şekilde mol değeri hesaplanır. Stok solüsyonu 40 mM elde etmek için ise;

$$M = \frac{n}{V}$$

M: Molar değeri

V: Maddenin hacmi (ml)

formülü kullanılarak eklenmesi gereken DMSO miktarı belirlenir. Hazırlanan stok juglon çözeltisinden;

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

eşitliği kullanılarak deneylerde kullanılacak ara stoklar tam besiyeri ile seyreltilerek hazırlandı. Her testten önce taze stok solüsyonu hazırlandı.

### **3.2.3 Sitotoksisite Analizleri**

#### **3.2.3.1 MTT Yöntemi**

96 kuyucuklu plate kullanılan yöntemde Goldbio markalı MTT maddesinin protokolü uygulandı. Her kuyucukta 200  $\mu$ l tam besiyeri ve  $10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılıp ve 24 saat inkübe edildi. İlk kuyucuk kontrol kuyucuğu olarak belirlenerek bir ekleme yapılmadı. Diğer kuyucuklara sırasıyla 5-10-15-20-40-80  $\mu$ M juglon dozları uygulandı ve 24 saat inkübatörde bırakıldı. Doz uygulama süresi tamamlanınca 1 ml 1X PBS içerisinde 5 mg MTT olacak şekilde MTT solüsyonu hazırlandı ve alüminyum folyoya sarılıp saklandı. Kontrol kuyucuğu da dahil her kuyucuğa 10  $\mu$ l MTT solüsyonu eklendi ve 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklarda bulunan besiyeri ve MTT solüsyonu dikkatlice çekilerek her kuyucuğa 100  $\mu$ l DMSO eklenip 15 dakika inkübe edildi. Sonuçlar ELISA okuyucuda 570 nm absorbands değerinde ölçüldü. Test üç tekrarlı gerçekleştirildi.

#### **3.2.3.2 WST-1 Yöntemi**

96 kuyucuklu plate kullanılan yöntemde her kuyucukta 100  $\mu$ l tam besiyeri ve  $10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılıp ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. İlk kuyucuk kontrol kuyucuğu olarak belirlenerek bir ekleme yapılmadı. Diğer kuyucuklara sırasıyla 5-10-20-40  $\mu$ M juglon dozları uygulandı ve 24 saat inkübatörde bırakıldı. WST-1 kitinde bulunan WST-1 Geliştirici Reaktifi ve Elektron Aracı Solüsyonu 1:1 oranında karıştırıldı. 24 saat dozla inkübe olmuş olan hücrelerin her kuyucuğuna 10  $\mu$ l WST-1 karışımı eklendi ve 1 dakika çalkalayıcıda hafifçe çalkalandı. Ardından 2 saat inkübatörde bekletildi ve oluşan rengin homojen dağılılabilmesi için tekrar 1 dakika çalkalandı. Çalkalama işlemi sonrası ELISA okuyucuda 450 nm absorbands değerinde ölçüldü. Test üç tekrarlı gerçekleştirildi.

### 3.2.4 Proliferasyon Analizleri

#### 3.2.4.1 Koloni Oluşum Testi

6 kuyucuklu plate kullanılan yöntemde her kuyucuğa  $2.10^5$  adet hücre ekilip üzerleri 2 ml tam besiyeri ile tamamlandı ve 24 saat inkübe edildi. İlk kuyucuk kontrol kuyucuğu olarak belirlendi ve doz uygulaması yapılmadı. Diğer kuyucuklara sırasıyla  $5 \mu\text{M}$  ve  $10 \mu\text{M}$  juglon dozları eklendi ve 24 saat inkübatöre kaldırıldı. 24 saat inkübasyonun ardından önce kontrol kuyucuğunun besi ortamı uzaklaştırıldı ve 2 ml 1X PBS ile yıkandı. Yıkandıktan sonra 0,5 ml tripsin eklenerek inkübatörde 2 dakika hücrelerin yüzeyden kalkması beklendi. Kalkan hücreler üzerine 1 ml tam besiyeri eklenerek pipetajla hücrelerin tamamı çekilerek boş falkona aktarıldı. Falkondaki hücreler Thoma lamı ile sayıldı ve yeni bir 6 kuyucuklu plate içinde belirlenen kuyucuğa 250 adet kontrol kuyucuğundan elde edilen hücrelerden ekilip üzeri 2 ml tam besiyeri ile tamamlandı. Aynı işlemler sırasıyla dozlar için de uygulandı. Son halinde sırasıyla kontrol,  $5 \mu\text{M}$  juglon dozlu ve  $10 \mu\text{M}$  juglon dozlu 250'şer adet hücre bulunan plate 10 gün  $37^\circ\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübe edildi. 10 günün sonunda besi ortamları çekildi ve kuyucuklara 2'şer damla kristal moru damlatılıp 15 dakika çalkalayıcıya bırakıldı. Hücreler boyandıktan sonra boya akarsu altında uzaklaştırıldı ve oluşan kolonilerin görüntüleri alındı. Test üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

#### 3.2.4.2 Yara İyileşmesi Testi

24 kuyucuklu plate kullanılan yöntemde Thoma lamında sayılan hücrelerin her kuyucukta  $5.10^4$  hücre olacak şekilde  $500 \mu\text{l}$  tam besiyeri ile ekimi gerçekleştirildi ve inkübatöre kaldırıldı. 24 saatin ardından tüm kuyucukların tam ortasından  $100 \mu\text{l}$  mikropipet ucuyla dik bir şekilde yüzeylerine çizgi çekildi. Hemen arkasından ilk kuyucuk kontrol olarak belirlenip doz eklenmedi ve sırasıyla diğer kuyucuklara  $5 \mu\text{M}$  ve  $10 \mu\text{M}$  juglon dozları uygulandı. ZEN 3.4 (blue version) programı kullanılarak tüm kuyucuklarda oluşturulan yaraların boyutları ölçülüp kaydedildi. Yara ölçüm işlemi 24 saat sonra da gerçekleştirildi. Test üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

### 3.2.5 DAPI Boyama

Pasajı gelen hücreler T75 hücre kültür kabından kaldırılarak 3 adet (Kontrol grubu – 5  $\mu$ M doz – 10  $\mu$ M doz olacak şekilde) T25 kültür kaplarına ekildi. Hücreler yüzeyin %80'inini kapladığı zaman gerekli juglon dozları kültür kaplarına uygulandı. 24 saat dozla inkübasyonun ardından boyama işlemi için Dapi ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Dapi stok solüsyonu 1X PBS içerisinde 300 nm – 1  $\mu$ M olacak şekilde karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım alüminyum folyoya sarılıp +4°C'de saklandı. Kontrol ve dozların bulunduğu kültür kaplarındaki besi ortamları çekildi ve 5 ml 1X PBS ile yıkandı. -20 °C metanolden 5'er ml her kültür kabına eklendi ve +4°C'de 10 dakika hücrelerin yüzeye sabitlenmesi beklendi. Hücreler yüzeye sabitlendikten sonra metanoller kültür kaplarından çekildi ve kaplar 5 ml 1X PBS ile yıkandı. Üzerlerine 5 ml 1X PBS ve Dapi karışımından eklendi ve karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 10 dakika boyanın hücreleri boyaması için beklendi. Ardından boyama solüsyonu çekilerek son kez kaplar 5 ml 1X PBS ile yıkandı ve floresan mikroskopunun DAPI merceğiyle görüntü alındı.

### 3.2.6 Moleküler Biyolojik Analizler

#### 3.2.6.1 Total RNA İzolasyonu

Pasajı gelen hücreler T75 hücre kültür kabından kaldırılarak 3 adet (Kontrol grubu – 5  $\mu$ M doz – 10  $\mu$ M doz olacak şekilde) T25 kültür kaplarına ekildi. Hücreler yüzeyin %80'inini kapladığı zaman gerekli juglon dozları kültür kaplarına uygulandı. 24 saat dozla inkübasyonun ardından Hybrid-R™ Total RNA İzolasyon Kiti kullanılarak izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Öncelikle kültür kaplarındaki besi ortamları uzaklaştırıldı. Her kabın içerisine 2,5 ml RiboEx™ (total RNA izolasyon solüsyonu) eklenerek pipetaj yapıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Her kabın içerisine 500  $\mu$ l kloroform eklendi ve 15 dakika hızlı bir şekilde çalkalandı. Ardından 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip karışımlar nükleaz free mikrosantrifüj tüplerine alındı. Mikrosantrifüj tüplerindeki örneklerin 15 dakika +4°C'de 12000 xg hızda santrifüj işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonrası her tüpte oluşan üç fazdan en üstteki faz çekilerek yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine çekilen miktarla eşit miktarda Buffer RBI eklendi. Hafifçe karıştırıldıktan sonra karışımdan 700  $\mu$ l çekilerek F tipi mini kolonlu tüpe

aktarılarak 10000 xg hızda 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Mini kolonun altına dökülen sıvı atıldı ve tekrar 700  $\mu$ l karışımdan eklendi ve santrifüj gerçekleştirildi. Tekrar altta kalan sıvı atıldı ardından mini kolona 500  $\mu$ l Buffer SWI eklenerek 10000 xg hızda 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Altta kalan sıvı atıldı ve aynı işlem 500  $\mu$ l Buffer RNW eklenerek tekrarlandı. Opsiyonel olarak 10000 xg hızda 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapıldı ve mini kolon yeni bir nükleaz free mikrosantrifüj tüpüne koyulup üzerine 100  $\mu$ l nükleaz free su eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında inkübenin ardından aktarılarak 10000 xg hızda 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Örnekler için doğrulama testi yapıldıktan sonra -20 °C'de stoklandılar.

### **3.2.6.2 Total RNA Miktarının Belirlenmesi**

Total RNA örneklerinden 1'er  $\mu$ l alınarak ve nükleaz free su ile blank alınarak nanodropta miktar tayini yapıldı.

### **3.2.6.3 Total RNA'nın Jel Üzerinde Analizi**

Tüm elektroforez aparatları DEPC' li su ile yıkanarak temizlendi. %1' lik jel hazırlamak için, 0,75 g Agaroz tartılıp 15 ml 5 X MOPS çözeltisi, 46,875 ml DEPC' li su karışımına eklenip çözdürüldü ve 60 °C'ye soğutuldu. İçerisine 60 °C' ye ısıtılmış 13,125 ml formaldehit ilave edilip, jel tepsisine döküldü ve donması beklendi.

