

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

**DİDYMİN FLAVONOİDİNİN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTI
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN VE BU HÜCRELERDEN SALINAN
SUBSTANCE P VE İNTERLÖKİN-6 MİKTARLARI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

NAİME BULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2022-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

DİDYMİN FLAVONOİDİNİN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTI
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN VE BU HÜCRELERDEN SALINAN
SUBSTANCE P VE İNTERLÖKİN-6 MİKTARLARI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

NAİME BULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ECE ŞİMŞEK

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2021-5494 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2022-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne:

Bu alışma j¼rimiz tarafından Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Beslenme ve Diyetetik Y¼ksek Lisans Programında Y¼ksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.
.../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ece şİMşEK
Akdeniz ¼niversitesi
Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı

¼ye : Dr. Öğr. ¼yesi H¼lya KAMARLI ALTUN
Akdeniz ¼niversitesi
Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı

¼ye : Dr. Öğr. ¼yesi Bora EKİNCİ
Muęla Sıtkı Koçman ¼niversitesi
Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstit¼ M¼d¼r¼

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgisini, deneyimini, yardımını ve en önemlisi desteğini benden esirgemeyen tez danışmanım, değerli hocam sayın Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimlerini her daim paylaşmaktan çekinmeyen, desteğini ve inancını her zaman hissettiğim değerli hocam sayın Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmanın birçok aşamasında yardımını, bilgisini benden esirgemeyen; sorduğum her bir soruya sabırla verdiği içten yanıtlarından ötürü Doktora Öğrencisi Orhan KOÇAK'a çok teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca donanımıyla, güler yüzüyle yanımda olan değerli hocam sayın Öğr. Gör. Dr. Kübra Yıldırım'a çok teşekkür ederim.

Çalışmam için bizi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Çalışmamda gerek maddi gerek manevi desteğini benden esirgemeyen, her daim arkamda desteğini, inancını sonsuz hissettiğim biricik teyzem Sultan KARA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde sevgisini gördüğüm, eğitim hayatım boyunca bana inanan ve güvenen, verdiğim her kararda saygısını ve desteğini hissettiğim canım AİLEM'e sonsuz sevgimi ve teşekkürümü sunarım.

ÖZET

Amaç: U-87 MG İnsan Glioblastoma hücre hattında narenciye meyvelerinde yaygın olarak bulunan didymin flavonoidinin sitotoksik etkilerini ve hücrelerden salınan Substance P (SP) ve İnterlöklin 6 (IL-6) miktarları üzerine etkilerini incelemektir.

Yöntem: Didymin flavonoidinin glioblastoma hücrelerinde sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72.saatlik inkübasyon süreleri sonunda WST-1 Cell Proliferation Kit ile belirlenmiştir. Hücrelerden salınan Substance P (SP) ve İnterlöklin 6 (IL-6) miktarları üzerine etkileri Elisa kitler kullanılarak incelenmiştir.

Bulgular: Didymin flavonoidinin 100 – 1,56 $\mu\text{M}/\text{ml}$ aralığında denenen dozları 24. ve 48. saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Ancak 72. saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol grubuna kıyasla 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dozda sitotoksik etki görülmüştür. Didymin, SP ve IL-6 miktarlarında önemli artışa sebep olmuştur. SP miktarı, 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ve 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dozda 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda artmış ve 72. saatin sonunda ise anlamlı olarak azalmıştır. IL-6 miktarı, 24. saatin sonunda 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dozunda anlamlı olarak artmıştır. 48. saatte her dozda anlamlı artışa neden olmuş, 72. saatte ise yalnızca 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dozda anlamlı artış gözlenmiştir.

Sonuç: Çalışmada elde edilen veriler didymin'in glioblastoma hücrelerindeki sitotoksik etkisinden bahsedebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Didyminin yalnızca tek bir dozda sitotoksik etki göstermesi ve etkinin görüldüğü dozun içerdiği çözücü konsantrasyonun da tek başına sitotoksik etki göstermesi bu düşüncüyü desteklemektedir. Didymin tez kapsamında araştırdığımız inflamasyon belirteci IL-6 miktarını zamana ve doza bağımlı arttırmış, ağrı belirteci SP miktarını ise 72.saatın sonunda azaltmıştır. Didyminin U-87 MG hücrelerinden salınan SP ve IL- 6 üzerine etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışması bu konuda yapılan ilk çalışmadır. İnflamasyonu ve ağrıyı tetikleyici etkisinden net olarak bahsedebilmek için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: didymin, glioblastoma, sitotoksikite, substance p, interlöklin-6

ABSTRACT

Objective: To investigate the cytotoxic effects of didymin flavonoid, which is commonly found in citrus fruits on the U-87 MG Human Glioblastoma cell line, and its effects on levels of Substance P and Interleukin 6 (IL-6) released from the cells.

Method: The cytotoxic effects of didymin flavonoid on glioblastoma cells were determined with WST-1 Cell Proliferation Kit at the end of 24, 48 and 72 hours incubation periods. The effects on the amount of Substance P and Interleukin 6 (IL-6) released from cells were investigated using Elisa kits.

Results: Doses of didymin in the range of 100 – 1,56 $\mu\text{M}/\text{ml}$ did not show cytotoxic effects on cells at the end of the 24th and 48th hour incubation periods. However, at the end of the 72 hour incubation period, a cytotoxic effect was observed at a dose of 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ compared to the control group. Didymin caused a significant increase in the levels of Substance P and IL-6. The level of SP increased at 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ and 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ doses at the end of the 24 and 48 hours incubation periods and decreased significantly at the end of the 72nd hour. The level of IL-6 increased significantly at 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ at the end of the 24th hour. It caused a significant increase in each dose at the 48th hour, while a significant increase was observed only at the 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dose at the 72nd hour.

Conclusion: The data obtained in the study show that more studies are needed to talk about the cytotoxic effect of didymin on glioblastoma cells. The cytotoxic effect of didymin in only a single dose and the fact that the solvent concentration contained in the dose in which the effect was seen also showed a cytotoxic effect alone supports this idea. Didymin increased the level of inflammation marker IL-6, which we investigated within the scope of the thesis, in a time and dose-dependent manner, and decreased the amount of pain marker SP at the end of the 72nd hour. This thesis study, which investigated the effects of didymin on SP and IL-6 released from U-87 MG cells, is the first study on this subject. More *in vitro* and *in vivo* studies are needed to clearly talk about its inflammation and pain-inducing effect.

Key words: didymin, glioblastoma, cytotoxicity, substance p, interleukin-6

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. FLAVONOİDLER	5
2.1.1. Flavonlar	6
2.1.2. Flavonoller	6
2.1.3. Flavanoller	7
2.1.4. Flavanonlar	7
2.1.5. Antosiyaninler	7
2.1.6. İzoflavonlar	7
2.2. FLAVONOİDLERİN BESİN KAYNAKLARI	8
2.3. FLAVONOİDLERİN METABOLİZMASI	9
2.4. FLAVONOİDLERİN ÇEŞİTLİ BİYoloJİK AKTİVİTELERİ	11
2.4.1. Antioksidan Aktivite	11
2.4.2. Antibakteriyel Aktivite	12
2.4.3. Antiinflamatuvar Aktivite	13
2.4.4. Antikanser Aktivite	13

2.4.5. Antiviral Aktivite	14
2.4.6. Antidiyabetik Aktivite	15
2.5. KANSER	16
2.6. GLİOBLASTOMA	19
2.7. SUBSTANCE P (P MADDESİ)	22
2.8. İNTERLÖKİN 6 (IL-6)	23
2.9. DIDYMIN	25
2.10. DIDYMIN VE KANSER ÇALIŞMALARI	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. GEREÇLER	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	30
3.1.2. Kullanılan Kitler	30
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	30
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Hücre Kültürü Uygulamaları	31
3.2.2. Hücrelerin Açılması	31
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	32
3.2.4. Hücrelerin Stoklanması	32
3.2.5. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması	32
3.2.6. Hematositometre İle Hücrelerin Sayılması	32
3.2.7. Hücrelerin Bölünmesi	33
3.3. DIDYMIN FLAVONOİDİNİN HAZIRLANMASI VE HÜCRELERE UYGULANMASI	33
3.4. SİTOTOKSİSİTE DENEYLERİ	34
3.4.1. WST-1 Hücre Proliferasyon Testi	34
3.5. ELİZA TESTLERİ	34
3.5.1. Hücrelerden Besiyerine Salınan Substance P Miktarının Eliza Kit Belirlenmesi	34

3.5.2. Hücrelerden Besiyerine Salınan İnterlökin 6 (IL-6) Miktarının Eliza Kit ile Belirlenmesi:	36
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	37
4. BULGULAR	38
4.1. Didymin Flavonoidinin U87–MG Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin WST-1 Proliferasyon Testi ile Gösterilmesi	38
4.2. Hücrelerden Besiyerine Salınan Substance P Miktarının Eliza ile Belirlenmesi	45
4.3. Hücrelerden Besiyerine Salınan İnterlökin 6 (IL-6) Miktarının Eliza ile Belirlenmesi	48
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	70

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Yapısal farklılıklara bağı olarak flavonoidlerin sınıflandırılması	6
Tablo 2.2.	Flavonoidin temel yapısı ve flavonoidlerin alt sınıfları	8
Tablo 2.3.	Belirli kanser türlerinde didyminin uygulamaları ve etki mekanizmaları	29



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Flavonoidlerin başlıca moleküler etki mekanizmaları	14
Şekil 2.2.	Kanser hücrelerinin özellikleri	17
Şekil 2.3.	Didyminin yapısı ve temel özellikleri	25
Şekil 3.1.	U-87 hücre hattının karakteristik özellikleri	31
Şekil 4.1.	Didymin'in 100-1,56 µM/ml aralığında denenen dozlarının 24 39 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisi	
Şekil 4.2.	Didymin'in 100-1,56 µM/ml aralığında denenen dozlarının 48 40 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisi	
Şekil 4.3.	Didymin'in 100-1,56 µM/ml aralığında denenen dozlarının 72 41 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisi	
Şekil 4.4.	Didymin'in 100-1,56 µM/ml aralığında denenen dozlarının 24 42 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisinin yüzdelik gösterimi	
Şekil 4.5.	Didymin'in 100-1,56 µM/ml aralığında denenen dozlarının 48 43 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisinin yüzdelik gösterimi	
Şekil 4.6.	Didymin'in 100-1,56 µM/ml aralığında denenen dozlarının 72 44 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisinin yüzdelik gösterimi	

- Şekil 4.7.** Didymin'in 100 µM/ml ve 50 µM/ml dozlarında uygulanmasının 45
ardından 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden
besiyerine salınan Substance P miktarı
- Şekil 4.8.** Didymin'in 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden 46
besiyerine salınan Substance P miktarı
- Şekil 4.9.** Didymin'in 100 µM/ml ve 50 µM/ml dozlarında uygulanmasının 47
ardından 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden
besiyerine salınan Substance P miktarı
- Şekil 4.10** Didymin'in 100 µM/ml ve 50 µM/ml dozlarında uygulanmasının 48
ardından 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden
besiyerine salınan İnterlökin 6 miktarı
- Şekil 4.11.** Didymin'in 100 µM/ml ve 50 µM/ml dozlarında uygulanmasının 49
ardından 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden
besiyerine salınan İnterlökin 6 miktarı
- Şekil 4.12.** Didymin'in 100 µM/ml ve 50 µM/ml dozlarında uygulanmasının 50
ardından 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden
besiyerine salınan İnterlökin 6 miktarı

SİMGELER ve KISALTMALAR

GBM	: Glioblastoma
USFDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-Kinaz
MAPK	: Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
APO-1	: Apoptoz Antijen 1
RKIP	: Raf Kinaz İnhibitör Proteini
IL6	: İnterlökin-6
STAT3	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
GP130	: Glikoprotein 130
JAK1	: Janus Kinaz 1 Tirozin Protein Kinaz
SP	: Substance P
IL-8	: İnterlökin-8
GPCR	: G Proteinine Bağlı Bir Reseptör
NK-1	: Nörokinin 1
ERK1 / 2	: Hücre Dışı Sinyal Ayarlı Kinaz 1 Ve 2
EGCG	: Epigallokateşin Gallat

TBSA	: Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması
LPH	: Laktaz Florizin Hidrolaz
SGLT1	: Sodyum Bağımlı Glikoz Taşıyıcı Protein
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
STZ	: Streptozosin
HSV	: Herpes Simpleks Virüsü
SOD	: Süperoksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
HepG2	: İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HRAR	: İnsan Rekombinant Aldoz Redüktaz
RLAR	: Sıçan Lens Aldoz Redüktaz
AGE	: İleri Glikasyon Son Ürünleri
NF-KB	: Nükleer Faktör Kappa B
AP-1	: Aktivatör Protein-1
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma 2
Erα	: Östrojen Reseptör-alfa
MCF-7	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
3T3-L1	: Beyaz Adiposit Modeli
MDA-MR-231	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı

PDGF	: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR-2	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
TMZ	: Temozolamid
U87 MG	: İnsan Glioblastoma Hücre Hattı
LN229	: İnsan Glioblastoma Hücre Hattı
PPT-A 1	: Preprotacikinin 1
CRP	: C-Reaktif Protein
JAK	: Janus Kinaz Protein
T98G	: İnsan Glioblastoma Hücre Hattı
AMPK	: AMP Ile Aktifleştirilen Protein Kinaz
mTOR	: Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedef
Ki-67	: Proliferasyon Marker Ki-67
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
A549	: İnsan Adenokarsinomik Alveolar Bazal Epitel Hücresi
H460	: İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı
NB	: Nöroblastoma
2HF	: 2'-hidroksiflavanon
CCl4	: Karbon Tetraklorür

CD31 : Yüzey Farklılaşma Antijeni 31

OVD : *Origanum Vulgare* 'den İzole Edilen Didymin

HUVEC : İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri

DMSO : Dimetil Sülfoksit

FBS : Fetal sığır serumu

TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa

1. GİRİŞ

Merkezi sinir sistemini etkileyen tümörler günümüzde tanısı yeni konmuş kanser türlerin %1,4'ünü ve 2015 yılında toplam kanser ölümlerinin %2,6'sını temsil etmektedir (McNeill, 2016). Beyin tümörleri tüm primer merkezi sinir sistemi tümörlerinin %85-90'ını oluşturmaktadır. Glioblastom (GBM) erişkin beyin tümörlerinin yaklaşık yarısını oluşturur ve en kısa yaşama süresi ile ilişkili beyin tümörüdür (Ostrom ve ark., 2015). Ameliyat dahil olmak üzere çok yönlü terapötik müdahale glioblastomanın tedavisinde tercih edilmektedir. Tümör büyümesini inhibe edebilen ve genel hasta prognozunu iyileştirmek için tekrarlayan tümörlerin gelişmesini önleyebilen yeni bileşiklerin tanımlanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda doğal bileşiklerin terapötik müdahalede kullanımları artmıştır. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (USFDA) tarafından kanser için onaylanan ilaçların neredeyse üçte birinin doğal ürünler ve bunların benzerleri olduğu belirtilmektedir (Altmann ve Gertsch, 2007; Mann, 2002).

Glioblastoma oldukça invaziv ve heterojen tipte bir malign beyin tümörüdür. Glioblastomanın ayrıntılı moleküler analizleri; hücre büyümesini, DNA onarımını ve reseptör tirozin kinaz (RTK), fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K), p53 ve mitojenle aktive edilen protein kinazı (MAPK) gibi sinyal yollarının düzensizliğini ortaya çıkarmaktadır (Touat ve ark., 2017).

Flavonoidler, çeşitli bitkilerde yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir. Birçok narenciye türü gelişim sırasında büyük miktarlarda flavonoid biriktirmektedir. Flavonoidler, antikanser, antioksidatif, antiinflamatuvar ve daha birçok etkileri nedeniyle çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde terapötik özellik gösterdikleri için araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Flavonoid glikozitler, flavonoidlerin bir glikozidik bağ yoluyla şekere bağlandığı doğal moleküllerdir ve birçok bitkinin ortak bir bileşenidir (Yao ve ark., 2018).

Didymın, izosakuranetin-7-O-rutinosid olarak da bilinen bir diyet glikozitidir. Didymın, mandalina, bergamot, portakal, *Origanum* ve *Vulgare Duanxueliu* da dahil olmak üzere

narenciye meyvelerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Narenciye içeriği ve kolay ekstraksiyonu nedeniyle didymin, normal dokularda toksisiteye neden olmayan ucuz, güvenli ve etkili bir oral ilaç olarak kabul edilmiştir (Singhal ve ark., 2017)

Son yıllarda yapılan bir çok çalışma didymin flavonoidinin çeşitli hücreler üzerindeki etkilerini açıklamaya çalışmıştır. Morelli ve arkadaşları, 2014 yılında yaptıkları çalışmada didyminin nöronal membran sistemindeki hücre hasarı üzerine etkilerini incelemişler ve didyminin hücre canlılığını arttırdığı, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile indüklenen nöronal hücrelerde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi ile uyarılan hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu azaltarak nörotoksisiteye karşı koruyucu bir antioksidan olduğunu belirtmişlerdir (Morelli ve ark., 2014). Diyetten doğal olarak alınan flavonoidler hastalıkların tedavi süresince alınan kemoterapötik ajanların aksine daha tolere edilebilir ve daha az toksik olarak tanımlanmışlardır. Çalışmalar, doğal ürünlerin kemoterapötiklerle birlikte verilmesinin anti-tümör etkinliği arttırdığını göstermiştir. Didymin flavonoidinin meme kanseri hücrelerine etkilerini araştıran bir çalışmada; Hsu ve arkadaşları didyminin ftalat kaynaklı tümör poliferasyonunu ve migrasyonu inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (Hsu ve ark., 2016). Hung ve arkadaşları 2010 yılında insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri A549 ve H460 hücrelerinde didyminin antikanser mekanizmasını tanımlamak için, apoptoz, hücre döngüsü dağılımı ve p53, p21/WAF1, Fas/APO-1 reseptörü ve Fas ligandı seviyeleri üzerindeki etkisini test etmiştir. Didyminin belirli dozlarda akciğer kanseri hücrelerinde çoğalmaya etki ettiğini, Fas / FasL apoptotik sistemin aktivitesinin A549 ve H460 hücrelerinde didymin antiproliferatif aktivitesine katılabileceğini göstermişlerdir. Çalışmanın sonunda didyminin bu apoptotik etkisinin, küçük hücreli dışı akciğer kanserine karşı mücadelede potansiyel kemoterapötik ajanlara katkıda bulunabileceğini belirtmişlerdir (Hung ve ark., 2010). Başka bir çalışmada Hai ve arkadaşları nöroblastoma tedavisinde didyminin potansiyel terapötik etkilerini araştırmış ve ilgili hücre içi sinyal yollarını aydınlatmaya çalışmıştır. p53 yabancıl tip ve p53 mutant nöroblastomlarında didyminin yaşam ve klonojenik potansiyeli üzerindeki etkisi test edilmiş, apoptozun indüksiyonu ile nöroblastomalardaki proliferasyonun anahtar basamaklar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonunda didyminin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve

apoptozu indüklediği, bununla birlikte raf kinaz inhibitör proteininin (RKIP) ekspresyonunu uyardığı ve N-Myc ekspresyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Aynı zamanda farelerde yapılan bu çalışmada didyminin anti-tümör özellikleri de araştırılmış didyminin kontrol gruplarına kıyasla tümör boyutunu önemli ölçüde azaltabileceği gözlemlenmiştir (J. Singhal ve ark., 2012).

Beslenmede büyük yer kaplayan diyet flavonoidlerinin güvenli ve etkili bir şekilde, kanserin önlenmesinde rol oynayabileceği vurgulanmaktadır. Yapılan çalışmalar flavonoid glikoziti olan didyminin kanser üzerindeki olumsuz etkileri tersine çevirebileceğini ortaya koymaktadır. Günümüzde moleküler mekanizmalar hala net olarak ortaya çıkarılamamış olsa da didyminin tümör hücreleri üzerinde terapötik etkilere, antitümör ve anti-inflamatuar potansiyele sahip olduğu bilinmektedir.

Kansere bağlı inflamasyon tümör hücresi çoğalmasını, hayatta kalmasını ve göçünü hızlandırabilmektedir. İnterlökin-6 (IL-6), inflamatuvar peri-tümöral ortamı yaratan birincil sitokindir. Glioblastomada artmış ekspresyonu gözlenmekte ve doğrudan hastanın hayatta kalma süresini etkilemektedir (Chang, ve diğerleri, 2005). Rahaman ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada glioblastoma hücre hatlarında IL-6 otokrin ekspresyonu ile sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörünün (STAT3) sürekli aktivasyonu gözlenmiştir (Rahaman ve ark., 2002). Glioblastomayı tedavi etmek için bir çok doğal bileşik ve bunların analogları *in vitro* ve *in vivo* modellerde araştırılmıştır. Jonathan ve arkadaşlarının çeşitli sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan doğal bir flavonoid olan kuersetinin, T98G ve U87 glioblastoma hücrelerinde İnterlökin-6 (IL-6) ile indüklenen STAT3 sinyal yolu üzerinde etkilerini araştırdıkları çalışmada; kuersetine maruz kalma, IL-6 ile glikoprotein 130 (GP130), janus kinaz 1 tirozin protein kinaz (JAK1) ve STAT3 aktivasyonunun azalmasına ve ayrıca IL-6'nın neden olduğu glioblastoma hücrelerinin proliferatif ve göç özelliklerinde belirgin bir azalmaya neden olmuştur (Michaud-Levesque ve ark., 2012).

Bir nöropeptit olan Substance P (P maddesi (SP)), merkezi ve periferik sinir sistemlerinde nörojenik inflamasyonun önemli bir aracısıdır. SP, ağrı yollarında ve tümör hücre proliferasyonu, anjiyogenez, tümör hücre istilası ve metastazda önemli rol

oynamaktadır, ayrıca SP'nin, IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Yamaguchi ve ark., 2017).

G proteinine bağlı bir reseptör (GPCR) olan P maddesi reseptörü Nörokinin-1 (NK-1) insan glioblastomalarında bulunur ve büyümelerinde rol oynar. U373 MG insan glioblastom hücrelerinde P maddesinin NK-1 reseptörüne bağlanarak G proteinini aktive eder ve oluşan protein kompleksi nükleusa doğru hareket ederek hücre proliferasyonunun uyarılmasına ve mitojenle aktive edilen protein kinazların (hücre dışı sinyal ayarlı kinaz 1 ve 2 (ERK1/2)) fosforilasyonuna yol açtığı bilinmektedir (Yamaguchi ve ark., 2005).

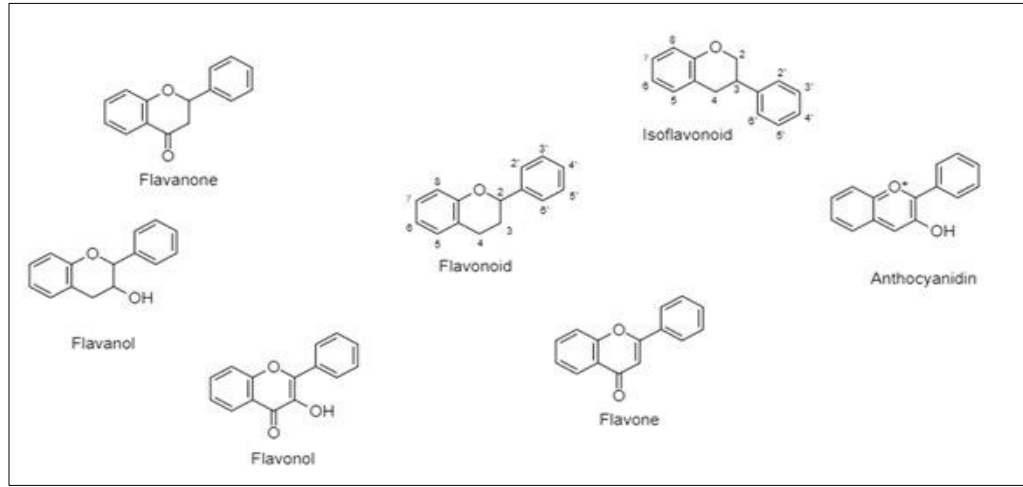
Literatür çalışmalarına bakıldığında çeşitli flavonoidlerin tümör hücreleri üzerinde sitotoksik, terapötik, antitümör, anti-inflamatuvar etkileri bu bileşiklerin önemini arttırmaktadır. Didymin flavonoidi narenciye meyvelerinde yaygın olarak bulunmakta olup, tüketimi yaygındır ve beslenme açısından da önemlidir. Çalışmamızda amacımız glioblastoma hücre hattı üzerinde bu bileşiğin sitotoksik ve anti-inflamatuvar etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.FLAVONOİDLER

Flavonoidler, bitkilerin ikincil metabolitleri olarak adlandırılan ve doğada yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerdir (Nabavi ve ark., 2020). Bu bileşikler bitkilerin; renk, koku, tat ve farmakolojik aktivitelerinden sorumlu olmakla birlikte, bitkileri olumsuz çevre koşullarından koruyan güçlü antioksidanlar olarak adlandırılırlar (Nabavi ve ark., 2020; Scarano ve ark., 2018; Vrhovsek ve ark., 2004). İlk olarak 1930 yılında Macar bilim insanı tarafından portakaldan izole edilmiş ve yeni bir vitamin üyesi olduğu düşünülerek P vitamini olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bu bileşiğin bir flavonoid olduğu anlaşılmış ve günümüze kadar 4000'den fazla flavonoid türü tanımlanmıştır (Middleton, 1998).

Flavonoidler yapısal olarak 15 karbon barındırır ve birbirlerine 3 karbonlu zincirle bağlanan iki benzen halkasından oluşmaktadır (Nabavi ve ark., 2020). Benzen halkaları A ve B, heterosiklik piran halkası C ile bağlanırlar. Flavonoidler C halkasının oksidasyon seviyesi ve konumuna göre farklılıklar gösterirlerken, aynı sınıfa ait flavonoidler A ve B halkasının konumundaki farklılıktan dolayı çeşitli gruplara ayrılırlar (Middleton, 1998). Kimyasal yapılarına, oksidasyon derecelerine ve karbon yapılarına göre birçok flavonoid tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Flavonoidler yapılarına göre 6 ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar; flavonoller, flavanoller, flavonlar, izoflavonoidler, flavanonlar ve antosiyanidinlerdir (Abotaleb ve ark., 2019).



Tablo 2.1. Yapısal farklılıklara bağlı olarak flavonoidlerin sınıflandırılması: flavonol, flavanon, flavanol, flavon, antosiyanidin ve izoflavonoid (Abotaleb ve ark., 2019).

Flavonoidler bitkilerin hemen hemen tüm kısımlarında bulunmaktadır. İnsan ve hayvan beslenmesinde önemli yer tutan bu fitokimyasal grubu insan ve hayvanlar tarafından sentezlenememektedir (Koes ve ark., 2005). Flavonoidler meyveler, sebzeler, çay, kakao ve şarap gibi bitki kökenli yiyecek ve içeceklerde bol miktarda bulunmaktadır (Panche ve ark., 2016). Flavonoller, gıdalardaki en bol flavonoidlerdir. İnsan beslenmesinde en yüksek miktarlarda bulunan flavonoidler arasında soya izoflavonları, flavonoller ve flavonlar bulunmaktadır (Kumar ve Abhay, 2013).

2.1.1. Flavonlar

Flavonoidlerin önemli alt gruplarından biri olan flavonlar çoğunlukla çiçeklerde, yapraklarda ve meyvelerde bulunmaktadır. Önemli kaynakları maydanoz, kereviz, papatya, nane, kırmızı biberdir. C halkasının 2. ve 3. konumları arasında bir çift bağa ve 4. konumda bir ketona sahiptirler. Başlıca flavonlar arasında apigenin, luteolin, tengeretin glikozitleri bulunmaktadır. Turunçgil kabukları büyük miktarlarda flavonlar içermektedir (Manach ve ark., 2004; Panche ve ark., 2016).

2.1.2. Flavonoller

Gıdalarda en yaygın bulunan flavonoidlerdir. Yapısal olarak keton grubuna sahip, C halkasının 3. pozisyonunda bir hidroksil grubuna sahiptir (Panche ve ark., 2016). Çeşitli meyve ve sebzelerde bolca bulunurlar. Başlıca flavonoller arasında kamferol ve kuersetin gelmektedir. En zengin kaynakları soğan, brokoli, yaban mersini, kıvırcık

lahanadır. Bu besinlerin yanı sıra kırmızı şarap ve çayda 45 mg flavonol/L içermektedir. Bu bileşikler glikozile edilmiş formlarda mevcuttur (Manach ve ark., 2004).

2.1.3. Flavanoller

Dihidroflavonoller veya kateşinler olarak da bilinen flavanonoller, flavanonların 3-hidroksi türevleridir. Hidroksil grubu C halkasının 3. konumuna bağlı olarak bulunur. Hem monomer formda hem de polimer formda bulunabilmektedir. Muz elma, armut ve şeftali zengin kaynakları arasındadır. Meyvelerin yanı sıra yeşil çay ve çikolata kateşinlerin en zengin kaynaklarıdır. (Panche ve ark., 2016).

2.1.4. Flavanonlar

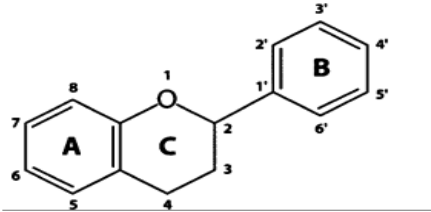
Dihidroflavonlar olarak da adlandırılan flavanonlar, doymuş C halkasına sahiptir; bu nedenle, flavonlardan farklı olarak, 2 ve 3 konumları arasındaki çift bağ doymuştur. En zengin kaynakları turunçgillerdir. Domates, nane gibi bazı bitkilerde de bulunur ancak konsantrasyonları düşüktür. Başlıca flavanonlar arasında; naringenin, hesperidin, gelmektedir (Manach ve ark., 2004; Panche ve ark., 2016).

2.1.5. Antosiyaninler

Antosiyaninler, çiçeklerin ve meyvelerin epidermal dokularında çözünen ve pembe, mor, mavi kırmızı gibi renk veren pigmentlerdir (Mazza, 2018). Siyanidin gıdalarda en yaygın bulunan antosiyanindir. Kızılcık, ahududu, yaban mersini, çilek gibi meyvelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bir diğer kaynakları arasında tahıllar, kırmızı şarap, patlıcan, lahana ve fasulye bulunmaktadır (Panche ve ark., 2016).

2.1.6. İzoflavonlar

Ağırlıklı olarak soya fasulyesi ve diğer baklagil bitkilerinde bulunan izoflavonlar östrojenlere yapısal benzerlikleri olan flavonoidlerdir. Steroid olmamalarına rağmen, 7 ve 4 pozisyonlarında hidroksil gruplarına sahiptirler. Östrojen reseptörlerine bağlanma yeteneği de dahil olmak üzere onlara sahte hormonal özellikler kazandırarak fitoöstrojenler olarak sınıflandırılırlar. Başlıca izoflavonoidler soya fasulyesinde bolca bulunan genistein ve daidzeindir (Panche ve ark., 2016).

Flavonoidin temel yapısı ve flavonoidlerin alt sınıfları	
	
Alt sınıflar	Bileşik örnekleri
Antosiyaninler	Pelargonidin, siyanidin, delfinidin, malvidin
Flavanoller	Epikateşin, epikateşin gallat (EGCG), kateşin, gallokateşin
Flavanonlar	Naringenin, naringin, hesperidin
Flavonlar	Sinensetin, nobiletin, tangeretin, luteolin, apigenin, galangin
Flavonoller	Kamferol, kuersetin, fisetin, izorhamnetin, mirisetin
İsoflavonlar	Daidzein, genistein, daidzin

Tablo 2.2. Flavonoidin temel yapısı ve flavonoidlerin alt sınıfları (Kozłowska ve Dorota, 2019)

2.2.FLAVONOİDLERİN BESİN KAYNAKLARI

Flavonoidlerin önemli diyet kaynakları, sebzeler, meyveler, tohumlar ve bazı tahılların yanı sıra şarap, çay ve bazı baharatlardır. En çok bulunan kaynaklar çilek, börtölce, kara lahana, bitter çikolata, maydanoz, kekik, yeşil ve siyah çaydır. Sebze ve meyvelerde bulunan flavonoid miktarı; bitkinin çeşidi, iklim, üretim, işleme ve depolama koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir (Kozłowska ve Dorota, 2019). Bununla birlikte vücuda alınan bu bileşiklerin türüne, kaynağına ve diğer besinlerle etkileşimlerine göre biyoyararlanımları farklılık gösterebilmektedir. (Rodríguez ve ark., 2019). Kuersetin en sık tüketilen flavonoidlerden biridir (kuersetin ana kaynakları soğan, elma, çay ve şaraptır), esas olarak glikozillenmiş formunda bulunur. Örneğin, elmalardan elde edilen kuersetin glikozitleri, soğanlardan elde edilenlere göre daha düşük biyoyararlanıma sahiptir (Graefe ve ark., 2001; Lotito ve Frei, 2006). Yağ alımı flavonoidlerin biyoyararlanımını iyileştirmekte ve misel oluşumunu arttıran safra tuzlarının artan sekresyonu aracılığıyla bağırsak emilimini arttırmaktadır. Protein alımı flavonoid biyoyararlanımını azaltabilmektedir (Gonzales ve ark., 2015; Świeca ve ark., 2013).

Flavonoidlerin biyolojik etkileri tüketicinin cinsiyet ve yaş gibi özelliklerine göre değişebilmektedir. Aynı zamanda fizyolojik ve moleküler faktörler, gastrointestinal

mikroflora bileşimi ve farklı bileşiklerin absorpsiyon ve biyotransformasyon mekanizmalarındaki farklılıklar da etkileyebilmektedir (Ravishankar ve ark., 2013).

Gıdalardaki flavonoid içeriklerini değerlendirmek için kullanılabilecek veri tabanları arasında; USDA veritabanları ve çevrimiçi Phenol-Explorer veri bulunmaktadır. Ancak beslenme değerlendirmelerinin sonuçları kullanılan veri tabanı türüne göre değişiklik gösterebilmektedir.

Türkiye’de didyminden zengin turunçgillerin tüketim sıklığına bakıldığında 2017 yılında yapılan Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması’na (TBSA) göre; tüm bireylerde turunçgilleri hiç tüketmeyenlerin sıklığı %4,1, her gün tüketenlerin sıklığı %11,0, haftada 4-5 kez tüketenlerin sıklığı %8,6, haftada bir tüketenlerin oranı ise %23,5 olarak belirlenmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2019).

2.3.FLAVONOİDLERİN METABOLİZMASI

Gastrointestinal sistemde flavonoidlerin biyoyararlanımları; flavonoidin yapısı, gıda matrisi ile etkileşimleri, mikrobiyota bileşimi ve gastrointestinal enzim aktiviteleri ile değişebilmektedir (Gonzales ve ark., 2015). Alınan flavonoidlerin sadece küçük bir kısmı bozulmadan emilmektedir. Vücutta emilim hızları molekülün yapısı, bağlı olduğu matris ve diğer bileşenlerle etkileşimler gibi bir dizi faktöre göre değişmektedir. Vücuda alınan bu moleküllerin etkileri aynı zamanda yaş, cinsiyet ve kolon mikrobiyotasının bileşimi gibi bireyler arası farklılıklara da bağlıdır (Rees ve ark., 2018).

Flavonoidler, konak doku ve mikrobiyota tarafından metabolize edilmektedir. Metabolizma sonucu oluşan metabolitler değişen derecelerde hidrosilasyona sahip fenilpropiyonik, fenilasetik ve benzoik asitlerden oluşan ortak fenolik ara ürünler oluşturmaktadır (Pei ve ark., 2020). Mide, bağırsak ve karaciğerde flavonoidlerin emilim ve metabolizması değişebilmektedir. Bu işlem sırasında flavonoidler çeşitli katabolik ve konjugasyon reaksiyonları ile değişikliğe uğrar, kanda dolaşır ve daha sonra idrar veya safra yoluyla atılmaktadır.

Vücuda alınan flavonoidler moleküler hedeflerine ve biyolojik aktivitelerine göre üç metabolik yol izlemektedir. Bunlardan ilki; gastrointestinal sistemde epitelyal, endokrin

ve bağışıklık hücrelerine gösterdiği etkilerdir. Doğrudan antioksidan etki gösterebildikleri gibi gastrointestinal sistem hormonlarının salınımlarına da etki edebilmektedir (Williamson ve Clifford, 2017).

İkinci yol; bağırsak epitel hücreleri tarafından flavonoidlerin biyotransformasyona uğramasıdır. Bağırsak epitelinde oluşan ürünler kan dolaşımına katılmakta veya bağırsak lümeninde daha fazla metabolize olmaktadır (Oteiza ve ark., 2018). Flavonoid glikozitleri aglikona dönüştürülür ve ardından β -glukosidaz, α -ramnosidaz, β -glukuronidaz ve *Enterobacter* türleri tarafından bağırsakta üretilen diğer enzimlerin etkisiyle fenolik aside metabolize edilmektedir. Bağırsağa geri salınan flavonoidlerin birleşik ürünleri de kalın bağırsaktaki bağırsak florası tarafından aglikonlara hidrolize edilir ve kan dolaşımına katılmaktadır (Chen ve ark., 2021).

Üçüncü olarak flavonoidler mikrobiyota ile etkileşime girerek aromatik ve fenolik asitlere metabolize olmaktadır (Williamson ve Clifford 2017). Çeşitli patojenlerin büyümesini engelleyerek ve *Bifidobacterium spp.* ve *Lactobacillus spp.* gibi faydalı bakterilerin sayısını artırarak bağırsak mikrobiyotasını şekillendirmektedir. Faydalı bakterilerin artması bağırsak bağışıklık homeostazının korunmasını ve besinlerin emiliminin artmasını sağlayarak bağırsak sağlığını iyileştirmektedir (Oteiza ve ark., 2018).

Midede sindirilebilen diğer besinlerin aksine, flavonoid glikozitlerin çoğu bu bölgede etkili bir şekilde emilemez. Ancak antosiyanin midede ve mide epitelinde hızlı ve verimli bir şekilde emilebilmektedir (Lila ve ark., 2016; Yang ve ark., 2018).

İnce bağırsakta ise flavonoid glikozitleri doğrudan emilemez, aglikon ve fenolik aside metabolize edilerek emilir. Flavonoid aglikon hidrofik ve küçük moleküler yapıya sahip olması nedeniyle pasif difüzyon yoluyla ince bağırsak duvarındaki epitel hücreler tarafından doğrudan emilir.

Flavonoid glikozitlerinin ince bağırsaktaki emilim mekanizmasına ilişkin iki yaklaşım bulunur. Birincisi, flavonoid glikozitlerin, memelilerin ince bağırsaklarında bulunan laktaz florizin hidrolaz (LPH) tarafından aglikonlara hidrolize edilebilmesidir. Memeli

ince bağırsağının fırça sınırında bulunan LPH, bazı flavonoid glikozitlerini hidrolize edebilir. Diğer bir yaklaşım ise flavonoid glikozitlerinin Na⁺ yoluyla taşınmasıdır. β -glukozidaz tarafından aglikona hidrolize edildikten sonra, sodyum bağımlı glikoz taşıyıcı protein (SGLT1) yoluyla bağırsak epitel hücrelerine taşınmasının ardından flavonoid dolaşım sistemine girer (Chen ve ark., 2021). Bununla birlikte, toplam polifenol alımının yalnızca tahmini %5-10'u ince bağırsakta emilmektedir. Kalan flavonoidler kolon mikroflorası yardımıyla düşük metabolitlere indirgenerek kalın bağırsağa geçer. Kan dolaşımına girdikten sonra, metabolitler vücutta taşınır ve dokulara etki eder, bir kısmı karaciğerde daha fazla metabolize olmaktadır (Rees ve ark., 2018).

Karaciğerde flavonoidlerin: oksidasyon reaksiyonu ve bağlanma reaksiyonu olmak üzere iki ana metabolik formu vardır. Flavonoidlerin oksidasyon reaksiyonu ise karaciğerde sitokrom P450 enzimi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bağlanma reaksiyonları ise temel olarak glukuronizasyon, sülfatlama ve metilasyonu içermektedir (Hollman, 2009).

2.4.FLAVONOİDLERİN ÇEŞİTLİ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

2.4.1. Antioksidan Aktivite

Flavonoidlerin bilinen en önemli özelliği antioksidan aktivite göstermeleridir. Bir organizmada pro-oksidan yükler ve antioksidan savunma sistemindeki denge bozulduğunda ROS üretimi başlamakta ve serbest radikaller oluşmaktadır (Zamora-Ros ve ark., 2018). ROS, hücre içindeki oksidatif fosforilasyonun yan ürünleri olarak mitokondride elektron taşıma zincirinde üretilir (Williamson ve ark., 2018). Üretilen ROS miktarı, oksidatif strese neden olarak inflamasyon sürecini başlatır. Oksidatif stres; lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif bozulması, prokarsinojenlerin aktivasyonu, hücresel ve antioksidan savunma sistemlerinin inhibisyonuna neden olur (Kumar ve Abhay, 2013). Oluşan ROS miktarı dejeneratif hastalıklar ve kanser gelişimiyle yakından ilişkilidir (Rodríguez ve ark., 2019). Flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri yapılarındaki fonksiyonel grupların konfigürasyonu, toplam sayısı ve yer değişimine bağlıdır (Yang ve ark., 2018). Polifenollerin antioksidan aktivitesinin esas olarak hidroksil gruplarının varlığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bileşiğin hidroksil (OH)

grubu miktarının antioksidan etkisiyle doğru orantılı olduğu ancak moleküller aynı sayıda ve pozisyonda OH gruplarına sahip olsalar bile, antioksidan aktivitenin farklı olduğu ve bunun antioksidan aktiviteyi etkileyen diğer yapısal özelliklerden kaynaklandığı da bildirilmiştir (Boulmouk ve ark., 2021).

Antioksidan etki mekanizmaları incelendiğinde flavonoidler, enzimlerin ve serbest radikal oluşumunda rol oynayan eser elementlerin inhibisyonu ile ROS oluşumunu engelleyebilir, doğrudan reaktif oksijen türlerini temizleyebilir ve antioksidan enzimlerin ve faz II detoksifikasyon enzimlerinin üretimini uyarabilir (Kopustinskiene ve ark., 2020; Kumar ve Abhay, 2013). Flavonoidler ayrıca metalleri (demir ve bakır) şelatlayarak yeteneği de göstermiş, böylece serbest radikal oluşumunun nedensel faktörlerini ortadan kaldırmıştır (Mondal ve Rahaman, 2020).