Her bir RNA örneğinden nanodropta ölçülen miktarlara uygun olarak alınıp üzerine 2  $\mu$ l 5 X MOPS, 3,5  $\mu$ l formaldehit, 10  $\mu$ l formamid ve 0,5  $\mu$ l Etidyum Bromid ilave edilerek, 55 °C' de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra bu karışıma 2  $\mu$ l yükleme tamponu ilave edildi ve örnekler jele yüklendi. Total RNA' lar 100 V' ta 10 dakika ve 60 V' da 1 saat yürütüldü.

### **3.2.6.4 Total RNA'dan cDNA Sentezi**

Elde edilen 3 adet total RNA örneğinden cDNA sentezlemek için smART First Strand cDNA Sentez Kiti kullanıldı. RNA örneklerinin nanodropla ölçülen miktarlarına göre cDNA sentez için 1  $\mu$ g kullanılacak şekilde RNA miktarı kullanıldı. RNaz free PCR tüpleri içerisine ölçülen miktarlarda total RNA eklendi. Üzerine cDNA sentez kitinden 1  $\mu$ l primer, 1  $\mu$ l 10 mM dNTP karışımı eklendi. Tüm karışımın tamamı 12,5  $\mu$ l olacak şekilde RNaz free su eklendi. 5 x cDNA

Buffer vortekslenip karışımın üzerine 4  $\mu\text{l}$  eklendi. Ardından sırasıyla 2  $\mu\text{l}$  DTT 0.1 M, 0,5  $\mu\text{l}$  RNaz inhibitör 50 U/ $\mu\text{l}$  ve son olarak 1  $\mu\text{l}$  smART (200 U/ $\mu\text{l}$ ) eklenerek Thermal cyclera yerleştirildi ve tablodaki aşamalar uygulandı.

**Tablo 3.1** Thermal Cycler reaksiyonu

Sıcaklık	Süre
25 °C	10 dakika
50 °C	50 dakika
85 °C	5 dakika

### 3.2.6.5 cDNA Miktarının Belirlenmesi

cDNA örneklerinden 1'er  $\mu\text{l}$  alınarak ve nükleaz free su ile blank alınarak nanodropta miktar tayini yapıldı. Örnekler -20 °C'de stoklandılar.

### 3.2.6.6 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Yöntemi İçin Primerlerin Hazırlanması

qPCR işlemi için tablodaki primerler belirlendi ve Sentebiolab tarafından üretilen liyofilize halde primerlerin her birine sentez raporlarında belirlenen miktarda nükleaz free su eklendi ve 100  $\mu\text{M}$  likit halde primerler elde edildi.

**Tablo 3.2:** RT- qPCR ileri ve ters primerleri

Gen	İleri Primer	Ters Primer
<b>B-ACTIN</b>	CTCTGTGTGGATTGGTGGCT	GCAGCTCAGTAACAGTCCGC
<b>BAX</b>	GAGGACTCCAGCCACAAAGA	CGAGCTGATCAGAACCATCA
<b>BCL-2</b>	TATATGGCCCCAGCATGCGA	GGCAGGTTTGTGACCTCA
<b>KASPAZ3</b>	GGAGCTTGGAACGCGAAGAA	ACACAAGCCCATTTTCAGGGT
<b>PARP1</b>	TCTACTTTGCTGATATGGTGTCC	TGGGTAACCTTGCTGATGTGAG
<b>MMP-8</b>	TGGAGTGTGCCATCAACCCTGAC	CACCATGGTCTCTTGAGACGAAAGC

SYBR-Green Master Mix kitinin protokolüne göre primerlerin nükleaz free su ile seyreltilerek 10  $\mu\text{M}$  primerler elde edildi.

### 3.2.6.7 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Yöntemi

PCR yöntemine kontrol grubu ve 5  $\mu$ M doz uygulanmış grupla devam edilmeye karar verildi. PCR plate düzeni yatay sütunlar sırayla kontrol – 5  $\mu$ M juglon dozu olacak şekilde ve dikey sütunlar Tablo 3.2'deki sırayla genler uygulanacak şekilde belirlendi. İlk yatay kuyucukların tamamına 2'şer  $\mu$ l kontrol cDNA'sı, ikinci yatay kuyucuklara 5  $\mu$ M juglon uygulanmış hücrelerin cDNA'sı eklendi. Her kuyucuğa 6'şer  $\mu$ l nükleaz free su ve 10'ar  $\mu$ l Sybr-Green Master Mix eklendi. Son olarak kuyucuklarda hangi gen test edilecekse o genin 1  $\mu$ l ters ve 1  $\mu$ l ileri primerinden eklendi ve 20  $\mu$ l son hacim elde edildi. PCR döngüsü Tablo 3.3'teki şekilde ayarlandı.

**Tablo 3.3:** qPCR için PCR cihazı programı

PCR Adımı	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95 °C	2 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	5 saniye	40
Bağlanma	60 °C	10 saniye	
Uzama	72 °C	30 saniye	

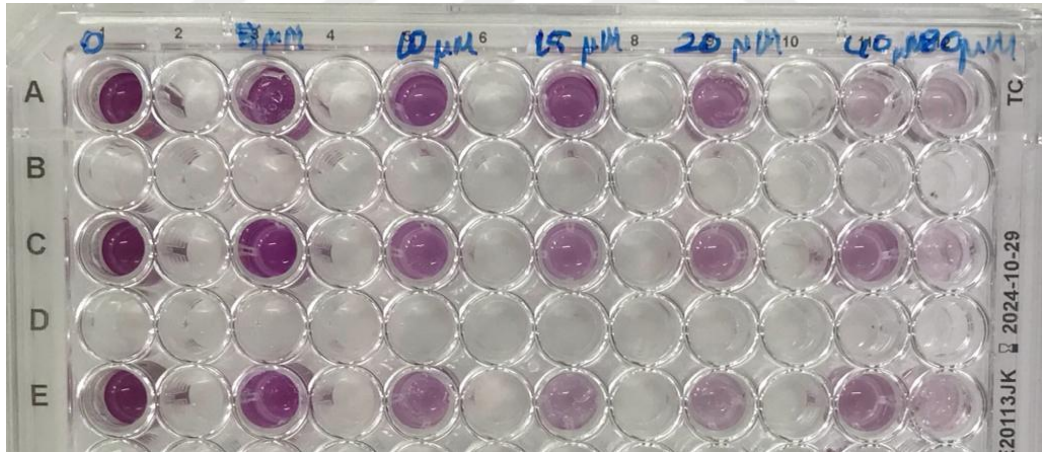
### 3.2.7 İstatistiksel Analizler

MTT ve WST-1 testi sonucu elde edilen verilerin IC<sub>50</sub> ve R<sup>2</sup> değeri GraphPad Prism 9.3.0 Version programı ile belirlendi. Koloni oluşum testi sonucunda oluşan koloniler ImageJ programıyla sayıldı. Yara iyileşmesi testi sonucu hücre kaplı alan ve yara alanı Wimasis programıyla hesaplandı. DAPI boyama sonucu elde edilen hücreler ImageJ programıyla sayıldı. RT-qPCR belirlenen gen ifadesi seviyeleri Livak yöntemiyle  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (delta delta ct) değeri hesaplanarak belirlendi. Tüm sonuçların kontrole göre istatistiksel anlamlılık değerleri GraphPad Prism programı one-way ANOVA yöntemi kullanılarak hesaplandı. Tüm analizlerde; p değeri (güven aralığı) 0,05 olarak alındı.

### 4.1 Sitotoksisite Analizleri

#### 4.1.1 MTT Yöntemi

24 saat deney süresi boyunca C6 glioma hücrelerine uygulanan juglonun 5-10-15-20-40-80 $\mu$ M olmak üzere 6 farklı konsantrasyonunun sitotoksik etkileri MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. Deney grupları ve kontrol kuyucuklarında mor renk oluşumunun ardından (Şekil 4.1), juglonun farklı konsantrasyonlarıyla hazırlanan gruplar ile kontrol grubunun absorbens değerleri ölçüldü. Bu değerlendirmenin ardından yapılan istatistiksel analizlerde tüm deney gruplarının kontrole göre anlamlılığına bakıldı.

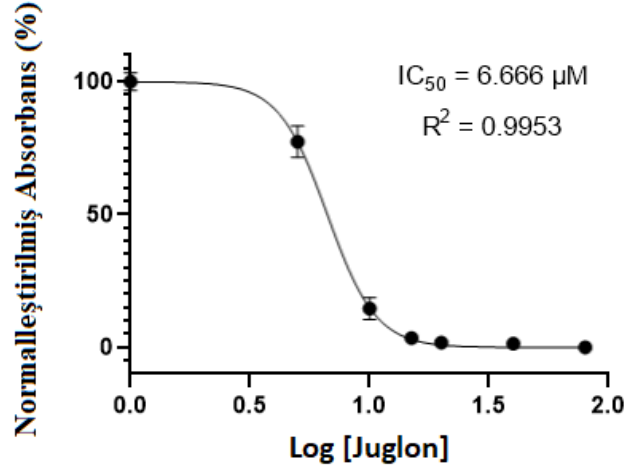


Şekil 4.1 MTT yöntemi sonucu canlılığa göre mor renk alan hücreler



Şekil 4.2 Kontrol grubunun ve farklı doz uygulanmış deney gruplarının absorbens değerleri

Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık sonucu  $p < 0,0001:****$  olarak belirlendi. Deney gruplarının kontrole göre aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Çalışmanın devamında  $IC_{50}$  değerine göre 2 farklı doz belirleneceği için  $IC_{50}$  değeri ve bu değer anlamlılığını gösteren  $R^2$  değeri hesaplandı. (Şekil 4.3)

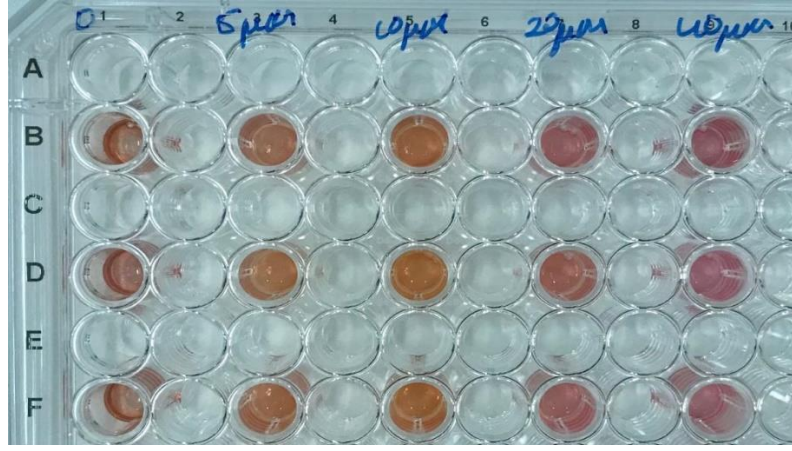


**Şekil 4.3** Normalize edilmiş absorbans değerlerinin juglonun logaritmik değerlerine göre grafik eğrisi

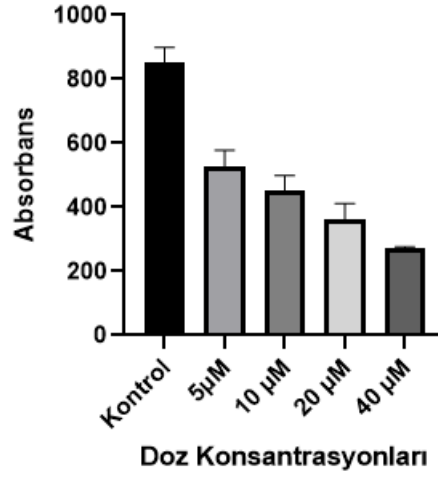
$IC_{50}$  değeri kontrol grubu hücrelerinin canlılık değerleri %100 kabul edilerek  $6,666 \mu M$  olarak hesaplandı ve sonucun  $R^2$  değeri  $0.9953$  olarak belirlendi. Hesaplanan  $IC_{50}$  değeri istatistiksel olarak anlamlı bulundu. MTT testiyle belirlenen  $IC_{50}$  değeri sonucuna göre çalışmanın devamında kullanılacak deney gruplarının dozları  $5 \mu M$  ve  $10 \mu M$  olarak belirlendi.

#### 4.1.2 WST-1 Yöntemi

24 saat deney süresi boyunca C6 glioma hücrelerine uygulanan juglonun  $5-10-20-40 \mu M$  olmak üzere 4 farklı konsantrasyonunun sitotoksik etkileri WST-1 yöntemi kullanılarak belirlendi. Deney grupları ve kontrol kuyucuklarında renk değişiminin ardından (Şekil 4.4), juglonun farklı konsantrasyonlarıyla hazırlanan gruplar ile kontrol grubunun absorbans değerleri ölçüldü. Bu değerlendirmenin ardından yapılan istatistiksel analizlerde tüm deney gruplarının kontrole göre anlamlılığına bakıldı.

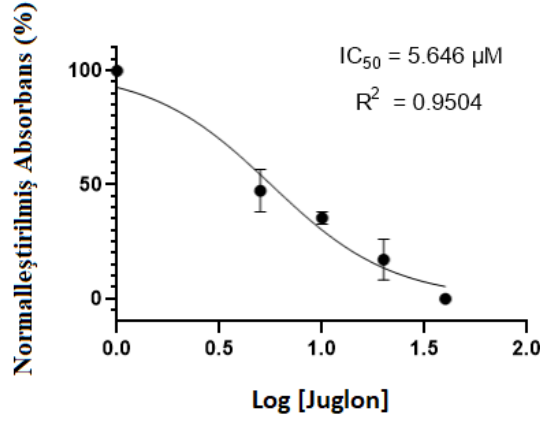


Şekil 4.4 WST-1 yöntemi sonucu canlılığa göre renk değiştiren hücreler



Şekil 4.5 Kontrol grubunun ve farklı doz uygulanmış deney gruplarının absorbans değerleri

Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık sonucu  $p < 0,0001:****$  olarak belirlendi. Deney gruplarının kontrole göre aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Çalışmanın devamında  $IC_{50}$  değerine göre 2 farklı doz belirleneceği için  $IC_{50}$  değeri ve bu değer anlamlılığını gösteren  $R^2$  değeri hesaplandı. (Şekil 4.6)



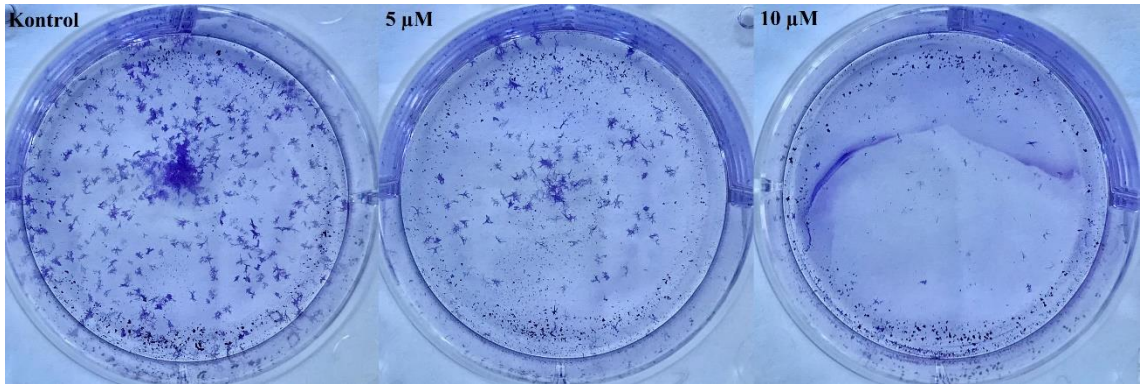
**Şekil 4.6** Normalize edilmiş absorbans değerlerinin juglonun logaritmik değerlerine göre grafik eğrisi

$IC_{50}$  değeri kontrol grubu hücrelerinin canlılık değerleri %100 kabul edilerek 5,646  $\mu M$  olarak hesaplandı ve sonucun  $R^2$  değeri 0.9504 olarak belirlendi. Hesaplanan  $IC_{50}$  değeri istatistiksel olarak anlamlı bulundu. WST-1 testiyle belirlenen  $IC_{50}$  değeri sonucuna göre çalışmanın devamında kullanılacak deney gruplarının dozları 5  $\mu M$  ve 10  $\mu M$  olarak belirlendi ve MTT testi sonucu belirlenen  $IC_{50}$  değerini destekler nitelikte sonuç alındı.

## 4.2 Proliferasyon Analizleri

### 4.2.1 Koloni Oluşum Testi

24 saat deney süresi boyunca C6 glioma hücrelerine uygulanan juglonun 5  $\mu M$  ve 10  $\mu M$  dozlarının hücrelerin koloni oluşumuna ve hayatta kalımına etkisi incelendi. Dozlarla muameleden 10 gün sonra oluşan koloniler boyanarak görünür hale getirildi. (Şekil 4.7)

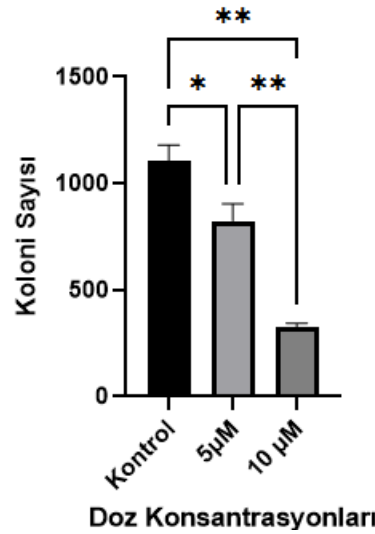


**Şekil 4.7** Görünür hale getirmek için boyanan hücrelerin kolonileri  
Oluşan kolonilerin sayıları hesaplandı. (Tablo 4.1) Koloni sayılarının kontrole göre ve birbirlerine göre anlamlılık düzeyleri istatistiksel olarak hesaplandı. (Şekil 4.8)

Kontrole göre koloni sayısındaki azalmanın ve kontrol grupları arasındaki farkında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi.

**Tablo 4.1** Kontrol ve deney gruplarının koloni sayıları

Test Grupları	Koloni Sayısı
Kontrol	1106
5 $\mu$ M	835
10 $\mu$ M	327



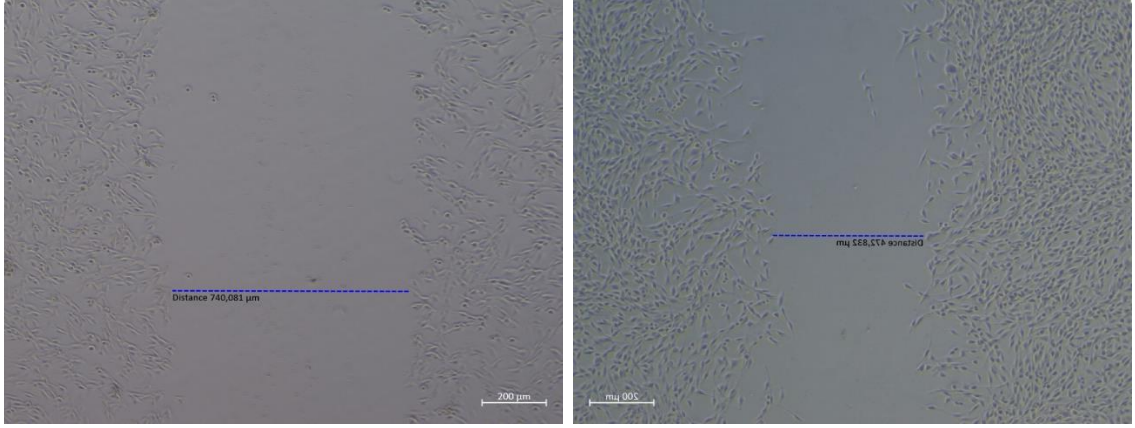
**Şekil 4.8** Kontrol grubu ve deney gruplarının koloni sayıları ve aralarındaki farkın istatistiksel değerlendirilmesi