2019 yılında yapılan bir çalışmada kereviz, maydonoz gibi bitkilerde bulunan apigenin flavonoidinin antioksidan özellikler sergileyerek periferik sinir dejenerasyonuna karşı nöroprotektif etkisi gözlemlenmiştir (Kim ve ark., 2019). Turunçgillerde yaygın olarak bulunan hesperidin flavonoidi ise bir başka çalışmada streptozosin (STZ) ile indüklenen diyabetik ratlarda antioksidan etki göstererek hiperglisemi ve dislipidemiye zayıflattığı sonucuna varılmıştır (Jayaraman ve ark., 2018).

2021 yılında yapılan başka bir çalışmada resveratrol ve askorbik aside kıyasla EGCG ve epikateşinin antioksidan aktivitesi araştırılmış; EGCG, epikateşin ve resveratrol'den daha güçlü antioksidan olarak gösterilmiştir (Boulmouk ve ark., 2021).

2.4.2. Antibakteriyel Aktivite

Flavonoidler bakımından zengin birçok bitki özütünün antibakteriyel aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir. Antibakteriyel flavonoidler, belirli bir etki alanı yerine birden çok hücresel hedefe sahip olabilir. Moleküler etkilerinden biri proteinlerle kompleks oluşturmaktır. Bu nedenle, antimikrobiyal etki tarzları, mikrobiyal adezinleri, enzimleri, hücre zarfı taşıma proteinlerini ve benzerlerini inaktive etme yetenekleriyle ilişkili olabilir. Lipofilik flavonoidler ayrıca mikrobiyal membranları da bozabilmektedir (Kumar and Abhay, 2013).

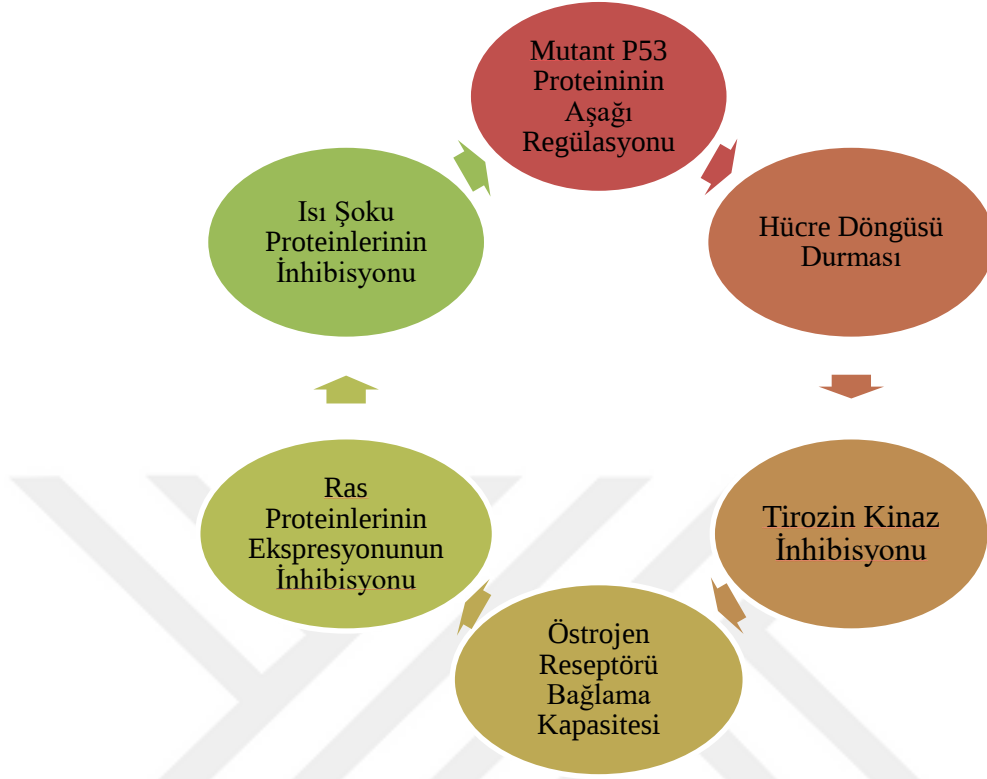
2.4.3. Antiinflatuar Aktivite

Meyve ve sebzeler gibi bitkisel kaynaklı besinlerden zengin diyetlerin bağışıklık sistemini düzenleyerek ve inflamatuvar yanıtı etkileyerek hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Giderek artan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, inflamatuvar cevabın doğal fitokimyasallarla etkileşimin birçok kronik inflamatuvar hastalığın önlenmesinde, hafifletilmesinde ve tedavisinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Hesperidin, apigenin, luteolin ve kuersetin gibi bir dizi flavonoidin antiinflatuar ve analjezik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Flavonoidler, özellikle tirozin ve serin-treonin protein kinazlar gibi inflamatuvar süreçlerin oluşumunda kritik olarak rol oynayan enzim sistemlerinin işlevini etkileyebilir (Pan ve ark., 2010). Bazı flavonoidler, bir grup güçlü proinflamatuvar sinyal molekülü olan prostaglandinlerin üretiminin güçlü inhibitörleridir. Çalışmalar, bu etkinin prostaglandin biyosentezinde rol alan anahtar enzimlerin (lipoksijenaz, fosfolipaz ve siklooksijenaz gibi) flavonoidlerce inhibisyonundan kaynaklandığını göstermiştir. Flavonoidler ayrıca hücre aktivasyonunda yer alan fosfodiesterazları da inhibe eder. Bu etkinin çoğu, dolaşımdaki lökositlerin yaralanma bölgelerine yapışmasına aracılık eden protein sitokinlerinin biyosentezi üzerinedir (Manthey, 2000).

2.4.4. Antikanser Aktivite

Kanserin tedavisi için farklı tedavi yöntemleri geliştirilmiş ancak toksisite ve yan etkilere neden olması sebebiyle farklı alanlara yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

Flavonoidlerin kanserin oluşumu ve ilerleyişi üzerindeki etkilerini açıklamak için gelişimde rol oynayan moleküler mekanizmalar ve hormonal etkiler de göz önüne alınarak çeşitli mekanizmalar önerilmiştir.



Şekil 2.1. Flavonoidlerin başlıca moleküler etki mekanizmaları (Kumar ve Abhay, 2013).

2.4.5. Antiviral aktivite

Flavonoidlerin antiviral aktivitelerine olan ilgi birçok insanı etkileyen son yıllarda artan viral enfeksiyonlar nedeniyle artmıştır. Enfeksiyon tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların sınırlı etkinlikleri ve yan etkileri sebebiyle; yan etkileri hafif olan veya olmayan doğal bitki özlerinin viral hastalıkların tedavisi için uygun bir alternatif olabileceği düşünülmektedir (Hostettmann ve Marston, 2002; Ni ve ark., 2020).

Antiviral aktiviteye sahip flavonoidler 1940'lardan beri tanınmaktadır. Yapılan araştırmalarda rutin, morin, kuersetin, apigenin, hesperidin ve kateşin gibi flavonoidlerin 11 farklı virüs türüne karşı etkili olduğu bulunmuştur (Badshah ve ark., 2021).

Flavonoidlerin antiviral etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmalara bakıldığında nöraminidazlar, DNA/RNA polimerazlar ve proteazlar gibi viral enzim aktivitelerinin inhibisyonuna dayandığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Ninfali ve ark., 2020). Antiviral etki mekanizmalarına dayalı olarak flavonoidler, profilaktik inhibitörler,

terapötik inhibitörler veya bağışıklık sistemi ile etkileşim yoluyla dolaylı inhibitörler olabilir (Lalani ve Poh, 2020).

Flavonoidlerin virüslerin yüzey proteinlerine bağlanabildiği ve virüsün konakçı hücrelere girmesini engelleyebildiği, aynı zamanda bazı flavonoidlerin bir transkripsiyon engelleyici görevi gördüğü ve replikasyon sürecini etkilediği çalışmalarda gösterilmiştir. Roschek ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada mürver flavonoidlerinin influenza A (H1N1) virüs partiküllerine doğrudan bağlanarak, H1N1 virüsünün konakçı hücrelere girmesini engellediği *in vitro* H1N1 enfeksiyonunu etkili bir şekilde önlediğini belirlenmiştir (Roschek ve ark., 2009).

Yine yapılan bir çalışmada luteolin ve kamferol gibi flavonol ve flavonların farklı kombinasyonları Herpes Simpleks virüsüne (HSV) karşı sinerjistik etki göstermiştir (Ahmad ve ark., 2015). Bir çay kateşin flavonoidi olan epigallokateşinin (EGC), *influenza A* ve *B* virüslerinin replikasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Imanishi ve ark., 2002).

2.4.6. Antidiyabetik Aktivite

Diyetle alınan flavonoidlerin glukoz homeostazı üzerindeki yararlı etkilerini inceleyen birçok *in vitro* ve hayvan çalışması bulunmaktadır. Flavonoidlerin çeşitli hücre içi sinyal yolları aracılığıyla insüline duyarlı dokularda insülin salınımı ve glukoz alımını düzenlediği gösterilmiştir (Babu ve ark., 2013). Wedick ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada diyetle alınan flavonoid alt sınıflarının Amerikalı yetişkinlerde tip 2 diyabet riski ile ilişkili olup olmadığını değerlendirmiş, daha fazla antosiyanin ve antosiyanin açısından zengin meyve tüketimi daha düşük tip 2 diyabet riski ile ilişkilendirmiştir (Wedick ve ark., 2012). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalara dayanarak narenciye flavonoidlerinin potansiyel antidiyabetik etkisini ve moleküler mekanizmalarını sistematik olarak gözden geçiren bir çalışmada; 19 narenciye flavonoidinin; glisemik kontrol, böbrek fonksiyonu, lipid profilleri, karaciğer enzimleri ve antioksidan enzim biyobelirteçlerini düzenlediği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda glikoz alımı ve insülin duyarlılığını düzenleyen sinyal yollarını düzenlediği belirtilmiştir. Bu narenciye flavonoidleri, SOD, CAT ve GPx gibi endojen

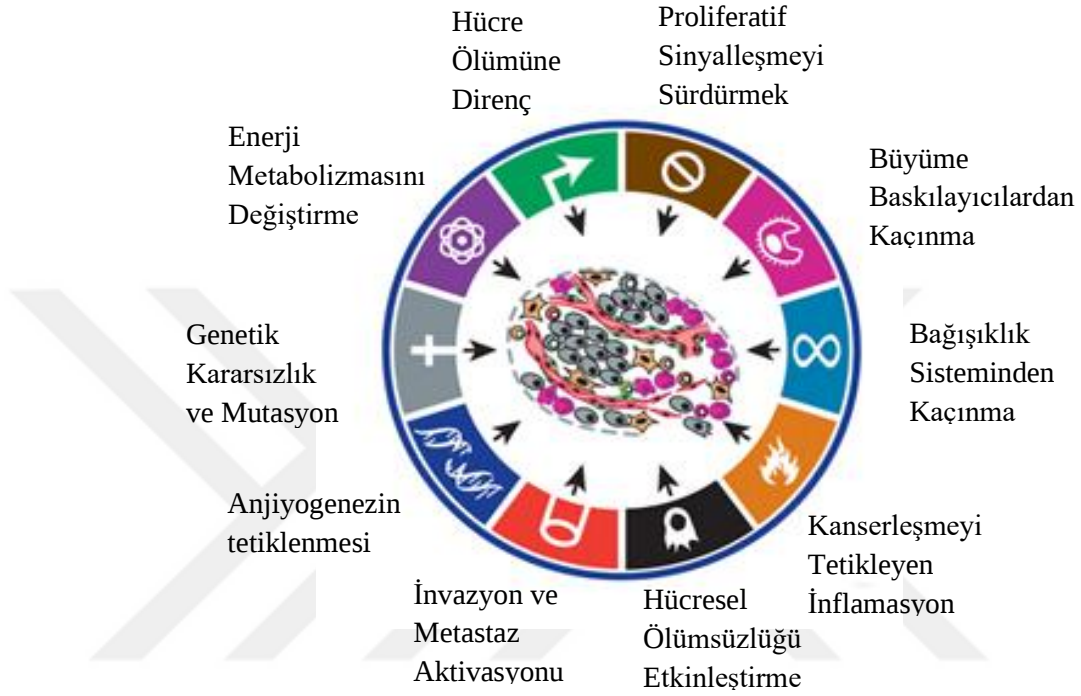
antioksidanları artırarak ve ROS konsantrasyonunu azaltarak, yüksek glikoz maruziyetinden kaynaklanan doku hasarını hafifletmiştir (Gandhi ve ark., 2020).

Ali ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; narenciye flavonoidi olan didyminin insüline dirençli insan karaciğer kanseri hücre hattı HepG2 hücrelerindeki antidiyabetik potansiyeli araştırılmış, didyminin insan rekombinant aldoz redüktaz (HRAR), sıçan lens aldoz redüktaz (RLAR), a-glukosidaz ve ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca didymin insülin sinyal yolunun aktive etmiş ve insülin duyarlılığını arttırmıştır. Çalışmanın sonunda didyminin diyabet ve diyabetle ilişkili komplikasyonların tedavisi için terapötik yaklaşımlar geliştirmek için faydalı olabileceği belirtilmiştir (Ali ve ark., 2019).

Yapılan bir dizi çalışmada; gallik asit ve p-kumarik asidin, diyabetik sıçanlarda serum glikoz düzeyinde azalma ve insülin düzeyinde yükselmeye sebep olarak antidiyabetik etki gösterdiği, başka bir çalışmada ise sinamik asit ve kafeik asidin insülin dirençli fare hepatositlerinde insülin sinyali ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu yukarı regüle edebileceği, glikoz alımını artırabileceği ve sonuç olarak hücrelerde insülin direncini hafifletebileceği belirtilmiştir (Abdel-Moneim ve ark., 2017; Huang ve ark., 2009).

2.5. KANSER

Kanser, kalp hastalıklarından sonra dünyada en çok ölüme neden olan önemli bir halk sağlığı problemidir (Millimouno ve ark., 2014). Bozulmuş hücre döngüsü ile karakterize olan, hücresel homeostazın ve fonksiyonların geri dönülemez şekilde bozulmasıyla tetiklenen heterojen bir hastalıktır. Kanserin ilerlemesi; kontrolsüz hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptotik işlev kaybıyla hücre popülasyonunun genişlemesinin sonucudur (Abotaleb ve ark., 2019). Kansere neden olan iç ve dış faktörlere bakıldığında, genetik mutasyonlar, hipoksi, oksidatif stres ve apoptotik fonksiyon kaybı iç nedenler; stres, sigara, ultraviyole ışın maruziyeti ve radyasyon dış nedenler arasında gösterilmektedir (Blackadar, 2016). Son yıllarda yapılan bir çok çalışma kanserin özellikle büyüme faktörleri, antiapoptotik proteinler, transkripsiyon faktörleri gibi protein kodlayan genlerdeki işlev bozukluklarından kaynaklandığını göstermiştir (Millimouno ve ark., 2014).



Şekil 2.2. Kanser hücrelerinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011)

Kanserin tedavisi için farklı tedavi yöntemleri geliştirilmiş ancak toksisite ve yan etkilere neden olması sebebiyle farklı tedavi yöntemleri ve yeni daha zararsız ilaçlara yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Kemoterapi kullanımından önce, doğal kaynaklardan elde edilen ilaçların hem kanserin önlenmesi hem de tedavisi için yüzyıllar boyunca kullanıldığı ve bugün tüm antikanser ilaçların %80 kadarının kökenlerinin doğal ürünlere dayandığı belirtilmektedir. Ancak bu doğal bileşiklerin moleküler hedefleri ve antikanser potansiyeli henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Hasima ve Aggarwal, 2012).

Kanser kemoprevansiyonu, kanserleşme sürecini geciktirmek, tersine çevirmek veya inhibe etmek için farklı farmasötik, sentetik ve doğal bileşikler kullanarak kanserin önlenmesinde ana stratejidir. Kanser tedavisi için uygun maliyetli alternatif etken maddelerin keşfine olanak sağlaması nedeniyle bu alana olan ilgi giderek artmakta, aynı zamanda kullanılan doğal bileşiklerin elde edilmelerinin kolay olması, güvenilir ve

verimli bir yol olarak tercih edilmesi de diğer önemli nedenler arasında gösterilmektedir (Cragg ve Pezzuto 2016; Glade, 1999).

Epidemiyolojik çalışmalar, diyetle meyve ve sebzelerle yüksek flavonoid alımının insanlarda daha düşük kanser prevalansı ile ilişkili olabileceğine dair kanıtlar sağlamıştır (Hung ve ark., 2010). Bununla birlikte vücuda alınan bu bileşiklerin türüne, kaynağına ve diğer besinlerle etkileşimlerine göre biyoyararlanımları farklılık göstermektedir (Rodríguez ve ark., 2019). Yağ alımı flavonoidlerin biyoyararlanımını iyileştirmekte ve misel oluşumunu arttıran safra tuzlarının artan sekresyonu aracılığıyla bağırsak emilimini arttırmaktadır. Protein alımı flavonoid biyoyararlanımını azaltabilmektedir (Gonzales ve ark., 2015; Świeca ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalar sonucunda flavonoidlerin antikanserojenik mekanizmalarının; otofaji, apoptoz indüksiyonu, proliferasyon inhibisyonu, hücre döngüsünün durması, hücrel yaşlanma, hücre göçünün bozulması, istila, tümör anjiyogenezi ve tümör hücrelerinde çoklu ilaç direncinin azaltılmasına dayandığı gösterilmiştir. Aynı zamanda kanser gelişimi ile bağlantılı yollara etki ederek tümör hücrelerinde sitotoksik etkilere de sahip olduğu bilinmektedir (Pang ve ark., 2021).

Diyetle alınan bu bileşiklerin doku veya hücrenin tipine bağlı olarak gösterdiği etkiler de değişmekte farklı dozlarda farklı sonuçlar alınmaktadır. Bu bileşiklerin hücrelere etki mekanizmaları incelendiğinde; mitojenle aktive olan protein kinazlar, aktivatör protein-1 (AP-1) ve nükleer faktör Kappa B (NF- κ B) gibi transkripsiyon faktörlerinin modifiye edilmiş aktivitesi ve hücre döngüsünün veya apoptozun (Bcl-2 ailesinin üyeleri) kontrolünde yer alan anahtar moleküllerin modülasyonu yoluyla etki ettiği açıklanmaktadır (Manson, 2003). Aynı zamanda antioksidan enzimlerin aktivasyonu ve pro-oksidan enzimlerin baskılanması yoluyla antioksidan aktiviteler göstererek reaktif oksijen türü oluşumu, antioksidan savunma ve hücrel homeostazın korunmasında önemli rol oynamaktadır (Kopustinskiene ve ark., 2020).

Yapılan bir çalışmada soya fasulyesinde bolca bulunan izoflavonoidlerden genisteinin; östrojen reseptör- α (ER α) ekspresyonunu düzenleyerek ve apoptotik proteinler olan Bax/Bcl-2 seviyelerinde değişime sebep olarak MCF-7 meme kanseri ve 3T3-L1

fibroblast hücrelerinde proliferasyonu ve apoptozu etkilediği, başka bir çalışmada ise MDA-MB üçlü negatif meme kanserinde Notch-1 yolağı yoluyla NF-κB aktivitesinin inhibisyonu ile sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Choi ve ark., 2014; Pan ve ark., 2012).

2012’de Duo ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; kuersetinin MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde hücre büyümesi ve apoptoz üzerindeki etkileri araştırılmış, kuersetinin doza ve zamana bağlı olarak proliferasyonu önemli ölçüde inhibe ettiği, 48. saatin sonunda apoptozu arttırdığı bulunmuştur. Kuersetin tedavisini takiben Bcl-2 ekspresyonunda azalma, Bax ekspresyonunda önemli ölçüde artış görülmüştür. MCF-7 hücrelerinde gözlemlenen apoptotik etkinin Bcl-2 protein ekspresyonunun aşağı regülasyonundan ve Bax ekspresyonunun yukarı regülasyonundan kaynaklanabileceği çalışmanın sonunda vurgulanmıştır (Duo ve ark., 2012).

Narenciye meyvelerinde yaygın olarak bulunan naringenin flavonoidinde çeşitli kanser hücrelerinde etkileri bir dizi çalışmada araştırılmış; bunlardan birinde inflamatuvar ve apoptotik sinyal yollarının modülasyonu yoluyla meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattının göçünü inhibe ettiği, başka bir çalışmada ise glioblastoma hücre hattında hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK) ve p38 aktivitelerinin inhibisyonuna bağlı olarak hücrelerin göçünü azalttığı gözlemlenmiştir (Chen ve ark., 2019; Zhao ve ark., 2019).