p<0,05: \*

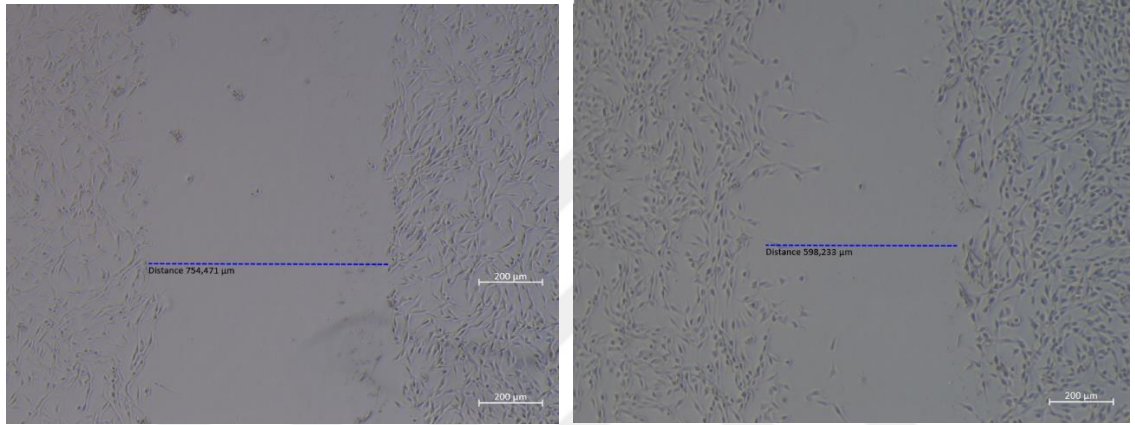
p<0,01: \*\*

#### 4.2.2 Yara İyileşmesi Testi

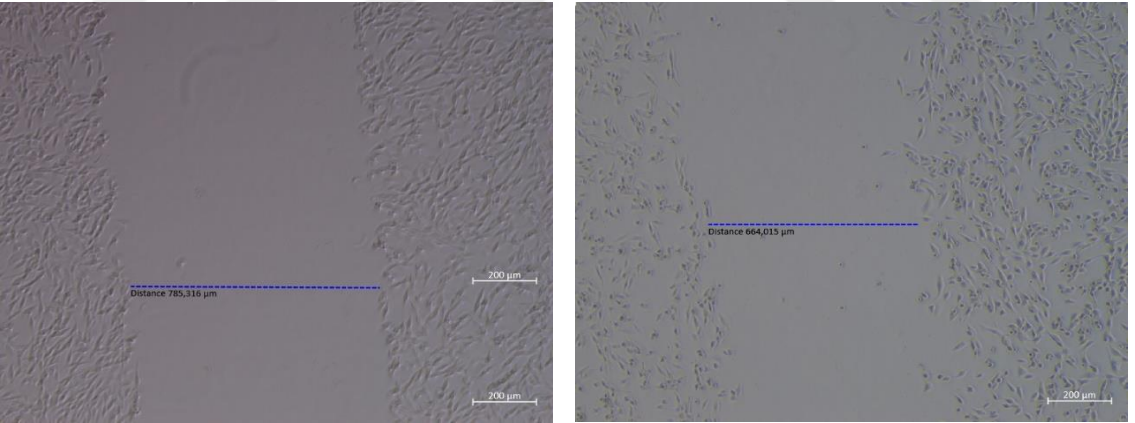
Kontrol grubu ve deney grubu hücrelerinin sırasıyla yara izinin oluşturulduğu anda ve 24 saat sonra görüntüleri alınan teste hücrelerin doza bağımlı olarak kontrol grubuna göre yara iyileşme oranları test edilmiştir. Bu oranın hesaplanabilmesi için yara izinin oluşturulduğu gün ve 24 saat sonra görüntülerden yara izi alanı ve hücre kaplı alan yüzdesi belirlenmiştir (Şekil 4.9) ve grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.10).



a) Kontrol

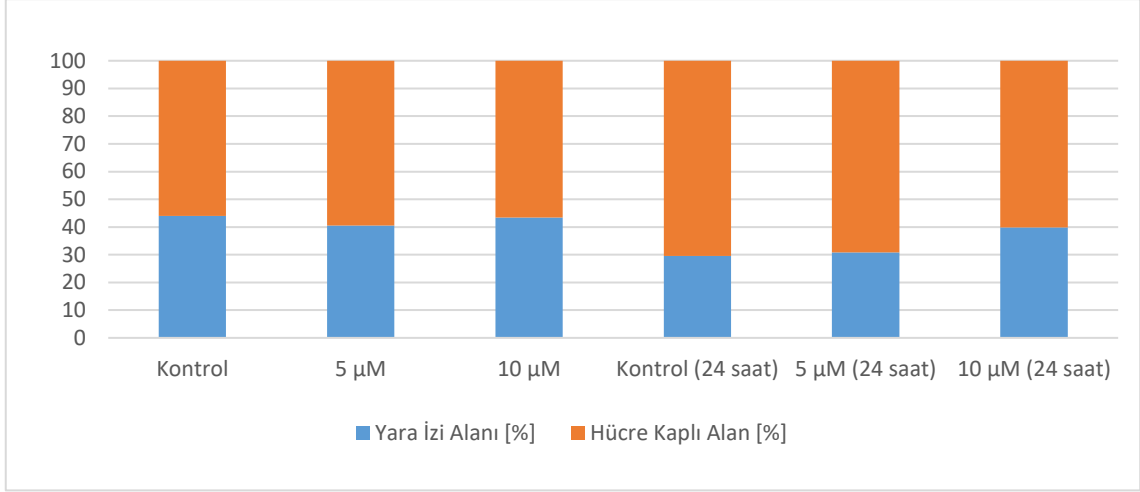


b) 5 µM



c) 10 µM

**Şekil 4.9** Hücrelerde yaranın oluşturulduğu günün ve 24 saat sonrasının sırasıyla görüntüleri

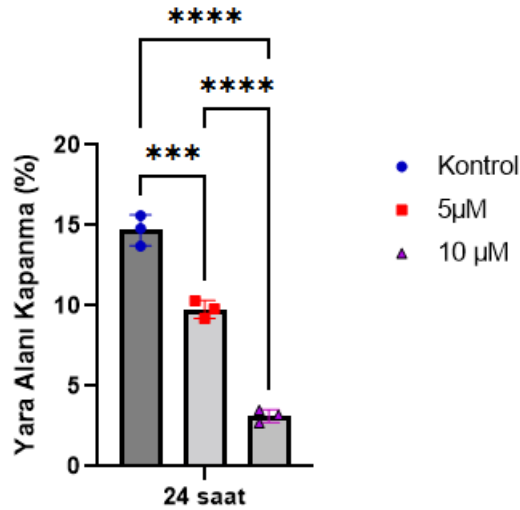


Şekil 4.10 Yara iyileşme yüzdelerinin grafiği

Tablo 4.2 Test gruplarından 2 farklı zamanda alınan ölçüm sonucu

Test Grupları	Yara İzi Alanı (%)		Hücre Kaplı Alan (%)	
	İlk Ölçüm	24 saat	İlk Ölçüm	24 saat
Kontrol	44	29,6	56	70,4
5 µM	40,6	30,8	59,4	69,2
10 µM	43,4	39,9	56,6	60,1

Test gruplarındaki yara iyileşme oranının azalmasının istatistiksel anlamlılığı hesaplandı. (Şekil 4.11) Kontrole göre doz uygulanmış gruplardaki yara iyileşme oranının azalması istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



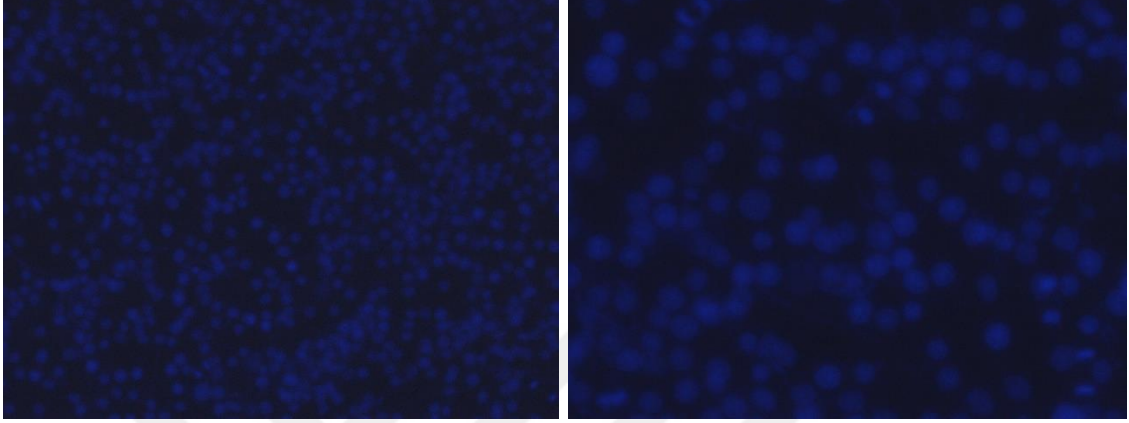
Şekil 4.11 Kontrole göre yara iyileşme oranlarının istatistiksel değerlendirmesi

p<0,001: \*\*\*

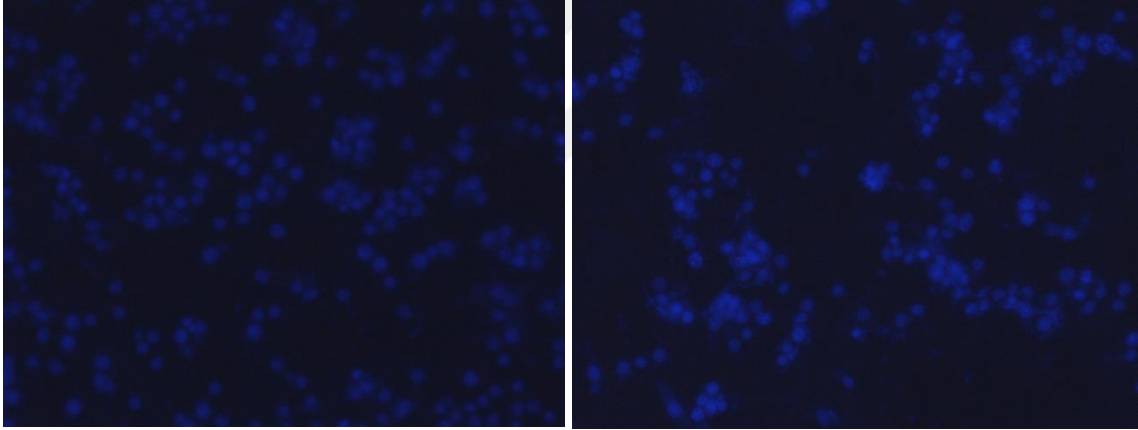
p<0,0001: \*\*\*\*

### 4.3 DAPI Boyama

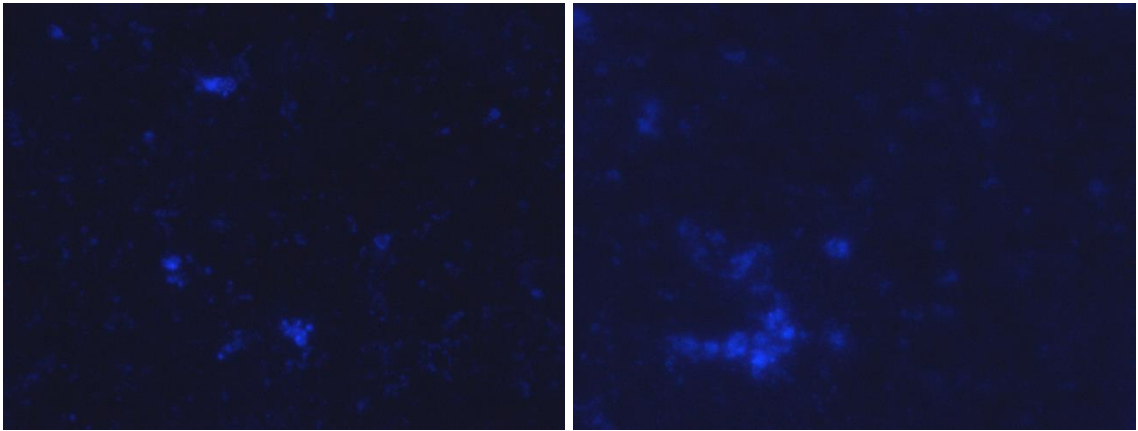
Kontrol grubu ve juglonun 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlu deney grupları 24 saat deney süreleri sonunda DAPI ile boyandı ve floresan mikroskobu altında görüntüleri alındı. Görüntülerle, deney süresi sonunda meydana gelen morfolojik farklılaşmalar gözlemlendi, aynı zamanda hücrelerin sayımı yapıldı. (Tablo 4.3)



a) Kontrol grubu



b) 5  $\mu\text{M}$



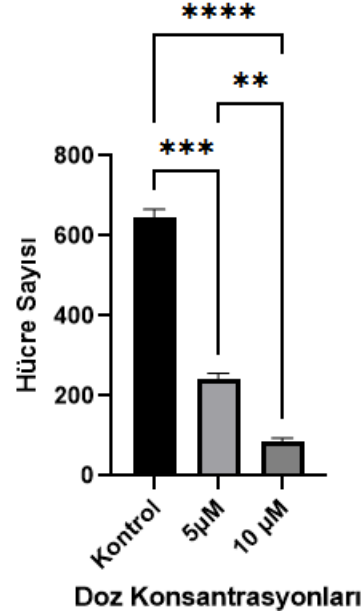
c) 10  $\mu\text{M}$

**Şekil 4.12** DAPI ile boyanan hücrelerin sırasıyla 5x ve 10x görüntüleri

**Tablo 4.3** Hücrelerin 24 saat sonunda sayıları ve kapladığı alan yüzdeleri

Test Grupları (5x)	Hücre Sayısı	Hücrelerin Kapladığı Alan
Kontrol	645	%18,7
5 $\mu$ M	241	%10,5
10 $\mu$ M	86	%1,8

Hücre sayısındaki doza bağlı azalmaların kontrole göre anlamlılığı istatistiksel olarak belirlendi. (Şekil 4.13)



**Şekil 4.13** Doz uygulanmış kültürlerdeki hücre sayısının doza bağımlı istatistiksel değerlendirilmesi

$p < 0,01$ : \*\*

$p < 0,001$ : \*\*\*

$p < 0,0001$ : \*\*\*\*

İstatistiksel hesaplamalara göre kontrole göre dozlarda anlamlı bir azalma gözlemlendi.

## 4.4 Moleküler Biyolojik Analizler

### 4.4.1 Total RNA Miktarının Belirlenmesi

Elde edilen total RNA'ların nanodropla ölçümü yapıldı. (Tablo 4.4)

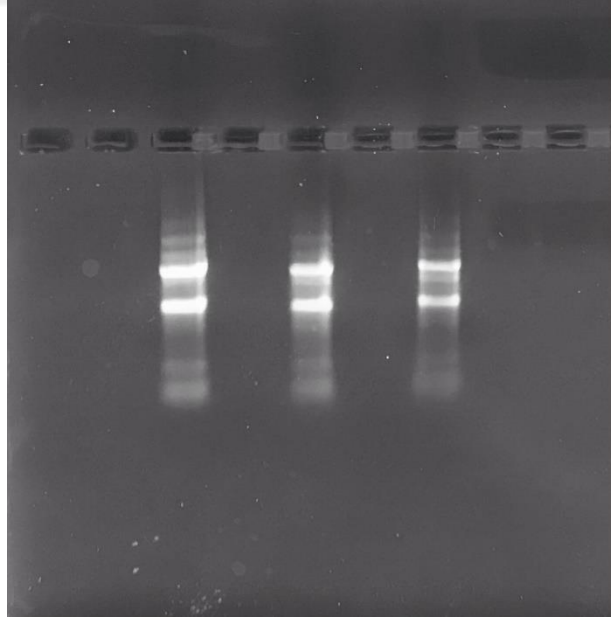
**Tablo 4.4** Total RNA'ların nanodropla ölçüm sonuçları

Test Grupları	ng/ $\mu$ L	A260/A280
Kontrol grubu	476,8	2,13
5 $\mu$ M	363,5	2,15
10 $\mu$ M	307,1	1,92

İzole edilen ve nanodrop yardımıyla hesaplanan total RNA örneklerinin konsantrasyonları, çalışmanın sonraki basamağını oluşturan cDNA sentezinde kullanılan total RNA miktarına ulaşmak amacıyla kullanıldı.

### 4.4.2 Total RNA'nın Jel Üzerinde Analizi

Elde edilen total RNA'lar saflığını belirlemek ve Kontaminasyon olup olmadığını gözlemlemek amacıyla jelde yürütüldü.



**Şekil 4.14** Jel üzerinde yürütülen total RNA (sırasıyla kontrol, 5  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M) sonuçları

Jelde yürütülen total RNA sonuçlarına göre örneklerde kontaminasyon belirlenmediği için cDNA sentezi işlemi aynı örneklerle devam ettirildi.

#### 4.4.3 cDNA Miktarının Belirlenmesi

Sentezlenen cDNA'ların saflığını belirlemek amacıyla ve qPCR yönteminde belirlenen miktarda kullanabilmek amacıyla nanodropla ölçümleri yapıldı. (Tablo 4.5)

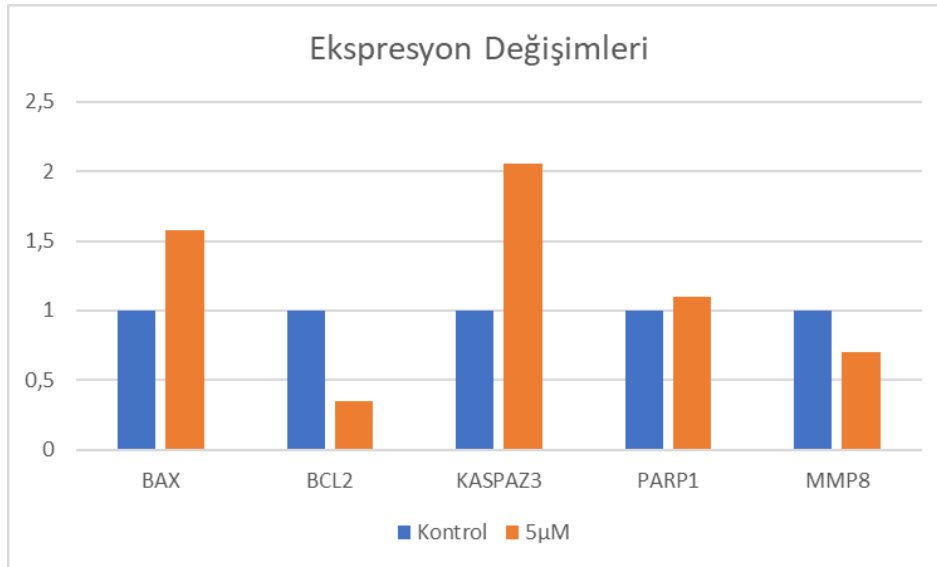
**Tablo 4.5** Tamamlayıcı DNA'ların nanodropla ölçüm sonuçları

Test Grupları	ng/ $\mu$ L	A260/A280
Kontrol grubu	1352,1	1.81
5 $\mu$ M	1184,1	1.81
10 $\mu$ M	1305,1	1.79

Elde edilen cDNA'ların saflığı uygun olarak belirlendi ve qPCR yönteminde kullanılmak üzere protokole istenilen şekilde seyreltilti.

#### 4.4.4 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Yöntemi

Juglonun, 24 saat süreyle, C6 glioma hücre hattı üzerinde apoptotik ve proliferatif süreçlerde görev alan genlerin ifade seviyelerinde meydana getirdiği değişimler qPCR yöntemi ile tespit edildi. Tüm örneklerin Ct değerleri kalibratör geni olarak kullanılan  $\beta$ -Actin genine göre katlanma değişimi ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) hesaplandı.