2.6. GLİOBLASTOMA

Merkezi sinir sistemini etkileyen tümörler günümüzde tanısı yeni konmuş kanser türlerin %1,4’ünü ve 2015 yılında toplam kanser ölümlerinin %2,6’sını oluşturmaktadır (McNeill, 2016). Beyin tümörleri ise tüm primer merkezi sinir sistemi tümörlerinin %85-90’ını oluşturmaktadır. Glioblastom (GBM) erişkin beyin tümörlerinin yaklaşık yarısını oluşturur ve en kısa yaşama süresi ile ilişkili beyin tümörüdür (Ostrom ve ark., 2015). Ameliyat dahil olmak üzere çoklu terapötik müdahale glioblastomanın tedavisinde tercih edilmektedir. Tümör büyümesini inhibe edebilen ve genel hasta prognozunu iyileştirmek için tekrarlayan tümörlerin gelişmesini önleyebilen yeni bileşiklerin tanımlanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda doğal bileşiklerin terapötik müdahalede kullanımları artmıştır. Amerika Birleşik

Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi tarafından kanser için onaylanan ilaçların neredeyse üçte birinin doğal ürünler ve bunların benzerleri olduğu belirtilmektedir (Altmann ve Gertsch, 2007; Mann, 2002).

Glioblastoma oldukça invaziv ve heterojen tipte bir malign beyin tümörüdür. Glioblastomanın ayrıntılı moleküler analizleri; hücre büyümesini, DNA onarımını ve reseptör tirozin kinaz (RTK), fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K), p53 ve mitojenle aktive edilen protein kinazı (MAPK) gibi sinyal yollarının düzensizliğini ortaya çıkarmaktadır (Touat ve ark., 2017). Bununla birlikte diğer beyin tümörlerinin aksine glioblastomada kan-beyin bariyeri ve biyolojik faktörler yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır (Tan ve ark., 2020).

Günümüzde GBM tedavisi, güvenli cerrahi rezeksiyon ve ardından temozolomid (TMZ) kemoterapisi ve radyoterapi kombine tedaviden oluşmaktadır (Rhun ve ark., 2021; Wick ve ark., 2018). Bu tedavilere iyi yanıt veren hastalarda tümör sıklıkla nüksetmekte ve çoklu ilaç direnci gelişmektedir. Günümüzde GBM ile mücadelede fenolik bileşikler de büyük ilgi görmektedir. Pek çok çalışma, flavonoidlerin antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteleriyle (faz I ve II enzimlerine karşı etki ederek ve hücre içi ROS seviyelerini azaltarak) kronik inflamasyonu azaltarak tümör gelişimi ve ilerlemesini engellediğini göstermektedir (Magalhães ve ark., 2021).

Kanser hücrelerinde ROS birikimi ile doğrudan veya hücreler olarak meydana gelen mutasyonlar DNA'ya zarar verir. Tümör baskılayıcı Ras ve p53 genlerinde meydana gelen mutasyonlar apoptoz düzenlenmesini etkiler (Tudek ve ark., 2021).

Primer GBM kitlesinde ve glioma hücrelerinde, trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) ligandlarının ve reseptörlerinin birlikte ekspresyonu yaygın olarak gözlenir. Bu durum, otokrin ve parakrin döngülerinin birlikte tümör büyümesine ve ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu reseptörlerin varlığı proliferasyonu artırarak ve apoptozu azaltarak tümör gelişimini önemli ölçüde artırır. Anjiyogeneze ise vasküler ağdaki endotel hücreleri damarlanarak yeni kan damarları oluşturur. Anjiyogenik yolda, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve bununla ilişkili reseptör 2 (VEGFR-2), IL-8 ve IL-6, fibroblast büyüme faktörü (FGF) görev alır.

Sağlıklı beyinde VEGFR-2 ekspresyonu düşük bulunurken, VEGFR-2'nin GBM'de yüksek miktarda ekspresyonu söz konusudur (Hardee ve Zagzag, 2012; Holmes ve ark., 2007). 2015 yılında Jana ve arkadaşları tarafından inflamatuvar tümör mikroçevresinin VEGFR-2 ekspresyonu üzerindeki etkisini değerlendiren çalışmada cerrahi olarak eksize edilen primer GBM kitleleri, inflamasyonun genel boyutunu değerlendirmek için histolojik olarak incelenmiş ve daha belirgin inflamasyon varlığında daha yüksek VEGFR-2 seviyeleri gözlemlenmiştir (Jaal ve ark., 2015).

Son dönemdeki çalışmalar fitokimyasalların aynı anda birden fazla genetik yolu hedefleyerek kanserle mücadeleye yardımcı olduğunu göstermektedir. Zhang ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışma yeşil çaydan elde edilen polifenol EGCG'nın, U-87 hattından izole edilen glioma kök hücre benzeri hücrelerin canlılığını, göçünü ve ilaç direncini engellemek için temozolomid ile sinerjistik etki gösterdiğini ve EGCG'nin tek başına kullanımının glioma için etkili bir terapötik strateji olabileceğini göstermektedir (Zhang ve ark., 2015). 2020 yılında yapılan başka bir çalışma kurkuminin tek başına ve temozolamid (TMZ) ile kombin halde U-87 hücre hattında kanser hücrelerinin yayılımını önemli ölçüde azalttığını, otofaji ve apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonlarını arttırdığını ve Bax proteinlerinin ekspresyonlarını ise önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Bagherian ve ark., 2020).

Narenciye meyvelerinde bulunan hesperidin flavonoidinin insan GBM hücreleri üzerindeki antikanser etkisini *in vitro* olarak inceleyen ve moleküler sinyal mekanizmalarını araştıran başka bir çalışmada hesperidin insan GBM U-251 ve U-87 hücre canlılığı üzerinde önemli inhibitör etki göstermiştir. DAPI boyama ve Annexin V testi ile apoptotik ölümün hücre canlılığının azalmasına katkıda bulunduğu ve hesperidinin hücre döngüsünün G2/M fazında durmasını indüklediği bulunmuştur. Hesperidinin GBM tedavisi için doğal bir terapötik ajan olabileceği ve p38 MAPK aktivasyonu yoluyla hücre apoptozunu indükleyebileceği keşfedilmiştir (Li ve ark., 2019).

Temozolomid ve naringenin U-87 MG ve LN-229 glioblastoma hücre hatlarında kombine etkisini inceleyen bir çalışmada bu kombine tedavinin sitotoksik etki gösterdiği

ve her iki etken maddenin hücre büyümesini indüklemeye sinerjistik etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (Gautam ve Gabrani, 2021).

2.7.SUBSTANCE P (P MADDESİ)

P Maddesi (Substance P (SP)), merkezi ve periferik sinir sistemlerinde ağrı iletiminde rol oynayan önemli bir nöropeptittir. (Yamaguchi ve ark., 2017). SP nörojenik inflamasyonda da yer alan, hem anjiyogenik hemde mitojenik aktiviteye sahip olması nedenleri ile kanser içinde en önemli nöropeptiddir (Oz ve ark., 2011). SP, PPT-A l geni tarafından kodlanır, PPT-A geni monosit, tromboit, insan fibroblastları, tümör hücreleri gibi birçok hücrede eksprese edilmektedir. SP ağrı yolağındaki en önemli nöropeptid olmasının yanı sıra, tümör hücresi proliferasyonu, anjiyogenez, tümör hücresi invazyonu ve metastazında da önemli bir rol oynamaktadır (Yamaguchi ve ark., 2017). SP reseptör antagonistleri, ağrıyı gidermek için potansiyel ilaçlar olarak araştırılmaktadır (Byun ve ark., 2020).

SP'nin normal ve tümör hücrelerinde mitojen gibi davrandığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Mitojenik etki, SP reseptörü olan NK-1 reseptörü aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. SP reseptörü olan NK-1'e büyük afinite gösterir. SP ve NK-1 reseptörleri tümör hücrelerinde ve tümör içi ve tümör çevresindeki kan damarlarında tespit edilmiştir (Munoz ve ark., 2011).

SP'nin, IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Lieb ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada; IL-6 sentezini baskılayan sinyal iletim basamaklarını ve transkripsiyon faktörlerini araştırmak için insan astrositom hücreleri kullanılmış, IL-1 β , SP ve histamin ile uyarıldıktan sonra, SP'nin çeşitli sitokinlerin ve diğer proinflamatuvar mediatörlerin üretimini düzenleyen önemli bir transkripsiyonel aktivatör olan NF- κ B'nin aktivasyonunu güçlü bir şekilde tetiklediği bildirilmiştir (Lieb ve ark., 1997; Lieb ve ark., 1998).

G proteinine bağlı bir reseptör (GPCR) olan P maddesi, insan glioblastomlarında bulunur ve büyümelerinde rol oynar. U373 MG insan glioblastom hücrelerinde SP'nin NK-1 reseptörüne bağlanarak G proteinini aktive etmesi ve oluşan protein kompleksinin

nükleusa doğru hareket ederek hücre proliferasyonunun uyarılmasına ve mitojenle aktive edilen protein kinazların (hücre dışı sinyal ayarlı kinaz 1 ve 2 (ERK1/2)) fosforilasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Yamaguchi ve ark., 2005).

Yüksek seviyelerde NK-1 ifade eden insan astrositoma hücre hattı U373 MG'nin SP ile indüklenen aktivasyonu üzerinde ketaminin anti-inflamatuar etkilerini araştıran bir çalışmada; ketaminin U373-MG hücreleri tarafından IL-6 ve IL-8 üretimini baskıladığını gösterilmiştir. Ayrıca ketamin, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazın (ERK)1/2, p38 mitojenle aktive olan protein kinazın (MAPK) ve NF-κB'nin SP ile indüklenen aktivasyonunu inhibe etmiştir. Bu gözlemler birlikte alındığında, ketaminin, sinyal moleküllerinin (ERK1/2, p38 MAPK ve NF-κB) fosforilasyonunu inhibe ederek U373MG hücrelerinin SP kaynaklı aktivasyonunu baskılayabildiğini göstermektedir (Yamaguchi ve ark., 2017).

Malign dokuların iyi huylu dokulardan daha fazla NK-1 reseptörü eksprese ettiği tespit edilmiştir (Korfi ve ark., 2021). Normal hücrelere kıyasla GBM'de SP'nin ekspresyonu artmaktadır (Palma ve ark., 1998). Bu tümör hücreleri NK-1 reseptörlerini aşırı ifade ettiğinden, NK-1 reseptörünün kanser tedavisi için spesifik bir moleküler hedef olabileceği anlamına gelmektedir. Bu nedenle, NK-1 reseptör antagonistleri, tümör hücrelerinin ve anjiyogenezin proliferasyonunu ve gelişimini inhibe etmek için umut verici terapötik ilaçlar olarak kabul edilebilir (Munoz ve ark., 2011).

2.8.İNERLÖKİN 6 (IL-6)

185 amino asitten oluşan bir glikoprotein olan IL-6, inflamasyon, kemik metabolizması, C-reaktif protein (CRP) sentezi ve hematopoez dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik süreçte yer alan bir sitokindir (Blood, 1989).

Kansere bağlı inflamasyon tümör hücresinin çoğalmasını, hayatta kalmasını ve göçünü hızlandırabilmektedir. IL-6, inflamatuvar peri-tümöral ortamı yaratan birincil sitokindir. Glioblastomada artmış ekspresyonu gözlenmekte ve doğrudan hastanın hayatta kalma süresini etkilemektedir (Chang ve ark., 2005).

IL-6 sinyal yolları , hücre içi sinyalleşmeden ve ardından STAT3 dahil olmak üzere STAT transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonundan sorumlu olan Janus kinaz (JAK) proteinlerinin aktivasyonuna yol açmaktadır. STAT3'ün onkogenik etkilere sahip olduğu, tümörün hayatta kalmasını, anjiyogenezini , hücre ölümüne karşı direnci ve hücre döngüsü ilerlemesini kolaylaştırabilen genleri yukarı regüle ettiği gösterilmiştir. Özellikle, STAT3, glioblastomada yüksek oranda fosforile olup, hastalığın kötüleşmesiyle ilişkilidir (Cutone ve ark., 2020).

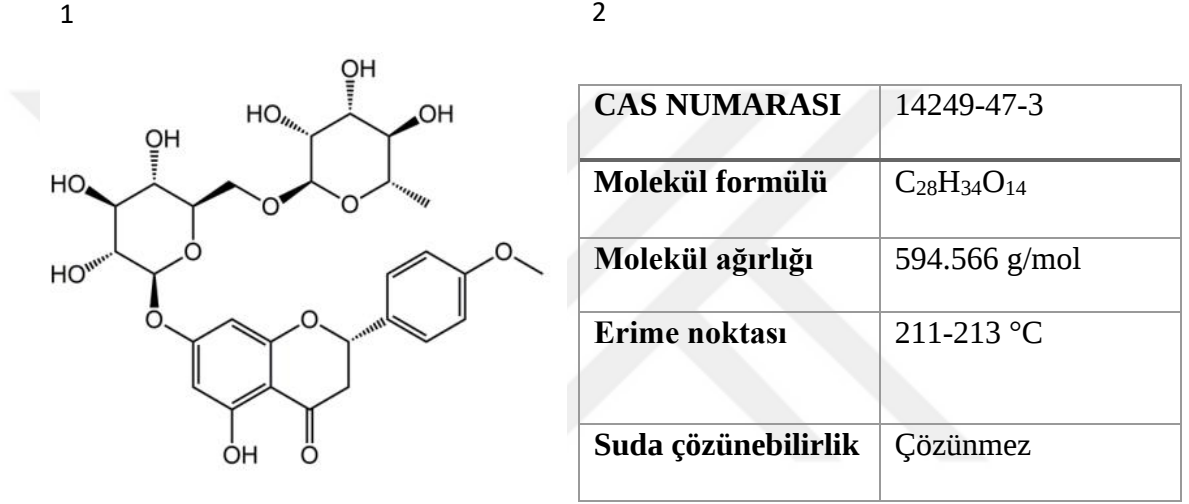
Rahaman ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada glioblastoma hücre hatlarında IL-6 otokrin ekspresyonu ile STAT3'ün sürekli aktivasyonu gözlenmiştir (Rahaman ve ark., 2002).

Jonathan ve arkadaşlarının çeşitli sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan doğal bir flavonoid olan kuersetinin, T98G ve U87 glioblastoma hücrelerinde IL-6 ile indüklenen STAT3 sinyal yolundaki etkilerini araştırdıkları çalışmada; kuersetine maruz kalma, IL-6 ile GP130, JAK1 ve STAT3 aktivasyonunun azalmasına ve ayrıca IL-6'nın neden olduğu glioblastoma hücrelerinin proliferatif ve göç özelliklerinde belirgin bir azalmaya neden olmuştur (Michaud-Levesque ve ark., 2012). Kim ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada ise kuersetin GBM hücrelerinde IL-6 salınımını ve STAT3 fosforilasyonunu azaltmıştır (Kim ve ark., 2021).

Yuan ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada anti-tümör aktivitesi olan üzüm, yer fıstığı ve dutlarda yaygın olarak bulunan güçlü bir antioksidan olan resveratrol ile kombinasyon halinde TMZ, AMP ile aktiveleştirilen protein kinaz (AMPK) aktivasyonu için yukarı akış sinyali görevi gören ROS üretimini önemli ölçüde arttırdığını ortaya koymuştur. Daha sonra aktive edilmiş AMPK, mTOR (rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) sinyal yolağını inhibe etmiş ve kombine tedavinin anti-proliferatif etkilerine katkıda bulunan anti apoptotik proteinlerden Bcl-2'yi azaltmıştır. GBM'nin ortotopik bir ksenograft modelinde TMZ ve resveratrol kombine tedavisi, tümör hacmini önemli ölçüde azaltmış bu, proliferasyon indeksinin bir göstergesi olan Ki-67'nin (proliferasyon marker Ki-67) ekspresyonunun azalmasıyla doğrulanmıştır (Yuan ve ark., 2012).

2.9.DIDYMIN

Flavonoid glikozitleri, flavonoidlerin glikozidik bağ yoluyla şekere bağlandığı doğal moleküllerdir. Birçok bitkinin ortak bileşenleri olarak bulunan flavonoid formlarıdır (Yao ve ark., 2018). Didymin, neoponsirin ve izosakuranetin-7-O-rutinosid olarak da bilinen; portakal, mandalina, bergamot gibi turungillerde yaygın olarak bulunan bir flavonoid glikozitidir (Singhal ve ark., 2017).



Şekil 2.3. Didyminin yapısı ve temel özellikleri. (1) Didyminin kimyasal yapısı. (2) Didyminin başlıca fiziksel ve kimyasal özellikleri (Yao ve ark., 2018)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi narenciye flavonoidlerinin saflaştırılması için kullanılmakta olup, yüksek seçicilik ve hassasiyete sahip kütle spektrofotometresi yöntemi de yine aynı şekilde flavonoid tayini için kullanılmaktadır (Yao ve ark., 2018).

2.10. DIDYMIN VE KANSER ÇALIŞMALARI

Diyetten doğal olarak alınan flavonoidler hastalıkların tedavi süresince alınan kemoterapötik ajanların aksine daha tolere edilebilir ve daha az toksik olarak tanımlanmışlardır. Çalışmalar, doğal ürünlerin kemoterapötiklerle birlikte verilmesinin anti-tümör etkinliği arttırdığını göstermiştir. Didymin flavonoidinin antikanser özelliklerini araştıran ilk çalışma 2010 yılında Hung ve arkadaşları tarafından yapılmış, insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri A549 ve H460 hücrelerinde etki mekanizmaları *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle aydınlatılmaya çalışılmıştır. Araştırmada; didyminin bu hücre hatlarında antiproliferatif aktivitesi belirlenmiş, apoptozun sinyal

transdüksiyonu ile güçlü bir şekilde ilişkili olan p53, p21/WAF1, Fas/APO-1 reseptörü ve Fas ligand (FasL) seviyeleri tespit edilmiştir. Didymin'in doza bağımlı şekilde kanser hücrelerinin proliferasyonlarını inhibe ettiği ve apoptozun birincil mekanizmasının Fas / Fas ligand yolağıyla apoptoz olduğu doğrulanmıştır. Aynı çalışmada Hung ve arkadaşları *in vivo* olarak yaptıkları çalışmada, 6 mg / kg / gün didyminin tümör taşıyan farelerde saptanabilir yan etkiler olmaksızın tümör büyümesini önemli ölçüde baskıladığını göstermiştir (Hung ve ark., 2010).

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ve sistematik analizlerde flavonoidler açısından zengin diyetlerin meme kanseri riski ile ters orantılı olduğu ve özellikle flavonoid içeriğinden zengin Akdeniz ve Asya diyetlerinin azalmış meme kanseri riskiyle bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Kuersetin, luteolin gibi bir çok flavonoid sitotoksik ilaçların biyoyararlanımını arttırmış ve meme kanseri hastalarının yaşam kalitesine etki etmiştir (Sudhakaran ve ark., 2019). 2015 yılında Hsu ve arkadaşları, didyminin ftalat esteri aracılı meme kanseri şiddetlenmesini tersine çevirebildiğini ortaya koymuş, çevresel toksinlerin kanser hücreleri üzerindeki olumsuz etkilerine karşı güvenilir ve etkili bir yöntem olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (Hsu ve ark., 2016).

Nöroblastoma (NB), nöral progenitör hücrelerden kaynaklanan sinir sisteminin katı bir pediatrik tümörüdür (Park ve ark., 2008). Birçok kanser ve hastalık türünde olduğu gibi nöroblastoma tedavisinde de doğal bileşiklerin aktiviteleri araştırılmıştır. Üzüm ve şarapta bol miktarda bulunan resveratrolün nöroblastoma hücreleri üzerinde çeşitli antikarsinojenik etkiler gösterdiği, hücre döngüsünü inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği; kurkuminin, serin-treonin kinaz Akt ve NF-κB baskılanması, mitokondriyal disfonksiyonun indüksiyonu ve p53 ve kaspaz sinyallerinin yukarı regülasyonu yoluyla apoptozu ve hücre döngüsünü düzenlediği yapılan çalışmalar tarafından ortaya konmuştur (Zhai ve ark., 2020). Didyminin hem p53 vahşi tip hem de p53 mutant nöroblastomaların hayatta kalma ve klonojenik potansiyeli üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada 4 farklı nöroblastom hücre hattında didymin dahil üç farklı flavonoidin sitotoksik etkileri incelenmiş, diğer flavonoidlere oranla en güçlü etkiyi gösterdiği ortaya

konmuştur. Didymin, diğer flavonoidler hesperidin ve 2'-hidroksiflavanona (2HF) kıyasla nöroblastomların hücre ölümünde %75'e kadar etki göstermiş, apoptoz üzerindeki etkileri TUNEL yöntemi ile incelenerek artmış hücre ölümünü indüklediği floresan ışıma ile gösterilmiştir. Didymin aynı zamanda proliferasyon (Ki67) ve anjiyogenez (CD31) belirteçlerinin yanı sıra proto-onkogenlerden N-Myc'nin ekspresyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmiştir. Aynı çalışmanın *in vivo* kısmında fareler didymin ile tedavi edilmiş, kontrol grubuna göre tümör sayısında önemli azalmalar görülürken kontrol grubunda kontrolsüz büyüme gözlenmiştir. Tümör ksenograft kesitlerinin histopatolojik incelemesi, nöroblastomlarda Ki67, CD31 ve N-Myc ekspresyonunun azaldığını ortaya çıkarmış; veriler çalışmanın *in vitro* sonuçlarını desteklemiştir (Singhal ve ark., 2012).

Karaciğer fibrozu, etanol, viral enfeksiyon, metabolik hastalıklar dahil olmak üzere karaciğerdeki çeşitli akut ve kronik uyarılara karşı yanıttır. İleri karaciğer fibrozu; siroz, karaciğer yetmezliği ve portal hipertansiyon ile sonuçlanır. Didyminin anti-fibroz etkisini anlamak için Lin ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada farelerde karbon tetraklorür (CCl₄) ile indüklenen hepatik fibrozda didyminin karaciğer patolojisi, kollajen birikimi, apoptoz, hücre döngüsü ve mitokondriyal membran potansiyelini tespit etmişlerdir. Didymin, kronik karaciğer hasarını ve kollajen birikimini iyileştirmiş, apoptozu indüklemiş ve G2 / M fazında hücre döngüsü durmasına neden olmuştur. Aynı zamanda hücrelerden sitokrom C salınımıyla mitokondriyal membran potansiyelini önemli ölçüde zayıflatmış, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar ve mitojenle aktive olan kinazlar (ERK / MAPK) ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir hücre-içi sinyal yolağı olan PI3K/Akt yollarını önemli ölçüde inhibe etmiştir. Çalışmanın sonunda Lin ve arkadaşları, didyminin karaciğer hasarı ve fibrozun tedavisi için yeni bir kemoterapötik ajan olma potansiyelini vurgulamıştır (Lin ve ark., 2016).

Origanum vulgare 'den (İstanbul kekiği) izole edilen didyminin (OVD) insan karaciğer kanseri hücre hattı HepG2 üzerindeki etkilerini ve mekanizmalarını inceleyen başka bir çalışmada ise OVD'nin mitokondriyal disfonksiyon ve raf kinaz inhibitörü proteinini (RKIP) yukarı regüle ederek ERK/MAPK ve PI3K/Akt sinyal yollarının inaktivasyonu ile HepG2 hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir. Çalışmanın

sonunda OVD'nin hepatoselüler karsinom tedavisi için yeni bir kemoterapötik ve kemopreventif ajan olmasının muhtemel olabileceği vurgulanmıştır (Wei ve ark., 2017).

Didyminin antikanser aktivitelerinin yanı sıra anjiyogenezdeki rolü de 2018 yılında Shukla ve arkadaşları tarafından aydınlatılmaya çalışılmıştır. Sırasıyla *in vitro* ve *in vivo* modellerde vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ile insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) indüklenmiş ve didymin ile tedavi edilmiştir. Didymin bu hücrelerde VEGF ile indüklenen hücre proliferasyonu ve invazyonuna ek olarak ROS oluşumu ve NF- κ B'nin aktivasyonunu önlemiştir. Ek olarak farelerde anjiyogenez modeli üzerinde de damar oluşumu ve endotel hücrelerinin istilasını önleyerek antianjiyogenik etkiler göstermiştir (Shukla ve ark., 2019).

Kanser türü	Etki mekanizması	Referans
Akciğer kanseri	Didyminin doza bağımlı şekilde hücrelerinin proliferasyonlarını inhibe ettiği ve apoptozun birincil mekanizmasının Fas / Fas ligand sistemi olduğu doğrulanmıştır.	(Hung ve ark., 2010)
Meme kanseri	Didymin, meme kanseri hücrelerinin ftalat aracılı istilasını, göçünü ve çoğalmasını etkili bir şekilde engelleyebilir.	(Hsu ve ark., 2016)
Nöroblastoma	Didymin proliferasyon (Ki67) ve anjiyogenez (CD31) ve N-Myc ekspresyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmiştir. Siklin D1, siklin B1, CDK4, CD31, Ki67 ve N-Myc'in aşağı regülasyonu da didyminin anti-tümör etkisini artırır.	(J. Singhal ve ark., 2012)
Karaciğer fibrozu	Didymin, kronik karaciğer hasarını ve kollajen birikimini iyileştirmiş, apoptozu indüklemiş ve G2 / M fazında hücre döngüsü durmasına neden olmuştur. Bir Hücre-içi sinyal yolağı olan PI3K / Akt yolağını önemli ölçüde inhibe etmiştir.	(Lin ve ark., 2016)
Karaciğer karsinoma	Didymin mitokondriyal disfonksiyon ve raf kinaz inhibitörü proteinini (RKIP) yukarı regüle ederek ERK MAPK ve PI3K / Akt yollarının inaktivasyonu ile HepG2 hücrelerinde karşı apoptozu indüklemiştir.	(Wei ve ark., 2017)

Tablo 2.3. Belirli kanser türlerinde didyminin uygulamaları ve etki mekanizmaları

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Gibco, ABD)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, ABD)
- Tripsin – EDTA (Gibco, ABD)
- MEM Non-essential amino acids (Gibco, ABD)
- Sodyum pirüvat (Gibco, ABD)
- Genta Antibiyotik (İbrahim Etem, Türkiye)
- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- Didymin (AktinLab, Çin)

3.1.2. Kullanılan Kitler

- WST-1 Proliferasyon Kiti (Takara, Japonya)
- Human Substance P Eliza kiti (AFG Bioscience, ABD)
- Human İnterlökin 6 (IL-6) Eliza Kiti (AFG Bioscience, ABD)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- Biyogüvenlik Kabini (Microbiological Safety Cabinet Class II – Tip A, UMS Medical, Türkiye)
- Mikroskop (Euromex, Hollanda)
- İnkübatör (N-Biotek, Kore)
- -86 dondurucu (Arctiko, Danimarka)
- Buzdolabı (Altus, Türkiye)
- Soğutmalı Santrifuj (Beckman Coulter, ABD – Nüve, Türkiye)
- Eliza Okuyucu (Allsheng, Çin)

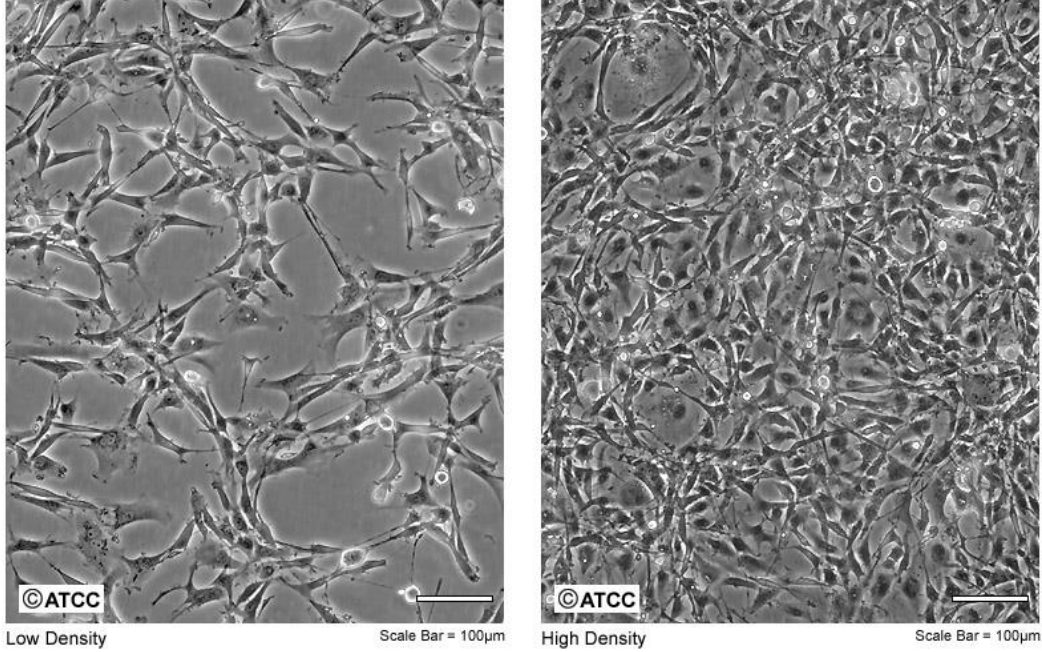
3.2.YÖNTEM

3.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

U-87 MG İnsan Glioblastoma hücre hattı (ATCC) Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi (AKVUAM) ve Sağlık Bilimleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiş ve karakteristik özellikleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

U-87 MG Glioblastoma Hücre Hattı	
ATCC Numarası	HTB-14
Organizma	<i>Homo sapiens</i> , insan
Doku	Beyin
Morfoloji	Epitel
Hastalık	Glioblastom

ATCC Number: **HTB-14**
Designation: **U-87 MG**



Şekil 3.1. U-87 Hücre Hattının Karakteristik Özellikleri (U-87 MG | ATCC)

3.2.2. Hücrelerin Açılması

Hücreler -86 °C derin dondurucudan çıkartılarak sıcak su banyosunda 37 °C sıcaklıkta hızlı bir şekilde çözüldü. Çözünmüş hücre süspansiyonu %10 FBS (fetal bovin serum)

eklenmiş 9 ml DMEM besiyeri içeren petri kabına aktarıldı. Üzerine cryo tüpteki 1 ml hücre süspansiyonu eklendi. Ardından petri; 37 °C ve %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler %90 doluluk oranına ulaştığında petri içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak 2 ml %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı eklendi ve 37 °C ve %5 CO₂'li inkübatörde 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin petri kabından kalkıp kalkmadıkları mikroskopta kontrol edildikten sonra tripsin inhibisyonu için iki katı besiyeri ilave edildi. Hücreler 1:3 oranında pasajlanarak tekrar inkübasyona alındı.

3.2.4. Hücrelerin Stoklanması

Deneyler için bölündükten sonra geriye kalan ihtiyaç fazlası hücreler ve/veya yeterli stokların alınabilmesi için petrilere çoğaltılan hücreler stoklanarak -86 derin dondurucuda saklandı. Stoklama için petri içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı eklendi ve 37 °C ve %5 CO₂'li inkübatörde 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Mikroskopta incelenerek petri yüzeyinden ayrılan hücrelere tripsin inhibisyonu için iki katı besiyeri ilave edildi. Petri içindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüpüne alındı. 2000 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve her bir cryo tüp için 1 ml dondurma medium (%95 besiyeri ve %5 DMSO) eklendi. Dondurma besiyeri ilave edildikten sonra peletin pipetajla çözülmesi sağlandı ve cryo tüplere 1 ml olacak şekilde alikotlandı. Etiketleme işlemlerinin tamamlanması sonrasında hücreler -86 °C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.5. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

U-87 MG Glioblastoma hücreleri için kullanılan besiyeri ortamı %10 FBS (Gibco, ABD), %2 glutamin (10 ml), %1 non-esansiyel aminoasit (5 ml, (MEM, Gibco, ABD)) %0.5 sodyum pirüvat (2.5 ml, (Gibco, ABD)) ve %0.2 antibiyotik (1 ml, (Genta Antibiyotik, İbrahim Etem, Türkiye)) ile desteklenmiş DMEM/F12 (Gibco, ABD) besiyeri kullanılmıştır.

3.2.6. Hematositometre İle Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımı için önce hücrelerin tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmaları sağlandı. Elde edilen hücre süspansiyonundan 100 µl 1 ml'lik ependorf tüplere alındı. Üzerine 900 µl besiyeri eklendi ve homojen çözünme için pipetaj işlemi yapıldı. Hematositometre distile su ve alkolle iyice temizlendi. Hücre karışımından 200 µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta lam üzerinde gözlemlenen dört alanda parlak görünümlü hücrelerin sayımı yapıldı. Sonuç sulandırma katsayısı ile çarpılarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı.

$$1 \text{ ml'deki Hücre Sayısı} = \text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Sulandırma Faktörü} \times 10^4$$

3.2.7. Hücrelerin Bölünmesi

Hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra ml'deki toplam hücre sayısı hesaplandı. Sitotoksikite deneyleri için her kuyucuğa 3000 hücre gelecek şekilde sulandırma işlemi yapıldı. Hücreler 200 µl besiyerinde 3000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96-well plaklara bölündü. Didyminin etkisi üç farklı inkübasyon süresi için (24, 48 ve 72 saat) araştırılacağından her bir deney seti için toplam 3 adet 96-well plate kullanıldı. Hücrelerin yapışmalarını sağlamak için 37 °C ve %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

3.3. DIDYMIN FLAVONOİDİNİN HAZIRLANMASI VE HÜCRELERE UYGULANMASI

Hücrelere uygulanacak olan 10 mg Didymin (AktinLab Kat No: APC-693) /1 ml steril DMSO içinde çözülerek filtreden geçirildi ve anastok hazırlandı. Anastoktan %1 FBS içeren besiyeri ile sulandırılarak 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM, 1,56 µM konsantrasyonlarında didymin hazırlandı. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerinden besiyerleri uzaklaştırılıp, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan didymin hücrelere uygulandı.

3.4.SİTOTOKSİSİTE DENEYLERİ

3.4.1. WST-1 Hücre Proliferasyon Testi

Hücre canlılığının tespiti için tetrazolyum tuzları günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)- 2H tetrazolyum yapısındaki Wst-1; hücre canlılığının spektrofotometrik olarak belirlenmesini sağlamaktadır. Bu kitte yüksek oranda çözünen tetrazolyum tuzu hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığıyla redüklenerek sarı renkli formazana dönüşmektedir. Test sonucu ortaya çıkan renk yaşayan hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Bu testlerde uygulama yapılamayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilir ve hücre canlılığı bu hücrelere göre yüzde (%) olarak belirlenir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Takara WST-1 Cell Proliferation Assay Kit kullanılarak Didymin'in kanser hücrelerinin büyümesini üzerine etkisi olup olmadığı belirlendi. Deneylerin başlangıcında didymin için WST-1 ile doz taraması da gerçekleştirildi. Sitotoksosite deneyleri 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için en az 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı. İnkübasyon süresi sonrası besiyerleri çekilip 90 µl serumsuz besiyeri + 10 ul WST-1 solüsyonu eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı ardından plakların absorbans değerleri Eliza Okuyucuda (Allsheng, Çin) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.5.ELİZA TESTLERİ

3.5.1. Hücrelerden Besiyerine Salınan Substance P Miktarının Eliza Kit ile Belirlenmesi:

Hücrelerden besiyerine salınan Substance P miktarı Substance P ELISA Kit (AFG Kat No: EK711438) kullanılarak araştırıldı. SP miktarı tayini için sitotoksosite test sonuçlarına göre belirlenen dozlarda (100 µM/ml ve 50 µM/ml) didymin uygulaması yapıldı.

- Bunun için hücreler 100.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu steril plaklara bölündü.
- Bir kuyucuk kontrol, bir kuyucuk DMSO kontrol ve ikişer kuyucuk 100 µM/ml ve 50 µM/ml olmak üzere deney kurgulandı.
- 24 – 48 ve 72 saat için ayrı ayrı plaklar hazırlandı.
- Didymin uygulaması yapıldıktan sonra hücreler inkübatöre kaldırıldı.

- 24., 48. ve 72. saatin sonlarında deneyler sonlandırıldı ve hücrelerden salınan besiyerleri çekilerek ependorf tüplere alındı.
- Tüpler -86 °C'ya kaldırıldı.
- Substance P ELISA Kit protokolüne uygun olarak örnekler çalışıldı ve absorbans değerleri eliza kit okuyucuda 450 nm dalga boyunda okundu.

Substance P ELISA Kit protokolüne göre;

- Besiyerleri bulunan ependorf tüpler -86 °C'dan çıkarılarak erimeye bırakıldı.
- Ardından tüpler 3000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi.
- Yıkama tamponu; steril distile su ve yıkama tamponu konsantresi içerek şekilde 30:1 oranında hazırlandı.
- Standartlar kit protokolünde belirtildiği gibi seri dilüsyon yöntemiyle hazırlandı.
- Örnekler; kontrol, DMSO kontrol, 24-48-72. saat olarak belirlendi.
- Her bir örnek ikişer kez çalışılacak şekilde eliza plağı hazırlandı.
- Örnekler santrifüj işleminin ardından her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde pipetlendi.
- Plağın üstü yapışkan şerit ile örtüldü ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası plaklardaki sıvı atıldı ve yıkama tamponu 200 µl her kuyuya pipetlendi ve 30 saniye bekletildi. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
- Her kuyucuğa (blank hariç) 50 µl HRP-Konjugat reaktif enzimi eklendi ve plağın üstü yapışkan şerit ile örtülerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası plaklardaki sıvı atıldı ve yıkama tamponu 200 µl her kuyuya pipetlendi ve 30 saniye bekletildi. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
- Her kuyucuğa 50µl Kromojen Solüsyonu A ve 50 µl Kromojen Solüsyonu B eklendi ve 37°C'de 15 dakika boyunca inkübe edildi. Plağın ışık görmemesine dikkat edildi.
- İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek deney sonlandırıldı.
- 15 dakika içerisinde örneklerin absorbans değerleri 450 nm'de eliza okuyucuda okundu.

3.5.2. Hücrelerden Besiyerine Salınan İnterlökin 6 (IL-6) Miktarının Eliza Kit ile Belirlenmesi:

Hücrelerden besiyerine salınan İnterlökin 6 (IL-6) miktarı Human Interleukin 6 (IL-6) Elisa Kit (AFG Kat No: EK610267) kullanılarak araştırıldı. IL-6 miktarı tayini için sitotoksosite test sonuçlarına göre belirlenen dozlarda (100 μ M/ml ve 50 μ M/ml) didymin uygulaması yapıldı.

- Bunun için hücreler 100.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu steril plaklara bölündü.
- Bir kuyucuk kontrol, bir kuyucuk DMSO kontrol ve ikişer kuyucuk 100 μ M/ml ve 50 μ M/ml olmak üzere deney kurgulandı.
- 24 – 48 ve 72 saat için ayrı ayrı plaklar hazırlandı.
- Didymin uygulaması yapıldıktan sonra hücreler inkübatöre kaldırıldı.
- 24., 48. ve 72. saatin sonlarında deneyler sonlandırıldı ve hücrelerden salınan besiyerleri çekilerek ependorf tüplere alındı.
- Tüpler -86 °C'ya kaldırıldı.
- Human Interleukin 6 (IL-6) Elisa Kit protokolüne uygun olarak örnekler çalışıldı ve absorbans değerleri eliza kit okuyucuda 450 nm dalga boyunda okundu.

Human Interleukin 6 (IL-6) Elisa Kit protokolüne göre;

- Besiyerleri bulunan ependorf tüpler -86 °C'dan çıkarılarak erimeye bırakıldı.
- Ardından tüpler 3000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi.
- Yıkama tamponu; steril distile su ve yıkama tamponu konsantresi içerek şekilde 30:1 oranında hazırlandı.
- Standartlar kit protokolünde belirtildiği gibi seri dilüsyon yöntemiyle hazırlandı.
- Örnekler kontrol, DMSO kontrol, 24-48-72. saat olarak belirlendi.
- Her bir örnek ikişer kez çalışılacak şekilde eliza plağı hazırlandı.
- Örnekler santrifüj işleminin ardından her bir kuyucuğa 100 μ l olacak şekilde pipetlendi.
- Plağın üstü yapışkan şerit ile örtüldü ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrası plaklardaki sıvı atıldı ve yıkama tamponu 200 µl her kuyuya pipetlendi ve 30 saniye bekletildi. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
- Her kuyucuğa (blank hariç) 50 µl HRP-Konjugat reaktif enzimi eklendi ve plağın üstü yapışkan şerit ile örtülerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası plaklardaki sıvı atıldı ve yıkama tamponu 200 µl her kuyuya pipetlendi ve 30 saniye bekletildi. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
- Her kuyucuğa 50 µl Kromojen Solüsyonu A ve 50 µl Kromojen Solüsyonu B eklendi ve 37°C'de 15 dakika boyunca inkübe edildi. Plağın ışık görmemesine dikkat edildi.
- İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek deney sonlandırıldı.
- 15 dakika içerisinde örneklerin absorbans değerleri 450 nm'de eliza okuyucuda okundu.

3.6.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

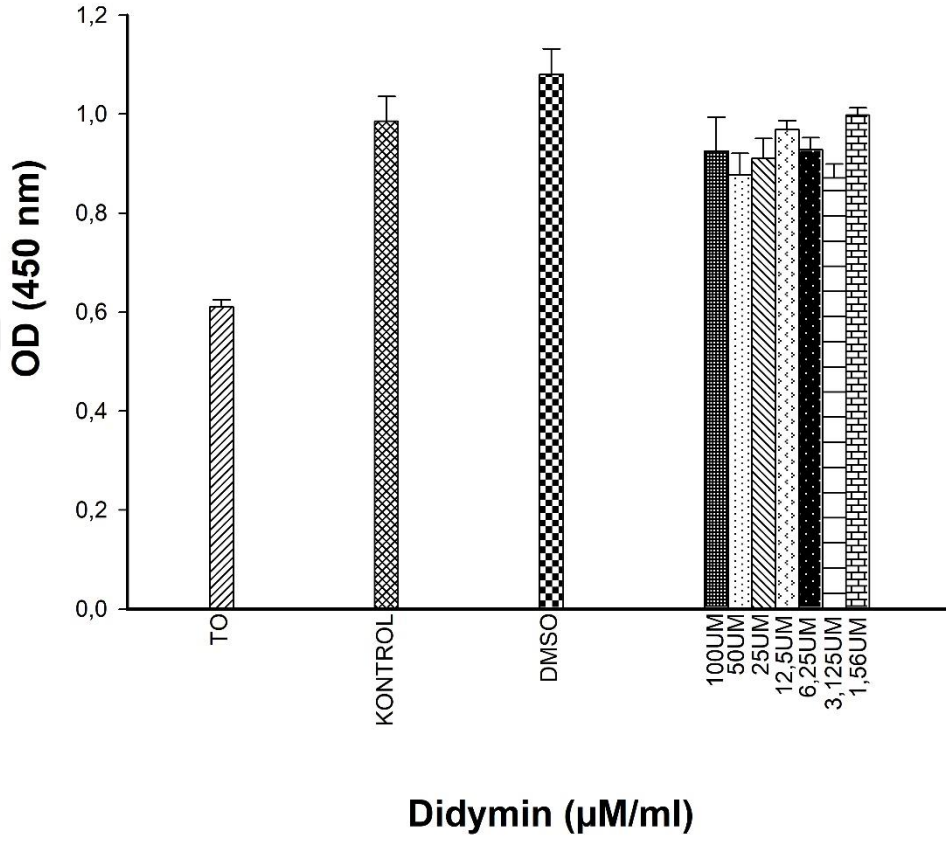
İstatistiksel analizler GraphPad programında yer alan, ANOVA ve Dunnett Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak değerlendirildi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapmaları ile verildi. Veriler Sigma Plot 10.0 programı kullanılarak grafik haline getirildi.