**Şekil 4.15** Belirlenen Genlerin İfade Seviyelerindeki Değişimler

Pro-apoptotik genlerden olan BAX, KASPAZ3 genlerinin ifade seviyelerinde 5  $\mu$ M doz uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlemlenirken anti-apoptotik genlerden biri olan BCL2 ifadesi seviyesinde anlamlı bir azalma gözlemlendi. Proliferasyonda görev alan bir gen olan MMP8 seviyesinde anlamlı bir azalma gözlemlendi. PARP1 ifade seviyesinde ise kontrol grubuna göre bir artış gözlemlendi ama bu artış seviyesinin anlamlı ölçüde olmadığı belirlendi.



### 5.1 Sonuç

Bu çalışmada juglonun sitotoksik, apoptotik ve anti-proliferatif etkilerini gözlemlemek için çeşitli yöntemler kullanıldı. Gerçekleştirilen MTT ve WST-1 testleri sonucunda juglonun C6 Rat glioma hücreleri üstündeki sitotoksitesisi ve IC<sub>50</sub> değeri belirlendi. Bu değer MTT için 6,666  $\mu$ M, WST-1 için 5,646  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. Çalışmanın devamında gerçekleştirilen koloni formasyon testiyle IC<sub>50</sub> değeri desteklendi ve sırasıyla 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M doz uygulaması yapılan hücrelerin proliferasyon yeteneklerinde azalma gözlemlendi. Aynı zamanda bu deneyde azalan hücre sayısına bağlı olarak koloni sayısında azalma görüldü. Yara iyileşmesi deneyinde doz uygulaması yapılan gruplarda oluşturulmuş yara alanının 5  $\mu$ M dozda kontrol grubuna göre daha az kapandığı, 10  $\mu$ M dozda ise hem kontrol hem de 5  $\mu$ M doza göre daha az bir kapanma olduğu gözlemlendi. Bu deneyi baz alarak juglonun artan dozla birlikte hücre çoğalmasında bir azalmaya ve dolayısıyla yara iyileşme becerisinde bir düşüşe yol açtığını söylemek mümkündür.

Morfolojik inceleme için gerçekleştirilen DAPI boyama sonrası uygulanan doz grupları ve kontrol grubu mikroskopla incelendi, görüntüleri alındı. Yine doza bağlı olarak hücre sayısında bir azalma ve artan dozla birlikte hücrelerin morfolojilerinde değişme gözlemlendi. Bu deneyden yola çıkarak juglonun hücre sayısına ve morfolojisine etki ettiğini söylemek mümkündür. Bu deneyin sonucu da önceki deneyleri destekler niteliktedir. Yapılan istatistiksel analizler kontrol grubu ve doz grupları arasındaki değişimin anlamlı olduğunu göstermektedir.

Çalışmanın son aşaması olarak gerçekleştirilen RT-qPCR deneyi ile juglon uygulaması sonrası BAX, BCL2, Kaspaz3, PARP1, MMP8 genlerinin ifade seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla 5  $\mu$ M dozda nasıl bir değişim olduğu incelendi. Deney sonucunda Ct değerleri elde edildi ve kalibratör gen olan Beta-actine dayanarak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) hesaplaması gerçekleştirildi. Sonuç olarak BAX geninin

ifade seviyesinde 5µM dozda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış, BCL2 gen ifadesinde anlamlı bir azalma, Kaspaz3 gen ifadesinde anlamlı bir artış, PARP1 gen ifadesinde anlamlı olmayan bir artış, MMP8 gen ifadesinde anlamlı bir azalma görüldü. Gerçekleştirilen bu deneyden yola çıkarak juglonun C6 Rat glioma hücreleri üstünde 5 µM dozda apoptoza sürükleyici ve proliferasyonu azaltan bir etkisinin olduğunu söylemek mümkündür.

## 5.2 Tartışma

Bu çalışmada elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, HL-60 hücre hattı üzerinde 2-*N*-aminonaphthoquinonelar ile gerçekleştirilen bir sitotoksikite çalışmasına yakın bulunmuştur. HL-60 hücreleri için IC<sub>50</sub> değeri 4 µM olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada başka hücre hatları üzerinde de ölçümler yapılmış ve HCT-8 hücreleri için 3,38 µM, OVCAR-8 için 9,61 µM, sağlıklı hücre hattı olan PBMC için ise 29,89 µM olarak olduğunu göstermişlerdir.[88] Bu çalışmadan yola çıkarak IC<sub>50</sub> değerinin hücre hattına ve kullanılan sitotoksikite yöntemine bağlı olarak farklılık gösterdiği söylenebilir. Yapılan başka bir benzer çalışmada juglonun PC3 ve DU145 hücre hatları üstünde 10 µg/ml (57 µM) dozda sitotoksik ve apoptotik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada doz uygulama süresine bağlı olarak, doz miktarında bir artış olmamasına rağmen maruz kalma süresi arttıkça hücre ölüm oranının arttığını göstermişlerdir.[89] Buna bağlı olarak juglonun IC<sub>50</sub> değerinin doz uygulama süresi arttıkça azaldığını söylemek mümkün olabilir.

B16F1 hücre hattında gerçekleştirilen bir çalışmada koloni formasyon testi sonuçları bu araştırmada bulduğumuz juglon doz artışına bağlı olarak koloni sayısında azalma bulgusuna paraleldir. Bu nedenle juglonun C6 glioma hücre hatları dışında, başka hücre hatlarında benzer anti-proliferatif etkiler gösterdiği söylenebilir. [90] Farklı hücre hatlarında juglonun benzer etkiler göstermesi juglonun etkili bir sitotoksik ajan olduğunu öne sürmeyi sağlamaktadır. HaCat hücre hattı üstünde gerçekleştirilen bir çalışmada juglonun ve başka bir quinone olan plumbagin'in sitotoksik etkisi olduğunu ve bu nedenle kolonilerin sayısında bariz bir azalma tespit ettiklerini göstermişlerdir. Bu çalışmada juglon için bulunan IC<sub>50</sub> değeri 9 µM olarak belirtilmiştir. [37] Koloni oluşturma

yeteneğindeki azalmanın doz uygulaması sonrası hücrelerde oluşan hücrelerin bölünme ve göç etme yeteneklerine olan etkisinden kaynaklandığı söylenebilir.

U-251 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada juglonun apoptotik, hücre migrasyonunda azalmaya ve yara iyileşmesinde azalmaya yol açıcı etkileri gözlemlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan deney yöntemleri arasında olan yara iyileşme testi, MTT testi sonuçları ve Kaspaz3 ifadesi değişiklikleri benzerlik göstermektedir. [91] Gerçekleştirdiğimiz çalışmada benzer sonuçların elde edilmesi juglonun yara iyileşmesinde olumsuz etkiye yol açtığını, hücre göçünü azalttığını ve gen ifade seviyelerinde değişim yarattığını desteklemektedir. Kanser hattında gerçekleştirilmiş bir başka benzer çalışmada da juglonun DAPI boyama yöntemiyle apoptotik etkilerinin var olduğu gösterilmiştir. [92] Bu yöntemle hücrelerin boyanması, doz uygulaması yapılan gruplarda meydana gelen değişimi gözle görülür bir biçimde anlaşılabilmesini sağlamıştır. Elde edilen benzer sonuçlar juglonun hücre morfolojisinde deformasyona yol açtığını ve apoptoz sonucu oluşmuş apoptotik cisimciklerin ortaya çıktığını göstermektedir.

Yapılan başka bir benzer çalışmada c-Jun N-terminal kinase/c-Jun yolağı kullanılarak juglonun yarattığı apoptotik ve anti-proliferatif etkiler tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada juglon doz uygulaması sonrası BAX ve Kaspaz3 gen ifadelerinde bir artış görüldüğü belirtilmiştir.[93] Bu sonuçlar pro-apoptotik genlerden olan BAX ve Kaspaz3 ifadesinin juglon uygulaması sonrasında kontrol grubuna kıyasla bir değişime uğradığını ve hücre sayısında gerçekleşen azalmanın bu genlerin ifadelerindeki değişime bağlı gerçekleşen bir apoptozla gerçekleşmiş olabileceğini göstermektedir. HL-60 hücreleri üstünde yapılan başka bir çalışmada ise juglon uygulamasının bizim çalışmamızla paralel olarak kontrol grubuna kıyasla Kaspaz3 gen ifadesini arttırdığı, BAX gen ifadesini arttırdığı ve BCL-2 gen ifadesini azalttığını göstermişlerdir. [94] Juglonun birçok çalışmada birçok farklı hücre hattı üstünde gerçekleştirilen deneyler, deney metotlarına ve kullanılan test yöntemlerine bağlı olarak ufak farklılıklar göstermektedir. Ancak bütün çalışmalarda gözlemlenen ortak nokta juglonun birçok hücre hattı üzerinde bizim çalışmamızda da gözlemlendiğimiz gibi sitotoksik, apoptotik ve anti-proliferatif etkileri olduğu üzerinedir.

### 5.3 Öneriler

Yapılan çalışmada juglonun bir kanser hücre hattı olan C6 Rat glioma hücre hattı üstünde gösterdiği sitotoksik, apoptotik ve anti-proliferatif etkiler göz önüne alarak juglonu 5  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M dozda etkili bir ajan olarak öne sürmek mümkündür. Özellikle 5 $\mu$ M dozda gerçekleştirilen RT-qPCR deneyinin sonuçlarından yola çıkarak juglonun kanser hücrelerine etki ettiği söylenebilir. Yapılan başka bir çalışmada juglonun efektifliğinin nanopartikül yöntemi kullanılarak arttırılabileceği gösterilmiştir. [9] Juglonun etki mekanizmalarının protein modifikasyonları ve post-translasyonel modifikasyonlarla nasıl bir ilişki içinde olduğunu göstermek için Western-blotting yöntemi ile daha ileri araştırmalar gerçekleştirilebilir.

Juglonun farklı kanser türlerine etki ettiğini söylemek mümkün olsa da [91,93] bu etkisinin aynı zamanda sağlıklı hücre hatlarında ne düzeyde ve ne tür mekanizmalarla etkisini gösterdiği araştırılmalıdır. Juglonun kanser türlerinin tedavisinde potansiyel olarak bir terapötik ajan olarak kullanılıp/kullanılmayacağına belirlenmesi mümkündür ancak bunun gerçekleştirilmesi için daha ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

- [1] GBD 2015 Mortality and Causes of Death, Collaborators. (8 October 2016). "Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015". *Lancet*. 388 (10053): 1459–1544. doi:10.1016/s0140-6736(16)31012-1. PMC 5388903. PMID 27733281.
- [2] Begley S (16 September 2008). "Rethinking the War on Cancer". *Newsweek*. Archived from the original on 10 September 2008. Retrieved 8 September 2008.
- [3] Bayram D, Özgöçmen M, Armagan I, Sevimli M, Türel GY, Şenol N. Investigation of apoptotic effect of juglone on CCL-228-SW 480 colon cancer cell line. *J Can Res Ther* 2019;15:68-74
- [4] Zhang, XB., Zou, CL., Duan, YX. et al. Activity guided isolation and modification of juglone from *Juglans regia* as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med* 15, 396 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0920-0>
- [5] Karki, N., Aggarwal, S., Laine, R. A., Greenway, F., & Losso, J. N. (2020). Cytotoxicity of juglone and thymoquinone against pancreatic cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 109142. doi:10.1016/j.cbi.2020.109142
- [6] Sugie, S., Okamoto, K., Rahman, K. M. W., Tanaka, T., Kawai, K., Yamahara, J., & Mori, H. (1998). Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Letters*, 127(1-2), 177–183. doi:10.1016/s0304-3835(98)00035-4
- [7] Kiran Aithal, B., Sunil Kumar, M. R., Nageshwar Rao, B., Udupa, N., & Satish Rao, B. S. (2009). Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. *Cell Biology International*, 33(10), 1039–1049. doi:10.1016/j.cellbi.2009.06.018

- [8] Zmantar, T., Miladi, H., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Ben Slama, R., Bakhrouf, A., ... Chaieb, K. (2016). Use of juglone as antibacterial and potential efflux pump inhibitors in *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity. *Microbial Pathogenesis*, 101, 44–49. doi:10.1016/j.micpath.2016.10.022
- [9] Arasoglu, T., Derman, S., Mansuroglu, B., Yelkenci, G., Kocyigit, B., Gumus, B., ... Kocacaliskan, I. (2017). Synthesis, characterization and antibacterial activity of juglone encapsulated PLGA nanoparticles. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1407–1419. doi:10.1111/jam.13601
- [10] "Cancer – Signs and symptoms". NHS Choices. Archived from the original on 8 June 2014. Retrieved 10 June 2014.
- [11] "Defining Cancer". National Cancer Institute. 17 September 2007. Retrieved 28 March 2018.
- [12] "Cancer". World Health Organization. 12 September 2018. Retrieved 19 December 2018.
- [13] "Obesity and Cancer Risk". National Cancer Institute. 3 January 2012. Archived from the original on 4 July 2015. Retrieved 4 July 2015.
- [14] Jayasekara H, MacInnis RJ, Room R, English DR (May 2016). "Long-Term Alcohol Consumption and Breast, Upper Aero-Digestive Tract and Colorectal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Alcohol and Alcoholism*. 51 (3): 315–30. doi:10.1093/alcalc/agv110. PMID 26400678.
- [15] Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB (September 2008). "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes". *Pharmaceutical Research*. 25 (9): 2097–116. doi:10.1007/s11095-008-9661-9. PMC 2515569. PMID 18626751.
- [16] World Cancer Report 2014. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 1.1. ISBN 978-92-832-0429-9. Archived from the original on 12 July 2017.
- [17] "Hereditiy and Cancer". American Cancer Society. Archived from the original on 2 August 2013. Retrieved 22 July 2013.

- [18] Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, Gapstur S, Patel AV, Andrews K, Gansler T (2012). "American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* *Cancer J Clin.* 62 (1): 30–67. doi:10.3322/caac.20140. PMID 22237782. S2CID 2067308.
- [19] Parkin DM, Boyd L, Walker LC (December 2011). "16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010". *British Journal of Cancer.* 105 Suppl 2: S77–81. doi:10.1038/bjc.2011.489. PMC 3252065. PMID 22158327.
- [20] Flaherty, K. T., Infante, J. R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R. F., Sosman, J., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J., Ibrahim, N., Kudchadkar, R., Burris, H. A., 3rd, Falchook, G., Algazi, A., Lewis, K., Long, G. V., Puzanov, I., Lebowitz, P., Singh, A., Little, S., ... Weber, J. (2012). Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *The New England journal of medicine*, 367(18), 1694–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1210093>
- [21] GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence, Collaborators. (8 October 2016). "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015". *Lancet.* 388 (10053): 1545–1602. doi:10.1016/S0140-6736(16)31678-6. PMC 5055577. PMID 27733282.
- [22] Sciacovelli, Marco; Schmidt, Christina; Maher, Eamonn R.; Frezza, Christian (2020). "Metabolic Drivers in Hereditary Cancer Syndromes". *Annual Review of Cancer Biology.* 4: 77–97. doi:10.1146/annurev-cancerbio-030419-033612.
- [23] World Cancer Report 2014. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 1.1. ISBN 978-92-832-0429-9.
- [24] "cancer | Origin and meaning of cancer by Online Etymology Dictionary".
- [25] Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü., (2012). "Kanser Biyokimyası", *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*: 1(2): 7-18.

- [26] Knudson AG (November 2001). "Two genetic hits (more or less) to cancer". *Nature Reviews. Cancer*. 1 (2): 157–62. doi:10.1038/35101031. PMID 11905807. S2CID 20201610.
- [27] Nelson DA, Tan TT, Rabson AB, Anderson D, Degenhardt K, White E (September 2004). "Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis". *Genes & Development*. 18 (17): 2095–107. doi:10.1101/gad.1204904. PMC 515288. PMID 15314031.
- [28] Valencia, A., Cervera, J., Such, E., Barragán, E., Bolufer, P., Fuster, O., Collado, R., Martínez, J., & Sanz, M. A. (2009). Complex Variant t(9;22) Chromosome Translocations in Five Cases of Chronic Myeloid Leukemia. *Advances in hematology*, 2009, 187125. <https://doi.org/10.1155/2009/187125>
- [29] Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (December 2006). "Cancer as an evolutionary and ecological process". *Nature Reviews. Cancer*. 6 (12): 924–35. doi:10.1038/nrc2013. PMID 17109012. S2CID 8040576.
- [30] Hanahan D, Weinberg RA (January 2000). "The hallmarks of cancer". *Cell*. 100 (1): 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9. PMID 10647931. S2CID 1478778.
- [31] Lind MJ (2008). "Principles of cytotoxic chemotherapy". *Medicine*. 36 (1): 19–23. doi:10.1016/j.mpmed.2007.10.003.
- [32] Emil Frei, I. I. I.; Eder, Joseph Paul (2003). *Combination Chemotherapy*. Retrieved 4 April 2020.
- [33] Dear RF, McGeechan K, Jenkins MC, Barratt A, Tattersall MH, Wilcken N (December 2013). "Combination versus sequential single agent chemotherapy for metastatic breast cancer". *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2021 (12): CD008792. doi:10.1002/14651858.CD008792.pub2. PMC 8094913. PMID 24347031.
- [34] Prince, Jim McMorran, Damian Crowther, Stew McMorran, Steve Youngmin, Ian Wacogne, Jon Pleat, Clive. "tumour radiosensitivity – General Practice Notebook". Archived from the original on 24 September 2015.

- [35] Hill R, Healy B, Holloway L, Kuncic Z, Thwaites D, Baldock C (March 2014). "Advances in kilovoltage x-ray beam dosimetry". *Physics in Medicine and Biology*. 59 (6): R183–231. Bibcode:2014PMB....59R.183H. doi:10.1088/0031-9155/59/6/r183. PMID 24584183. S2CID 18082594.
- [36] Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12354/>
- [37] Inbaraj, J. J., & Chignell, C. F. (2004). Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chemical research in toxicology*, 17(1), 55–62. <https://doi.org/10.1021/tx034132s>
- [38] Soderquist, Charles J. (1973). "Juglone and allelopathy". *Journal of Chemical Education*. 50 (11): 782–3. Bibcode:1973JChEd..50..782S. doi:10.1021/ed050p782. PMID 4747927.
- [39] Cook, M.T. (1921). "Wilting caused by walnut trees". *Phytopathology*. 11: 346.
- [40] Schneiderhan, F.J. (1926). "Apple disease studies in northern Virginia". *Virginia Agricultural Experiment Station Bulletin*. 245: 1–35.
- [41] Massey, A.B. (1928). "Are nut trees poisonous to other trees and plants?". *Flower Grower*. 15: 4.
- [42] Willis, Rick J. (2007-10-12). *The History of Allelopathy*. Springer Science & Business Media. ISBN 9781402040931.
- [43] Brown, B.I. (1942). "Injurious influence of bark of black walnut on seedlings of tomato and alfalfa". *North Nut Growers Association Annual Report*. 33: 97–102.
- [44] M. Strugstad (2012). "A Summary of Extraction, Synthesis, Properties, and Potential Uses of Juglone: A Literature Review". *Journal of Ecosystems and Management*. 13 (3): 72–82.
- [45] Gerald Booth "Naphthalene Derivatives" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2005, Wiley-VCH, Weinheim. doi:10.1002/14356007.a17\_009.
- [46] J. Khalafy; J.M. Bruce (2002). "Oxidative dehydrogenation of 1-tetralones: Synthesis of juglone, naphthazarin, and  $\alpha$ -