4. BULGULAR

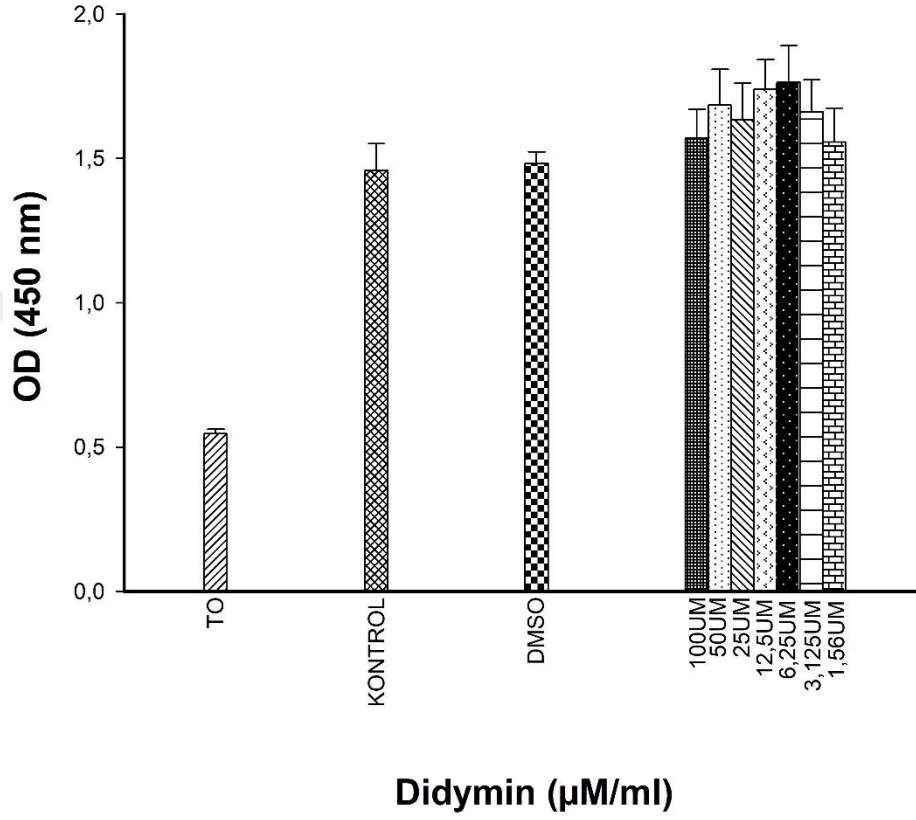
4.1. Didyminin U87 – MG Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Didyminin 100-1,56 μ M/ml aralığında denenen dozlarının 24, 48, 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisi aşağıdaki grafiklerde verilmiştir (Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3.).

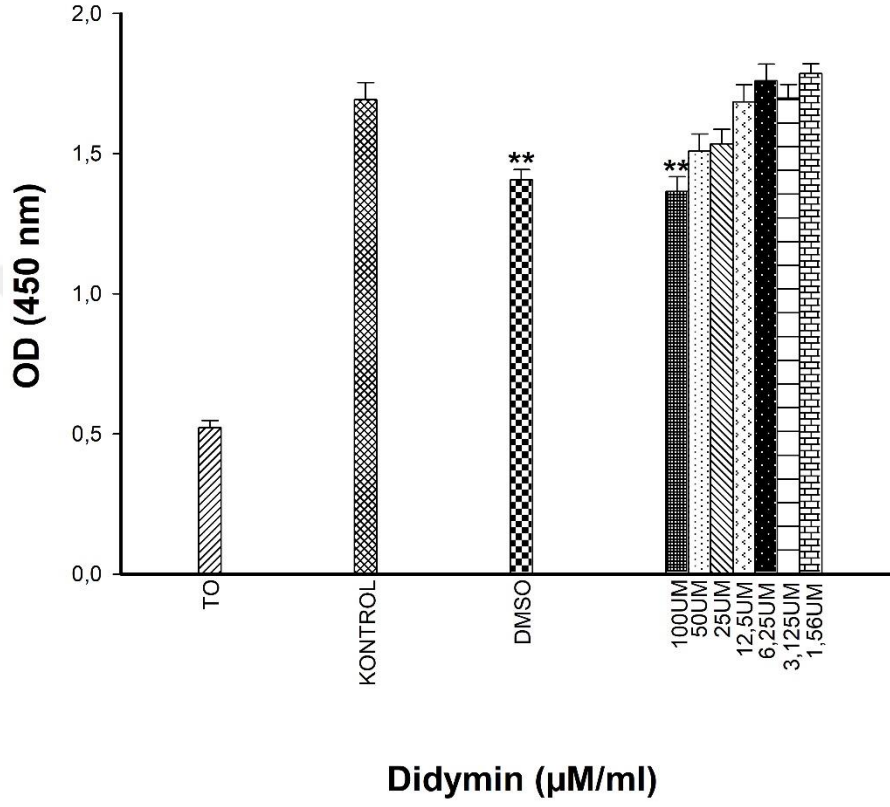




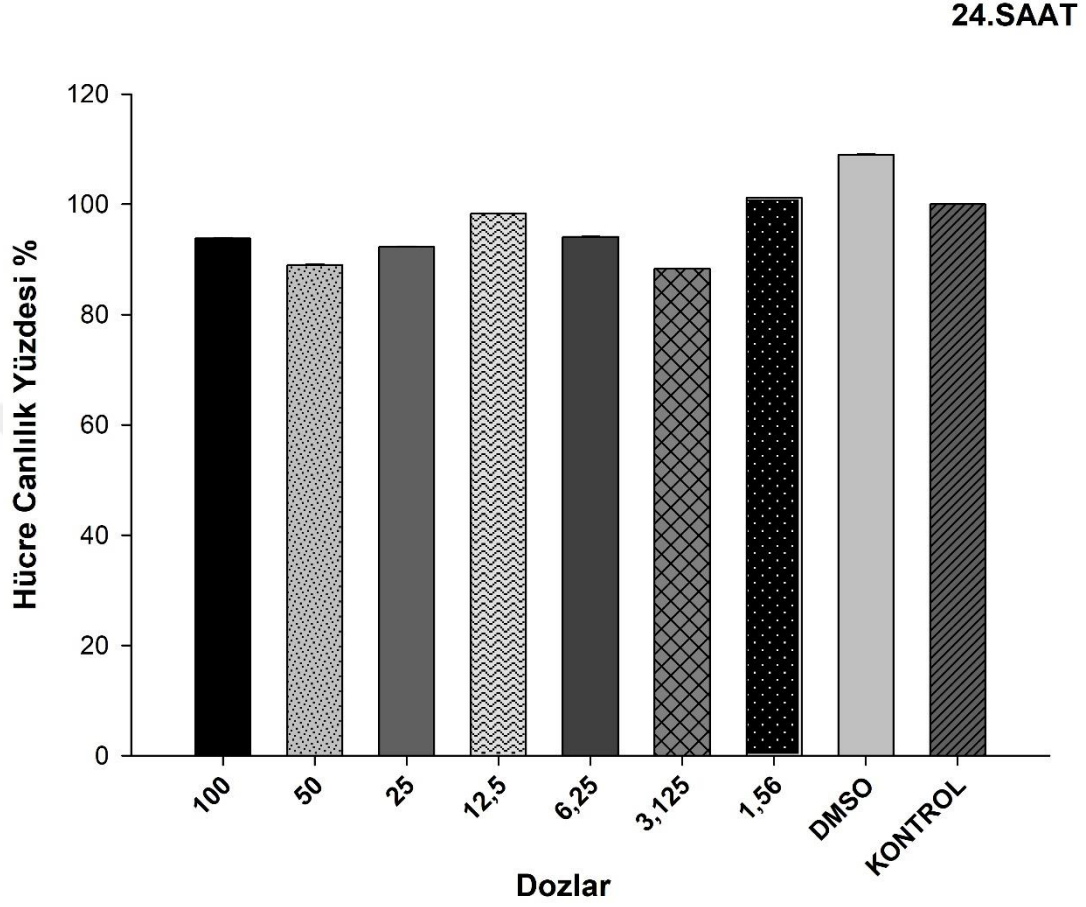
Şekil 4.1. Didyminin 100-1,56 µM/ml aralığında denenen dozlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisi (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)



Şekil 4.2. Didyminin 100-1,56 µM/ml aralığında denenilen dozlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisi (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)



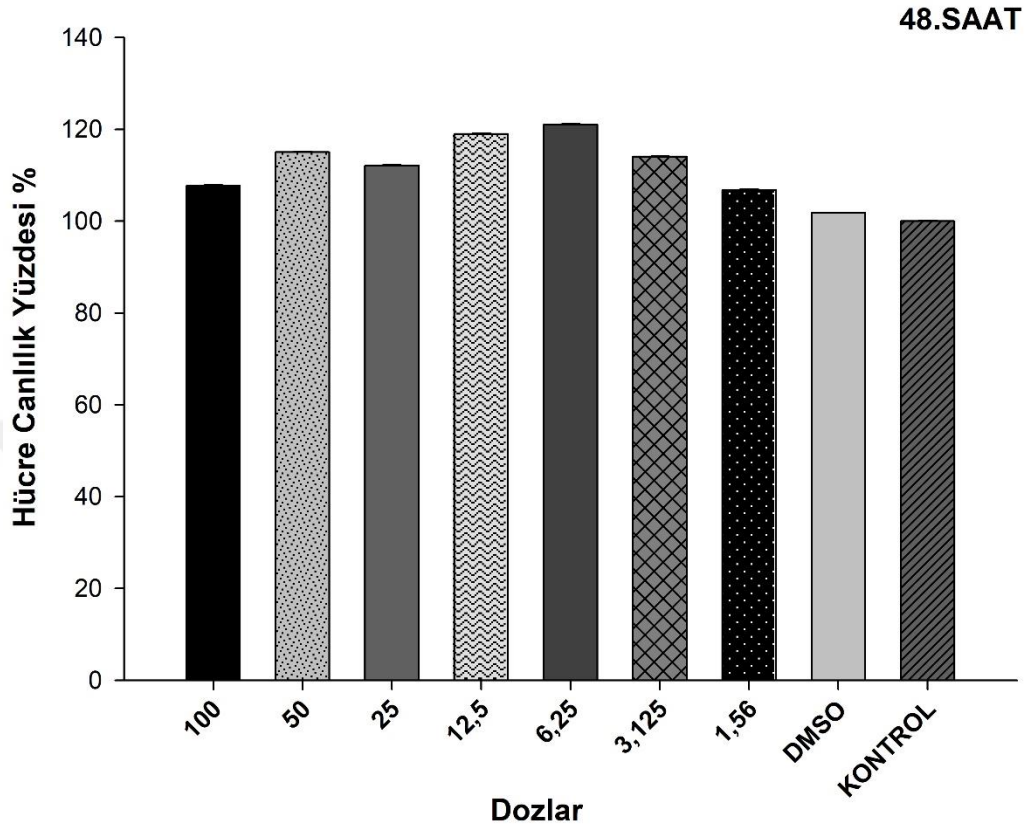
Şekil 4.3. Didyminin 100-1,56 µM/ml aralığında denenen dozlarının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisi (**, $p < 0.01$) (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)



Şekil 4.4. Didyminin 100-1,56 µM/ml aralığında denenen dozlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisinin yüzdelik gösterimi (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)

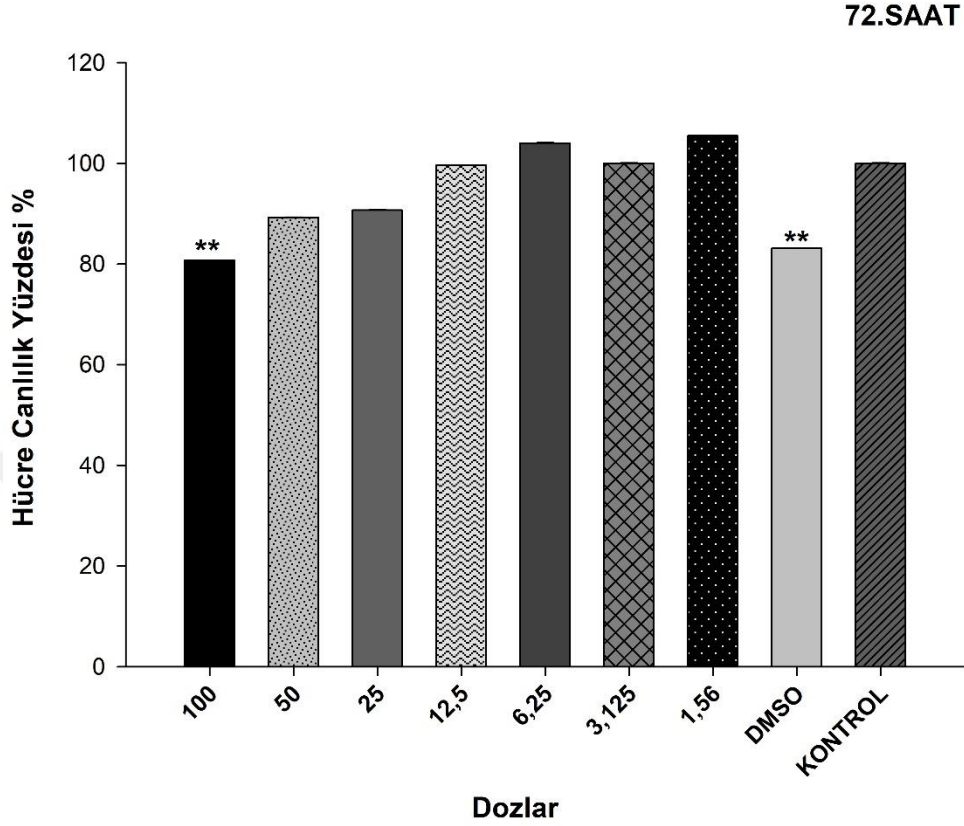
$$\% \text{ Canlılık} = \frac{OD \text{ Örnek}}{OD \text{ Kontrol}}$$

Didyminin 100 – 1,56 µM/ml aralığında denenen dozları 24. saatin sonunda hücre canlılığında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmamıştır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.5. Didyminin 100-1,56 $\mu\text{M/ml}$ aralığında denenen dozlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisinin yüzdelik gösterimi (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)

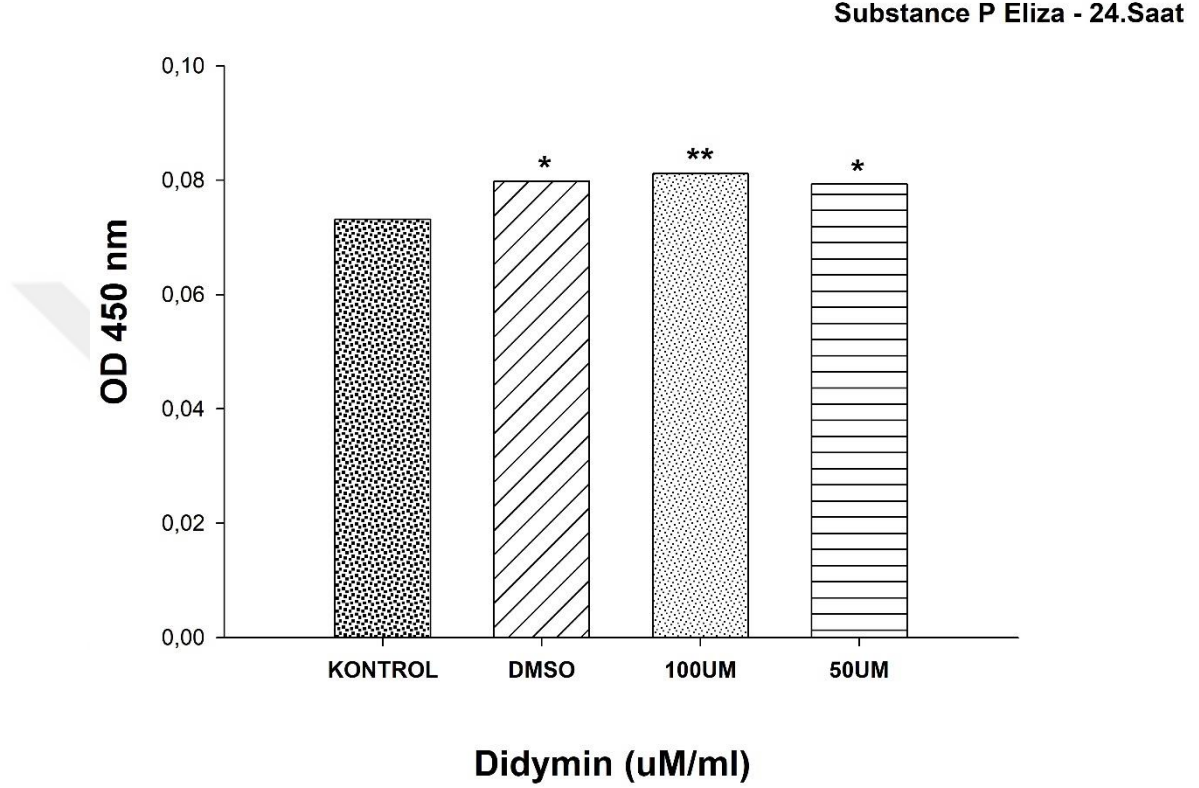
Didyminin 100 – 1,56 $\mu\text{M/ml}$ aralığında denenen dozları 48. saatin sonunda hücre canlılığında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmamıştır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.6. Didyminin 100-1,56 $\mu\text{M/ml}$ aralığında denenen dozlarının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 – MG hücre hattında hücre canlılığına etkisinin yüzdelik gösterimi (**, $p < 0.01$) (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)

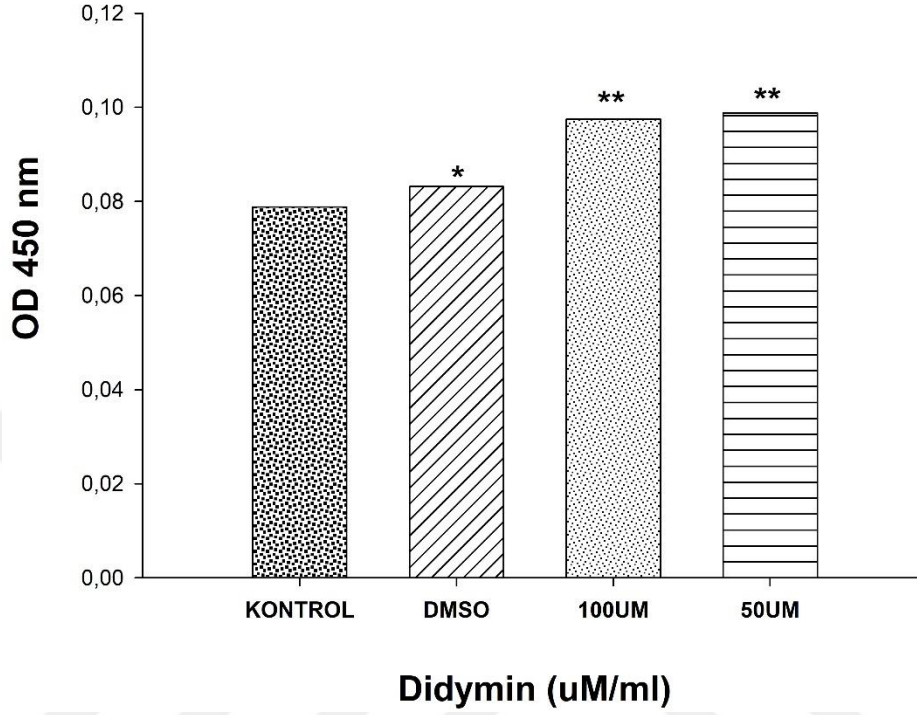
Didyminin 100 – 1,56 $\mu\text{M/ml}$ aralığında denenen dozları 72. saatin sonunda hücre canlılığında kontrole kıyasla 100 $\mu\text{M/ml}$ dozunda anlamlı bir azalma görülmüştür (%80,7, **, $p < 0.01$). Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 72. saatin sonunda azaldığı görülmektedir. Uygulanan diğer doz miktarlarında kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Çözücü kontrol olarak uygulanan DMSO didyminin belirlenen en yüksek dozunda (100 $\mu\text{M/ml}$) bulunan konsantrasyonunda uygulanmış ve kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülmüştür (%83,1 **, $p < 0.01$) (Şekil 4.6.).

4.2.Hücrelerden Besiyerine Salınan Substance P Miktarının Eliza ile Belirlenmesi



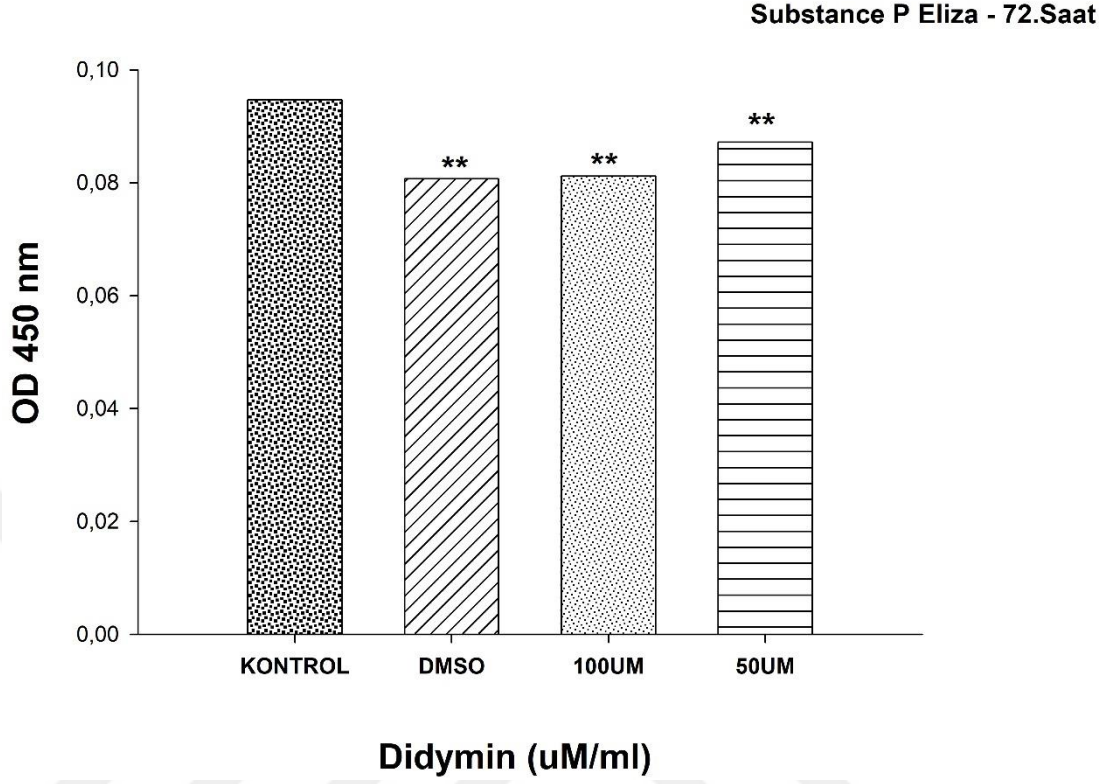
Şekil 4.7. Didyminin 100 $\mu\text{M/ml}$ ve 50 $\mu\text{M/ml}$ dozlarında uygulanmasının ardından 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan Substance P miktarı (**, $p<0.01$, *, $p<0.05$) (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)

Didyminin 100 $\mu\text{M/ml}$ ve 50 $\mu\text{M/ml}$ dozlarında uygulanmasının ardından 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan SP miktarı kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (**, $p<0.01$, *, $p<0.05$). Çözücü kontrol DMSO uygulamasının (100 $\mu\text{M/ml}$) ardından besiyerine salınan SP miktarı 24. saatin sonunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (*, $p<0.05$). (Şekil 4.7.).



Şekil 4.8. Didyminin 100 $\mu\text{M/ml}$ ve 50 $\mu\text{M/ml}$ dozlarında uygulanmasının ardından 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan Substance P miktarı (**, $p<0.01$, *, $p<0.05$) (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)

Didyminin 100 $\mu\text{M/ml}$ ve 50 $\mu\text{M/ml}$ dozlarında uygulanmasının ardından 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan SP miktarı kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (**, $p<0.01$). Çözücü kontrol DMSO uygulamasının (100 $\mu\text{M/ml}$) ardından besiyerine salınan SP miktarı 48. saatin sonunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (*, $p<0.05$) (Şekil 4.8.).

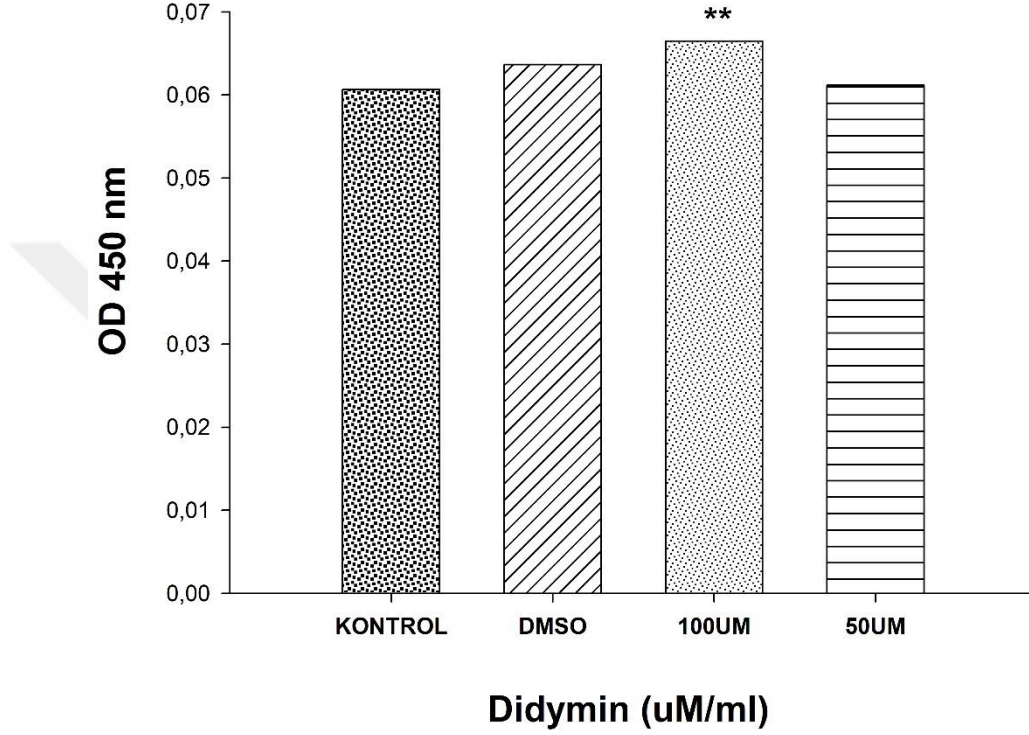


Şekil 4.9. Didymin'in 100 $\mu\text{M/ml}$ ve 50 $\mu\text{M/ml}$ dozlarında uygulanmasının ardından 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan Substance P miktarı (**, $p<0.01$) (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)

Didyminin 100 $\mu\text{M/ml}$ ve 50 $\mu\text{M/ml}$ dozlarında uygulanmasının ardından 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan SP miktarı kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir (**, $p<0.01$). Çözücü kontrol DMSO uygulamasının (100 $\mu\text{M/ml}$) ardından besiyerine salınan SP miktarı 72. saatin sonunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir (**, $p<0.01$). (Şekil 4.9.).

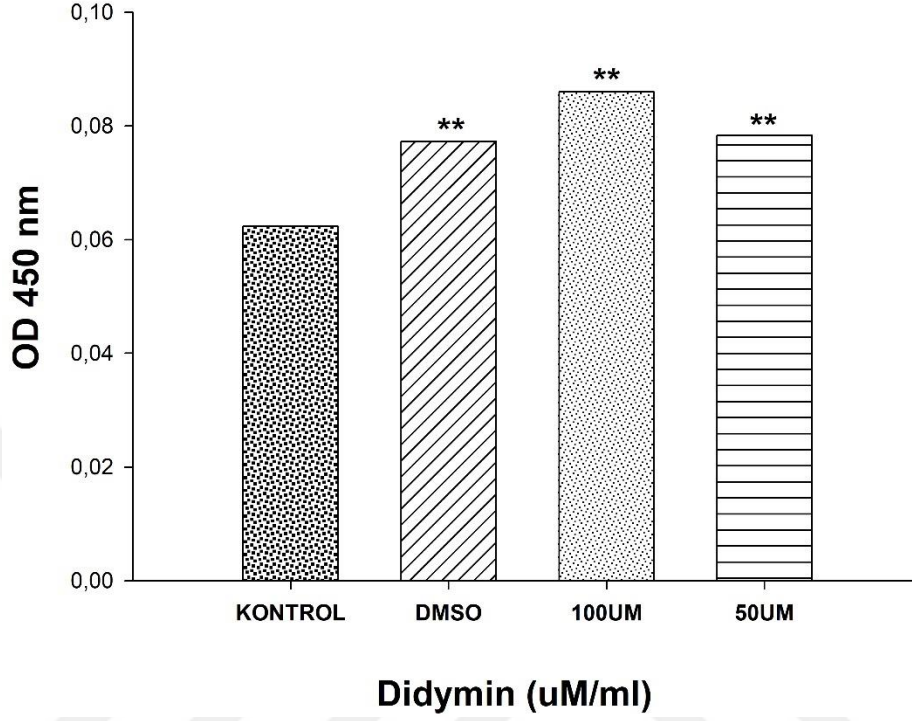
4.3.Hücrelerden Besiyerine Salınan İnterlökin 6 (IL-6) Miktarının Eliza ile Belirlenmesi

İnterlökin-6 Eliza - 24.Saat



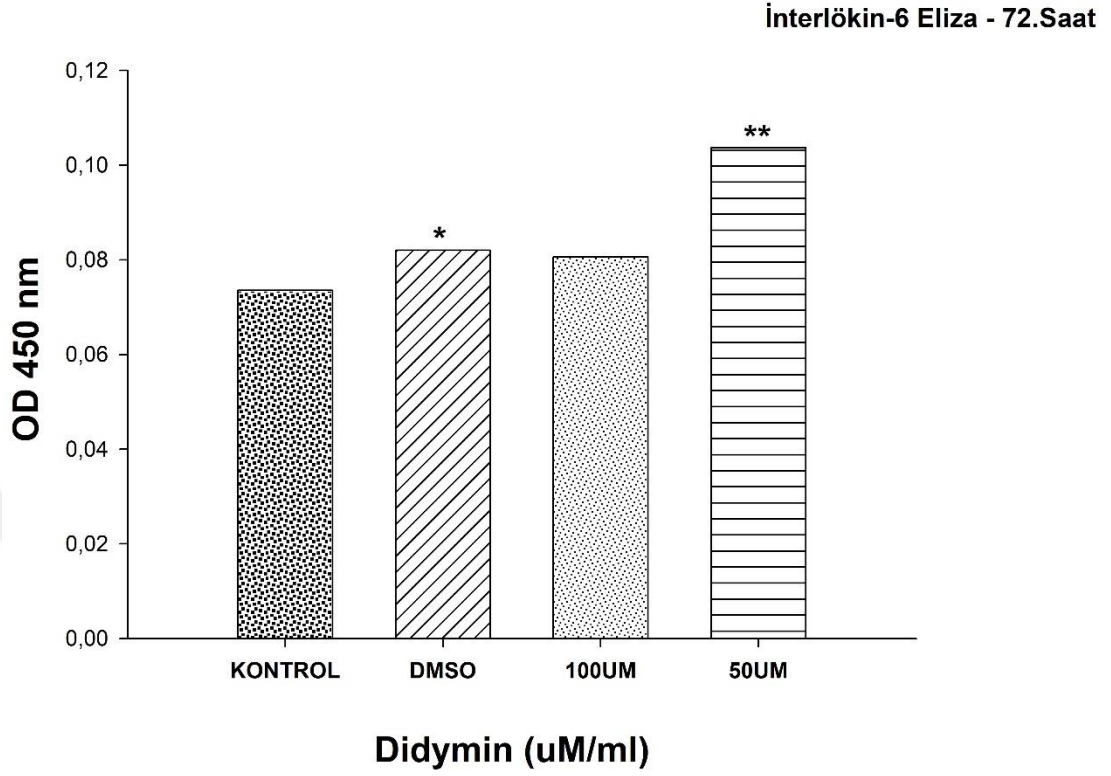
Şekil 4.10. Didyminin 100 $\mu\text{M/ml}$ ve 50 $\mu\text{M/ml}$ dozlarında uygulanmasının ardından 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan İnterlökin 6 miktarı (**, $p<0.01$) (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)

Didyminin 100 $\mu\text{M/ml}$ dozda uygulanmasının ardından 24. saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan IL-6 miktarı kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (**, $p<0.01$). 50 $\mu\text{M/ml}$ ve Çözücü kontrol DMSO uygulamasının (100 $\mu\text{M/ml}$) ardından besiyerine salınan IL-6 miktarı 24. saatin sonunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermemiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.11. Didymin'in 100 μ M/ml ve 50 μ M/ml dozlarında uygulanmasının ardından 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan İnterlökin 6 miktarı (**, $p<0.01$) (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)

Didyminin 100 μ M/ml ve 50 μ M/ml dozlarında uygulanmasının ardından 48. saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan IL-6 miktarı kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (**, $p<0.01$). Çözücü kontrol DMSO uygulamasının (100 μ M/ml) ardından besiyerine salınan IL-6 miktarı 48. saatin sonunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (**, $p<0.01$). (Şekil 4.11.).



Şekil 4.12. Didyminin 100 $\mu\text{M/ml}$ ve 50 $\mu\text{M/ml}$ dozlarında uygulanmasının ardından 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan İnterlökin 6 miktarı (**, $p<0.01$, *, $p<0.05$) (T0: Başlangıç zamanı, DMSO: Dimetil sülfoksit)

Didyminin 100 $\mu\text{M/ml}$ dozda uygulanmasının ardından 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelerden besiyerine salınan IL-6 miktarı kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermemiştir. 50 $\mu\text{M/ml}$ didymin uygulaması kontrole kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir (**, $p<0.01$). Çözücü kontrol DMSO uygulamasının (100 $\mu\text{M/ml}$) ardından besiyerine salınan IL-6 miktarı 72. saatin sonunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (*, $p<0.05$). (Şekil 4.12.).

5. TARTIŞMA

Kanser, kalp hastalıklarından sonrada dünyada en çok ölüme neden olan önemli bir halk sağlığı problemidir (Millimouno ve ark., 2014). Oldukça invaziv ve heterojen tipte bir malign beyin tümörü olan glioblastomanın ayrıntılı moleküler analizleri; hücre büyümesini, DNA, RTK, PI3K, p53 ve MAPK gibi sinyal yollarının düzensizliğini ortaya çıkarmaktadır (Touat ve ark., 2017).

Epidemiyolojik çalışmalar, diyetle meyve ve sebzelerle yüksek flavonoid alımının insanlarda daha düşük kanser prevalansı ile ilişkili olabileceğine dair kanıtlar sağlamıştır (Hung ve ark., 2010). Özellikle turunçgil meyvelerinde bulunan naringenin, tangeretin, hesperidin birçok araştırmanın konusu olmuş, çeşitli kanser türlerinde etkileri aydınlatılmaya çalışılmıştır. 2019 yılında yapılan bir çalışmada hesperidinin GBM tedavisi için doğal bir terapötik ajan olabileceği ve p38 MAPK aktivasyonu yoluyla GBM hücre apoptozunu indükleyebileceği keşfedilmiştir (Li ve ark., 2019). Yapılan çalışmalardan yola çıkarak bu çalışmada daha önce glioblastoma hücrelerinde antikanser özellikleri araştırılmamış olan turunçgil flavonoidi didyminin antikanser aktivitesi U-87 Globlastoma hücrelerinde değerlendirilmiş, IL-6 ve SP miktarlarına etkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda Çin firması AktinLab'dan temin edilen didymin flavonoidi 100-1,56 $\mu\text{M}/\text{ml}$ aralığında uygulandı ve 72. saatte 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dozunda hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalma tespit edildi. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 72. saatin sonunda azaldığı görüldü. Aynı zamanda çözücü kontrol olarak uygulanan DMSO didyminin belirlenen en yüksek dozunun (100 $\mu\text{M}/\text{ml}$) içerdiği miktarda uygulanmış ve sitotoksik etki gözlenmiştir (**, $p<0.01$). Buna göre 24. ve 48. saatin sonunda etki gözlenmeyip 72. saatin sonunda en yüksek dozda (100 $\mu\text{M}/\text{ml}$) etki gözlenmesi dozun miktarı ve inkübasyon süresiyle doğru orantılı bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda DMSO uygulamasında da sitotoksik etki gözlenmesi, didyminin etkisi olarak değerlendirilecek sonucun çözücü madde kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, Hung ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada didyminin akciğer kanseri A549 ve H460 hücrelerinde 20 μM dozunun hücrelerin proliferasyonu %76.5 ve %79.5 oranında inhibe ettiğini, Singhal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise nöroblastoma hücrelerinde

didyminin 50 mmol/L'lik dozunun hücre canlılığını %75'e kadar azalttığı görülmektedir (Hung ve ark., 2010; Singhal ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda uyguladığımız dozlarda daha fazla hücre ölüm beklenirken sadece uygulanan en yüksek dozda (100 μ M/ml) %80,7 oranında hücre canlılığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz didymin flavonoidi Çin firmasından temin edilmiştir. Etken maddenin beklenen etkiyi göstermemesinin firma kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu durumun netleşebilmesi ise farklı firmalardan elde edilecek didymin ile aynı hücre hattında deney tekrarı yapılabilir.

Substance P, nörojenik infalamasyonda yer alan kanserdeki en önemli nöropeptiddir (Oz ve ark., 2011). SP, tümör hücresi proliferasyonu, anjiyogenez, tümör hücresi invazyonu ve metastazında önemli bir rol oynamaktadır (Yamaguchi ve ark., 2017). Normal hücrelere kıyasla GBM'de SP'nin ekspresyonu artmaktadır (Palma ve ark., 1998). Çalışmamızda didymin flavonoidinin U-87 glioblastoma hücrelerinden besiyerine salınan SP miktarına etkisi incelenmiş, 100 μ M/ml ve 50 μ M/ml dozda 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda artmış ve 72. saatin sonunda ise anlamlı olarak azalmıştır. Çözücü kontrol DMSO ise 72. saatte SP salınımı azaltmıştır. Literatürde flavonoidlerin kanser hücrelerinden salınan SP miktarı üzerine etkileriyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. SP'nin IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiş ve hipotezimizi oluşturmamıza katkı sağlamıştır. (Lieb ve ark., 1997; Lieb ve ark., 1998). IL-6 sitokininin glioblastomada artmış ekspresyonu gözlenmekte ve doğrudan hastanın hayatta kalma süresini etkilemektedir (Chang ve ark., 2005). Kim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kuersetin GBM hücrelerinde IL-6 salınımını ve STAT3 fosforilasyonunu azaltmıştır (Kim ve ark., 2021). Başka bir çalışma kuersetinin, IL-6 ile indüklenen STAT3 sinyal yolundaki etkilerini incelemiş, glioblastoma hücrelerinin proliferatif ve göç özelliklerinde belirgin bir azalmaya neden olmuştur (Michaud-Levesque ve ark., 2012). 2012'de yapılan başka bir çalışmada açai meyvesinden elde edilen vetulin flavonoidinin periton makrofajlarında ve fare peritoneal makrofajlarında lipopolisakarit ile indüklenen proinflamatuvar sitokin tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve IL-6 üretimini azaltmadaki etkileri gösterilmiştir (Xie ve ark., 2012). Çalışmamızda 24. saatin sonunda kanser hücrelerine uygulanan 100 μ M/ml dozunda kontrole kıyasla

anlamli IL-6 salinimi, 48. saatte her bir dozda anlamli salinimi, 72. saatte ise yalnızca 50 μ M/ml dozda anlamli salinimi gözlenmiştir. Didymin ve IL-6 salinimi ile ilgili literatürde yapılan ilk çalışma bu çalışma olmakla beraber; çalışmamızda didyminin IL-6 salınımlarını her inkübasyon süresinde neredeyse tüm dozlarla anlamli olarak artırdığı gözlenlenmiştir. SP miktarını ise 24. ve 48. saatlik inkübasyon süresinde arttırıp 72. saatin sonunda azalttığı gözlenmiştir. Glioblastoma hücrelerine didymin uygulamasının inflamasyon ve ağrı yolağındaki iki önemli sitokinde artışa sebep olması bu flavonoidin bu kanser türünün tedavisinde etkili bir terapötik olma olasılığını azaltmaktadır. Literatürde didymin flavonoidinin SP ve IL-6 miktarlarına etkisini araştıran fazla çalışma olmaması nedeniyle bu konuda daha ileri düzey çalışmalar yapılmalı ve didyminin bu etkisi netlik kazanmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda didymin flavonoidinin U-87 MG Globlastoma hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etkisi zamana ve doza bağlı olarak değişmektedir. Didymin; 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 'lik konsantrasyonlarda hücrelere uygulanmış ve üç farklı inkübasyon süresi (24, 48 ve 72 saat) için test edilmiştir. SP ve IL-6 miktarı tayini için sitotoksikite test sonuçlarına göre belirlenen dozlarda (100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ve 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$) didymin uygulaması yapılmış ve 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda hücrelerden besiyerine salınan miktarları eliza test kitleri ile ölçülmüştür. Tüm bu verilerle birlikte değerlendirildiğinde çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

1. Didyminin 100 – 1,56 $\mu\text{M}/\text{ml}$ aralığında denenen dozları 24. ve 48. saatin sonunda hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Ancak 72. saatin sonunda hücre canlılığında kontrole kıyasla sadece 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dozunda sitotoksik etki görülmüştür. Doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının 72. saatin sonunda azaldığı görülmektedir. Çözücü kontrol olarak uygulanan DMSO sitotoksik etki göstermiştir. Buna göre 24. ve 48. saatin sonunda etki gözlenmeyip 72. saatin sonunda en yüksek dozda (100 $\mu\text{M}/\text{ml}$) etki gözlenmesi didyminin sitotoksik etkisinin doz ve inkübasyon süresiyle doğru orantılı bir artışa neden olduğunu düşündürmektedir. Aynı zamanda çözücü kontrol DMSO uygulamasında da sitotoksik etki gözlenmesi, didyminden kaynaklı olan etkinin aslında çözücü etkisi olabileceğini göstermektedir. Gözlenen bu sitotoksik etkinin çözücü olarak kullanılan DMSO'dan mı didyminden mi kaynaklı olduğu doğrulanmalıdır.
2. Didymin besiyerine salınan SP miktarını 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ve 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dozda 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda artmış ve 72. saatin sonunda ise anlamlı olarak azalmıştır. Çözücü kontrol DMSO ise 72. saatte SP salınımı azaltmıştır. SP miktarında 24. ve 48. saatte gözlenen artış ve 72. saatte görülen azalma didyminin SP ile ilişkili inflamasyon ve ağrı sinyal yollarını etkileyebileceğini göstermektedir.