- hydroxyanthraquinones". *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*. 13 (2): 131–139.
- [47] Combes, M. R. (1907). "Bulletin de la Société chimique de France". Combes, Bull. Soc. Chim. (in French). 1 (4): 800–816. Retrieved 14 October 2016.
- [48] Cosmulescu, Sina Niculina; Trandafir, Ion; Achim, Gheorghe; Botu, Mihai; Baci, Adrian; Gruia, Marius (15 June 2010). "Phenolics of Green Husk in Mature Walnut Fruits". *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 38 (1): 53–56. doi:10.15835/nbha3814624 (inactive 31 October 2021). ISSN 1842-4309. Retrieved 11 October 2016.
- [49] Gries, G.A. (1943). "Juglone - the active agent in walnut toxicity". *Northern Nut Growers Association Annual Report*. 34: 52–55.
- [50] Schmidt, S.K. (1988). "Degradation of juglone by soil bacteria". *Journal of Chemical Ecology*. 14 (7): 1561–1571. doi:10.1007/bf01012522. PMID 24276429. S2CID 527864.
- [51] Fisher, R.F. (1978), Juglone Inhibits Pine Growth Under Certain Moisture Regimes. *Soil Science Society of America Journal*, 42: 801-803. <https://doi.org/10.2136/sssaj1978.03615995004200050030x>
- [52] Rietveld, W J (1983). "Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species". *J. Chem. Ecol.* 9 (2): 295–308. CiteSeerX 10.1.1.550.5739. doi:10.1007/bf00988047. PMID 24407348. S2CID 23491349.
- [53] Koeppe, D.E. (1972). "Some reactions of isolated corn mitochondria influenced by juglone". *Physiol. Plant.* 27: 89–94. doi:10.1111/j.1399-3054.1972.tb08573.x.
- [54] Hejl, A.M.; Einhellig, F.A.; Rasmussen, J.A. (1993). "Effects of juglone on growth, photosynthesis, and respiration". *J. Chem. Ecol.* 19 (3): 559–568. doi:10.1007/bf00994325. PMID 24248956. S2CID 22740992.
- [55] Einhellig F.A. 1986 Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In *The Science of Allelopathy*. Eds. A R Putnam and C S Tang. pp 171–188. John Wiley & Sons, New York

- [56] "Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping. I. Spatio-temporal variation in soil juglone in a black walnut-corn (*Zea mays* L.) alley cropping system in the midwestern USA (PDF Download Available)". ResearchGate. Retrieved 2017-04-20.
- [57] Dama L.B.; Jadhav B.V. (1997). "Anthelmintic effect of Juglone on mature and Immature *Hymenolepis nana* in mice". *Riv. Di Parassitol.* 2: 301–302.
- [58] Dama L.B.; Poul B.N.; Jadhav B.V. (1998). "Antimicrobial activity of Napthoquinonic compounds". *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.* 8: 213–215.
- [59] Dama L.B.; Poul B.N.; Jadhav B.V.; Hafeez MD. (1999). "Effect of "Juglone" on Development of the plant parasitic nematode (*Meloidogyne* Spp.) on *Arachis hypogaea* L". *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.* 9: 73–75.
- [60] Dama L.B. (2002). "Effect of naturally occurring naphthoquinones on root-knot nematode *Meloidogyne* spp". *Indian Phytopathology.* 55 (1): 67–69.
- [61] Chen, L; Na-Shun, B. Y.; Zhang, J; Yu, J; Gu, W. W. (Jun 2009). "Effect of juglone on the ultrastructure of human liver cancer BEL-7402 cells". *Nan Fang Yi Ke da Xue Xue Bao.* 29 (6): 1208–11. PMID 19726363.
- [62] Sugie, S.; Okamoto, K.; Rahman, K. M. W.; Tanaka, T.; Kawai, K.; Yamahara, J.; Mori, H. (1998). "Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats". *Cancer Lett.* 127 (1–2): 177–183. doi:10.1016/s0304-3835(98)00035-4. PMID 9619875.
- [63] Ji, Yu-Bin; Qu, Zhong-Yuan; Zou, Xiang (2011). "Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway". *Experimental and Toxicologic Pathology.* 63 (1–2): 69–78. doi:10.1016/j.etp.2009.09.010. PMID 19815401.
- [64] Inbaraj, J. Johnson; Chignell, Colin F. (2004). "Cytotoxic Action of Juglone and Plumbagin: A Mechanistic Study Using HaCaT Keratinocytes". *Chemical Research in Toxicology.* 17 (1): 55–62. doi:10.1021/tx034132s. PMID 14727919.
- [65] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of

- Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131:803–820. [PubMed] [Google Scholar]
- [66] Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., & Sweet, W. (1968). Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. *Science*, 161(3839), 370–371. doi:10.1126/science.161.3839.370
- [67] Kłopocka, W., Korczyński, J., & Pomorski, P. (2013). Cytoskeleton and nucleotide signaling in glioma C6 cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 986, 103–119. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4719-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4719-7_6)
- [68] Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A (April 2018). "Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives" (PDF). *Acta Histochemica*. 120 (3): 159–167. doi:10.1016/j.acthis.2018.02.005. PMID 29496266.
- [69] Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction". *Biotechnology Annual Review*. 11: 127–52. doi:10.1016/S1387-2656(05)11004-7. ISBN 9780444519528. PMID 16216776.
- [70] Mosmann T (December 1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods*. 65 (1–2): 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID 6606682.
- [71] Berridge MV, Tan AS (June 1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 303 (2): 474–82. doi:10.1006/abbi.1993.1311. PMID 8390225.
- [72] "Water Soluble Tetrazolium Salts (WSTs)" (PDF, 0.4 MB). [interchim.com]. Interchim. Retrieved 2013-08-12.
- [73] By Rogan Grant - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=35400804>

- [74] By Edgar181 - Own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2463538>
- [75] Ngunjiri, J. M.; Sekellick, M. J.; Marcus, P. I. (2008). "Clonogenic Assay of Type a Influenza Viruses Reveals Noninfectious Cell-Killing (Apoptosis-Inducing) Particles". *Journal of Virology*. 82 (6): 2673–80. doi:10.1128/JVI.02221-07. PMC 2258965. PMID 18184709.
- [76] Rodriguez LG, Wu X, Guan JL (2005). "Wound-healing assay". *Methods in Molecular Biology*. 294: 23–9. doi:10.1385/1-59259-860-9:023. ISBN 1-59259-860-9. PMID 15576902.
- [77] Jonkman JE, Cathcart JA, Xu F, Bartolini ME, Amon JE, Stevens KM, Colarusso P (October 2014). "An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy". *Cell Adhesion & Migration*. 8 (5): 440–51. doi:10.4161/cam.36224.
- [78] Kapuscinski, J (2017). "Interactions of nucleic acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes". *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 38 (9): 1323–1329. doi:10.1177/38.9.1696951. PMID 1696951.
- [79] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments". *Clinical Chemistry*. 55 (4): 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797. PMID 19246619.
- [80] By Zuzanna K. Filutowska - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29759883>
- [81] Watson, J D; Baker, T A; Bell, S P; Gann, A; Levine, M; Losick, R (2004). *Molecular Biology of the Gene* (Fifth ed.). San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 978-0-321-22368-5.
- [82] Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Popp D, Robinson RC (Jun 2015). "The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments". *Journal of Cell Science*. 128 (11): 2009–2019. doi:10.1242/jcs.165563. PMID 25788699.

- [83] Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (July 1998). "Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis". *EMBO J.* 17 (14): 3878–85. doi:10.1093/emboj/17.14.3878. PMC 1170723. PMID 9670005.
- [84] Vaux DL, Cory S, Adams JM (September 1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells". *Nature.* 335 (6189): 440–2. Bibcode:1988Natur.335..440V. doi:10.1038/335440a0. PMID 3262202. S2CID 23593952.
- [85] Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (October 1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature". *Cell.* 87 (2): 171. doi:10.1016/S0092-8674(00)81334-3. PMID 8861900. S2CID 5345060.
- [86] Pascal JM (November 2018). "The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage". *DNA Repair.* 71: 177–182. doi:10.1016/j.dnarep.2018.08.022. PMC 6637744. PMID 30177435.
- [87] Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*, 141(1), 52–67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015
- [88] Montenegro, R. C., Araújo, A. J., Molina, M. T., Marinho Filho, J. D., Rocha, D. D., López-Montero, E., Goulart, M. O., Bento, E. S., Alves, A. P., Pessoa, C., de Moraes, M. O., & Costa-Lotuf, L. V. (2010). Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. *Chemico-biological interactions*, 184(3), 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.041>
- [89] Mahdavi, M., Azadbakht, M., Vahdati, A., Shokrzadeh, M., & Farhadi, A. (2019). Cytotoxic Effects of Juglone and *Pterocarya fraxinifolia* on Prostate Cancer Cells. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 11(3), 195–204. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_203\\_18](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_203_18)
- [90] Aithal, K. B., Kumar, S., Rao, B. N., Udupa, N., & Rao, S. B. (2012). Tumor growth inhibitory effect of juglone and its radiation sensitizing potential: in vivo and in vitro studies. *Integrative cancer therapies*, 11(1), 68–80. <https://doi.org/10.1177/1534735411403477>

- [91] Wang, J., Liu, K., Wang, X. F., & Sun, D. J. (2017). Juglone reduces growth and migration of U251 glioblastoma cells and disrupts angiogenesis. *Oncology reports*, 38(4), 1959–1966. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5878>
- [92] Shi, J. Y., Huang, Z. R., Gao, H. Y., & Xu, X. L. (2020). Anticancer effects of juglone in OVCAR-3 human ovarian carcinoma are facilitated through programmed cell death, endogenous ROS production, inhibition of cell migration and invasion and cell cycle arrest. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 25(2), 779–784.
- [93] Lu, Z., Chen, H., Zheng, X.-M., & Chen, M.-L. (2017). Experimental study on the apoptosis of cervical cancer Hela cells induced by juglone through c-Jun N-terminal kinase/c-Jun pathway. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(6), 572–575. doi:10.1016/j.apjtm.2017.06.005
- [94] Xu, H.-L., Yu, X.-F., Qu, S.-C., Zhang, R., Qu, X.-R., Chen, Y.-P., ... Sui, D.-Y. (2010). Anti-proliferative effect of Juglone from *Juglans mandshurica* Maxim on human leukemia cell HL-60 by inducing apoptosis through the mitochondria-dependent pathway. *European Journal of Pharmacology*, 645(1-3), 14–22. doi:10.1016/j.ejphar.2010.06.072

### Konferans Bildirileri

1. E. Bektaş, M.H. Müslümanoğlu, “C6 Glioma Hücre Hattında Juglonun Sitotoksik Etkileri”, 4. Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler Kongresi (UBBK-2021) Özet Bildirisi, sayfa 17, 6-7 Aralık 2021.