3. Didymin besiyerine salınan IL-6 miktarını 24. saatin sonunda 100 μ M/ml dozunda anlamlı olarak arttırmıştır. 48. saatte her bir dozda anlamlı artışa neden olmuş, 72. saatte ise yalnızca 50 μ M/ml dozda anlamlı artış gözlenmiştir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda didyminin glioblastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve diğer etki mekanizmaları ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Didyminin farklı bir firmadan temin edilerek glioblastoma ve henüz denenmemiş diğer kanser hücre hatları üzerindeki etkisi araştırılmalıdır. Bu çalışma sonucunda didyminin glioblastoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinden tam olarak bahsedebilmek için daha fazla çalışma yapılmalı, ağrı ve inflamasyon yolları üzerindeki etkisi karşılaştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A. Büsselberg, D. Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers*. 2018;11(1),28.
- Ahmad, A., Kaleem, M., Ahmed, Z., Shafiq, H. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Research International*. 2015;77, 221–235.
- Ali, M. Y., Zaib, S., Rahman, M. M., Jannat, S., Iqbal, J., Park, S. K., Chang, M. S. Didymnin, a dietary citrus flavonoid exhibits anti-diabetic complications and promotes glucose uptake through the activation of PI3K/Akt signaling pathway in insulin-resistant HepG2 cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2019;305:180–194.
- Altmann, K. H., Gertsch, J. Anticancer drugs from nature—natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Natural Product Reports*. 2007;24(2), 327–357.
- Babu, P. V. A., Liu, D., Gilbert, E. R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24(11), 1777–1789.
- Badshah, S. L., Faisal, S., Muhammad, A., Poulson, B. G., Emwas, A. H., Jaremko, M. Antiviral activities of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;140, 111596.
- Bagherian, A., Mardani, R., Roudi, B., Taghizadeh, M., Banfshe, H. R., Ghaderi, A., Mirzaei, H. Combination Therapy with Nanomicellar-Curcumin and Temozolomide for In Vitro Therapy of Glioblastoma Multiforme via Wnt Signaling Pathways. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2020;70(10), 1471–1483.

- Blackadar, C. B. Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology*. 2016;7(1), 54-86.
- Boulmouk, Y., Belguidoum, K., Meddour, F., Amira-Guebailia, H. Investigation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate and epicatechin as compared to resveratrol and ascorbic acid: experimental and theoretical insights. *Structural Chemistry*. 2021;1–17.
- Byun, Y. S., Mok, J. W., Chung, S. H., Kim, H. S., Joo, C. K. Ocular surface inflammation induces de novo expression of substance P in the trigeminal primary afferents with large cell bodies. *Scientific Reports*. 2020;10(1), 1–11.
- Chang, C. Y., Li, M. C., Liao, S. L., Huang, Y. L., Shen, C. C., Pan, H. C. Prognostic and clinical implication of IL-6 expression in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2005: 12(8), 930–933.
- Chen, L., Cao, H., Huang, Q., Xiao, J., Teng, H. Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021;3, 1-13.
- Chen, Y. Y., Chang, Y. M., Wang, K. Y., Chen, P. N., Hseu, Y. C., Chen, K. M., Hsu, L. S. Naringenin inhibited migration and invasion of glioblastoma cells through multiple mechanisms. *Environmental Toxicology*. 2019;34(3), 233–239.
- Choi, E. J., Jung, J. Y., Kim, G. H. Genistein inhibits the proliferation and differentiation of MCF-7 and 3T3-L1 cells via the regulation of ER α expression and induction of apoptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2014;8(2), 454–458.
- Cragg, G. M., Pezzuto, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Medical Principles and*

Practice. 2016;25(2), 41–59.

Cutone, A., Colella, B., Pagliaro, A., Rosa, L., Lepanto, M. S., Bonaccorsi di Patti, M. C., Musci, G. Native and iron-saturated bovine lactoferrin differently hinder migration in a model of human glioblastoma by reverting epithelial-to-mesenchymal transition-like process and inhibiting interleukin-6/STAT3 axis. *Cellular Signalling*. 2020;65, 109461.

Duo, J., Ying, G. G., Wang, G. W., Zhang, L. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Molecular Medicine Reports*. 2012;5(6), 1453–1456.

Erkekoğlu, P., Baydar, T. Güncel İn Vitro Sitotoksikite Testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 2021;41(1).

Gautam, M., Gabrani, R. Combinatorial Effect of Temozolomide and Naringenin in Human Glioblastoma Multiforme Cell Lines. *Nutr Cancer*. 2021;25:1-8

Glade, M. J. Food, nutrition, and the prevention of cancer: A global perspective. *Nutrition*. 1999;15, 523–526

Gonzales, G. B., Smagghe, G., Grootaert, C., Zotti, M., Raes, K., Camp, J. Van. Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: A sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metabolism Reviews*. 2015;47(2), 175–190.

Graefe, E. U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A. K., Uehleke, B., Drewelow, B., Veit, M. Pharmacokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2021;41(5), 492–499.

- Hanahan, D., Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5), 646–674.
- Hardee, M. E., Zagzag, D. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *American Journal of Pathology*. 2021;181(4), 1126–1141.
- Hasima, N., Aggarwal, B. B. Cancer-linked targets modulated by curcumin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2012.
- Hollman, P. C. H. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*. 2004;42, 74-83,
- Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M., Cross, M. J. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling*. 2007;19(10), 2003–2012.
- Hostettmann, K., Marston, A. Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews*. 2002;1(3), 275–285.
- Hsu, Y. L., Hsieh, C. J., Tsai, E. M., Hung, J. Y., Chang, W. A., Hou, M. F., Kuo, P. L. Didymin reverses phthalate ester-associated breast cancer aggravation in the breast cancer tumor microenvironment. *Oncology Letters*. 2016;11(2), 1035–1042.
- Hung, J. Y., Hsu, Y. L., Ko, Y. C., Tsai, Y. M., Yang, C. J., Huang, M. S., Kuo, P. L. Didymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Lung Cancer*. 2010;68(3), 366–374.
- Imanishi, N., Tuji, Y., Katada, Y., Maruhashi, M., Konosu, S., Mantani, N., Ochiai, H. Additional inhibitory effect of tea extract on the growth of influenza A and B

- viruses in MDCK cells. *Microbiology and Immunology*. 2002;46(7), 491–494.
- Jaal, J., Kase, M., Minajeva, A., Saretok, M., Adamson, A., Junninen, J., Asser, T. VEGFR-2 expression in glioblastoma multiforme depends on inflammatory tumor microenvironment. *International Journal of Inflammation*. 2015; 385030.
- Jayaraman, R., Subramani, S., Sheik Abdullah, S. H., Udaiyar, M. Antihyperglycemic effect of hesperetin, a citrus flavonoid, extenuates hyperglycemia and exploring the potential role in antioxidant and antihyperlipidemic in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018;97, 98–106.
- Kim, H. I., Lee, S. J., Choi, Y. J., Kim, M. J., Kim, T. Y., Ko, S. G. Quercetin Induces Apoptosis in Glioblastoma Cells by Suppressing Axl/IL-6/STAT3 Signaling Pathway. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2021;49(3), 767–784.
- Kim, M., Jung, J., Jeong, N. Y., Chung, H. J. The natural plant flavonoid apigenin is a strong antioxidant that effectively delays peripheral neurodegenerative processes. *Anatomical Science International*. 2019;94(4), 285–294.
- Koes, R., Verweij, W., Quattrocchio, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci*. 2005;10(5):236-42.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., Bernatoniene, J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. 2020;12;12(2):457.
- Korfi, F., Javid, H., Assaran Darban, R., Hashemy, S. I. The Effect of SP/NK1R on the Expression and Activity of Catalase and Superoxide Dismutase in Glioblastoma Cancer Cells. *Biochemistry Research International*, 2021; 6620708.
- Kozłowska, A., Szostak-Węgierek, D. Flavonoids-Food Sources, Health Benefits. *Rocz*

Panstw Zakl Hig. 2014;65(2):79-85.

Kumar, S., Chashoo, G., Saxena, AK., Pandey, A. K. Parthenium hysterophorus: a probable source of anticancer, antioxidant and anti-HIV agents. BioMed Research International. 2013; 810734.

Kumar, S., Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. The Scientific World Journal. 2013; 162750.

Lalani, S., Poh, C. L. Flavonoids as Antiviral Agents for Enterovirus A71 (EV-A71). Viruses. 2020;12(2):184.

Li, Q., Miao, Z., Wang, R., Yang, J., Zhang, D. Hesperetin Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells via p38 MAPK Activation. Nutr Cancer. 2020;72(3):538-545.

Lieb, K, Fiebich, B. L., Berger, M., Bauer, J., Schulze-Osthoff, K. The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells. The Journal of Immunology. 1997;159(10).

Lieb, Klaus, Schaller, H., Bauer, J., Berger, M., Schulze-Osthoff, K., Fiebich, B. L. Substance P and histamine induce interleukin-6 expression in human astrocytoma cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-IL-6. Journal of Neurochemistry. 1998;70(4), 1577–1583.

Lila, M. A., Burton-Freeman, B., Grace, M., Kalt, W. Unraveling Anthocyanin Bioavailability for Human Health. Annual Review of Food Science and Technology. 2016;7, 375–393.

Lin, X., Bai, F., Nie, J., Lu, S., Lu, C., Zhu, X., Huang, Q. Didymnin Alleviates Hepatic Fibrosis Through Inhibiting ERK and PI3K/Akt Pathways via Regulation of Raf

- Kinase Inhibitor Protein. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;40(6), 1422–1432.
- Lotito, S. B., Frei, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*. 2006;41(12), 1727–1746.
- Magalhães, M., Manadas, B., Efferth, T., Cabral, C. Chemoprevention and therapeutic role of essential oils and phenolic compounds: Modeling tumor microenvironment in glioblastoma. *Pharmacological Research*. 2021;169, 105638.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. American Society for Nutrition. 2004;79(5), 727-747.
- Mann, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2:2, 2(2), 143–148.
- Manson, M. M. Cancer prevention - The potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol Med*. 2003;9(1):11-8.
- Manthey, J. A. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation*. 2000;7(6): 29-34.
- Mazza, G. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. 1997.
- McNeill, K. A. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics*. 2016;34(4), 981–998.

- Michaud-Levesque, J., Bousquet-Gagnon, N. Béliveau, R. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. *Experimental cell research*. 2012;318(8), 925–935.
- Middleton, E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1998;439, 175–182.
- Millimouno, F. M., Dong, J., Yang, L., Li, J., Li, X. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prevention Research*. 2014; 7(11):1081-107.
- Morelli, S., Piscioneri, A., Salerno, S., Al-Fageeh, M. B., Drioli, E., De Bartolo, L. Neuroprotective effect of didymin on hydrogen peroxide-induced injury in the neuronal membrane system. *Cells Tissues Organs*. 2014;199, 184–200.
- Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy. *Curr Drug Targets*. 2011;12(6):909-21
- Nabavi, S. M., Šamec, D., Tomczyk, M., Milella, L., Russo, D., Habtemariam, S., Shirooie, S. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnol Adv*. 2020;38:107316.
- Ni, L., Zhou, L., Zhou, M., Zhao, J., Wang, D. W. Combination of western medicine and Chinese traditional patent medicine in treating a family case of COVID-19. *Frontiers of medicine*. 2020;14(2), 210–214.
- Ninfali, P., Antonelli, A., Magnani, M., Scarpa, E. S. Antiviral Properties of Flavonoids and Delivery Strategies. *Nutrients*. 2020;12(9), 2534.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Barnholtz-

- Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncology*. 2015;17(4), 1–62.
- Oteiza, P. I., Fraga, C. G., Mills, D. A., Taft, D. H. Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018;61, 41–49.
- Oz, E. Ş., Aydemir, E., Korcum, A. F., Fiskin, K. Thalidomide and irradiation combination therapy increases substance P levels in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2011;2(3), 529.
- Palma, C., Nardelli, F., Manzini, S., Maggi, C. A. Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. *British Journal of Cancer*. 1999;79:2, 79(2), 236–243.
- Pan, H., Zhou, W., He, W., Liu, X., Ding, Q., Ling, L., Wang, S. Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF-κB activity via the Notch-1 pathway. *International Journal of Molecular Medicine*. 2012;30(2), 337–343.
- Pan, M. H., Lai, C. S., Ho, C. T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and Function*. Royal Society of Chemistry. 2010;(1),15-31.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*. Cambridge University Press. 2016; 29;5:e47.
- Pang, X., Zhang, X., Jiang, Y., Su, Q., Li, Q., Li, Z. Autophagy: Mechanisms and therapeutic potential of flavonoids in cancer. *Biomolecules*. 2021; 11(2), 135.
- Park, J. R., Eggert, A., Caron, H. Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment.

Pediatr Clin N Am. 2008;55(1), 97–120.

Pei, R., Liu, X., Bolling, B. Flavonoids and gut health. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;61, 153–159.

Rahaman, S. O., Harbor, P. C., Chernova, O., Barnett, G. H., Vogelbaum, M. A., Haque, S. J. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene*. 2002;21(55), 8404–8413.

Rahaman S. T., Mondal, S. Flavonoids: A vital resource in healthcare and medicine (Includes their effective action on COVID-19). *Pharmacology & Pharmacy*. 2020;8(2), 91-104.

Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F., Osborn, H. M. I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013;45(12), 2821–2831.

Rees, A., Dodd, G. F., Spencer, J. P. E. The Effects of Flavonoids on Cardiovascular Health: A Review of Human Intervention Trials and Implications for Cerebrovascular Function. *Nutrients*. 2018;10(12), 1852.

Rhun E, Preusser M, Roth P, Reardon DA, van den Bent M, Wen P, Reifenberger G, Weller M. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev*. 2019;80:101896.

Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., Gaforio, J. J., Gaforio, J. J. Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: An updated review of human studies. *Antioxidants*. 2019; 18;8(5):137.

Roschek, B., Fink, R. C., McMichael, M. D., Li, D., Alberte, R. S. Elderberry flavonoids

- bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry*. 2009;70(10), 1255–1261.
- Scarano, A., Chieppa, M., Santino, A. Looking at Flavonoid Biodiversity in Horticultural Crops: A Colored Mine with Nutritional Benefits. 2018;7(4).
- Shukla, K., Sonowal, H., Saxena, A., Ramana, K. V. Didymin by suppressing NF- κ B activation prevents VEGF-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Vascular Pharmacology*. 2019;115(2018), 18–25.
- Singhal, J., Nagaprashantha, L. D., Vatsyayan, R., Ashutosh, Awasthi, S., Singhal, S. S. Didymin induces apoptosis by inhibiting N-Myc and upregulating RKIP in neuroblastoma. *Cancer Prevention Research*. 2012;5(3), 473–483.
- Singhal, S. S., Singhal, S., Singhal, P., Singhal, J., Horne, D. Awasthi, S. Didymin: An orally active citrus flavonoid for targeting neuroblastoma. *Oncotarget*. 2017;8(17), 29428–29441.
- Sudhakaran, M., Sardesai, S., Doseff, A. I. Flavonoids: New frontier for immunoregulation and breast cancer control. *Antioxidants*. 2019; 8(4),103.
- Świeca, M., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B., Czyz, J. The influence of protein-flavonoid interactions on protein digestibility in vitro and the antioxidant quality of breads enriched with onion skin. *Food Chemistry*. 2013;141(1), 451–458.
- Tadamitsu. K. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989;74(1), 1–10.
- Tan, A. C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S., Khasraw, M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70(4), 299–312.

Touat, M., Idbaih, A., Sanson, M., Ligon, K. L. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(7), 1457–1472.

Tudek, B., Winczura, A., Janik, J., Siomek, A., Foksinski, M., & Oliński, R. Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *American journal of translational research*. 2010;2(3), 254–284.

U-87 MG | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-14>

Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(21), 6532–6538.

Wedick, N. M., Pan, A., Cassidy, A., Rimm, E. B., Sampson, L., Rosner, B., Van Dam, R. M. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012;95(4), 925–933.

Wei, J., Huang, Q., Bai, F., Lin, J., Nie, J., Lu, S., Lin, X. Didymine induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and up-regulation of RKIP in human hepatoma cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2017;261, 118–126.

Wick W, Osswald M, Wick A, Winkler F. Treatment of glioblastoma in adults. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;25;11.

Williamson, G., Clifford, M. N. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochemical Pharmacology*. 2017;139, 24–39.

Williamson, G., Kay, C. D., Crozier, A. The Bioavailability, Transport, and Bioactivity

of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018;17(5), 1054–1112.

Xie, C., Kang, J., Li, Z., Schauss, A. G., Badger, T. M., Nagarajan, S., Wu, X. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(9), 1184–1191.

Yamaguchi, K., Kumakura, S., Murakami, T., Someya, A., Inada, E., Nagaoka, I. Ketamine suppresses the substance P-induced production of IL-6 and IL-8 by human U373MG glioblastoma/astrocytoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;39(3), 687–692.

Yamaguchi, K., Kumakura, S., Someya, A., Iseki, M., Inada, E., Nagaoka, I. Anti-inflammatory actions of gabapentin and pregabalin on the substance P-induced mitogen-activated protein kinase activation in U373 MG human glioblastoma astrocytoma cells. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16(5), 6109–6115.

Yamaguchi, K., Richardson, M. D., Bigner, D. D., Kwatra, M. M. Signal transduction through substance P receptor in human glioblastoma cells: Roles for Src and PKC δ . *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2005;56(6), 585–593.

Yang, B., Liu, H., Yang, J., Gupta, V. K., Jiang, Y. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends in Food Science & Technology*. 2018; 79, 116–124.

Yao, Q., Lin, M. T., Zhu, Y. Di, Xu, H. L., Zhao, Y. Z. Recent Trends in Potential Therapeutic Applications of the Dietary Flavonoid Didymnin. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2018;23(10).

Yuan, Y., Xue, X., Guo, R. B., Sun, X. L., Hu, G. Resveratrol Enhances the Antitumor Effects of Temozolomide in Glioblastoma via ROS-dependent AMPK-TSC-mTOR Signaling Pathway. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2012;18(7), 536–546.

Zamora-Ros, R., Biessy, C., Rothwell, J. A., Monge, A., Lajous, M., Scalbert, A., Romieu, I. Dietary polyphenol intake and their major food sources in the Mexican Teachers' Cohort. *British Journal of Nutrition*. 2018;120(3), 353–360.

Zhai, K., Brockmüller, A., Kubatka, P., Shakibaei, M., Büsselberg, D. Curcumin's beneficial effects on neuroblastoma: Mechanisms, challenges, and potential solutions. *Biomolecules*. 2020;10(11), 1469.

Zhang, Y., Wang, S. X., Ma, J. W., Li, H. Y., Ye, J. C., Xie, S. M., Zhong, X. Y. EGCG inhibits properties of glioma stem-like cells and synergizes with temozolomide through downregulation of P-glycoprotein inhibition. *Journal of Neuro-Oncology*. 2015;121(1), 41–52.

Zhao, Z., Jin, G., Ge, Y., Guo, Z. Naringenin inhibits migration of breast cancer cells via inflammatory and apoptosis cell signaling pathways. *Inflammopharmacology*. 2019;27(5), 1021–1036.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	NAİME	Uyruğu	T.C.
Soyadı	BULUT	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	DR. İLHAMİ TANKUT ANADOLU LİSESİ	2014
Lisans	SANKO ÜNİVERSİTESİ	2019
Yüksek Lisans	AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ	Devam ediyor.
Doktora		

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	70

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
ERASMUS+ Staj Hareketliliği Programı kapsamında MALTA St. Vincent de Paul Long Term Care Facility & Saura Home for Elderly'de staj	ERASMUS	3 AY
Yemekte Denge Projesi	Sabri Ülker Gıda Araştırmaları Enstitüsü Vakfı	1 YIL

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası Bilimsel Gelişmeler Kongresi (ICONSAD'21) - Diyet Flavonoidi Didimin ve Anti-kanser Etkileri Sözlü Sunum Bildiri