

**FURANOKUMARİN BİLEŞİKLERİNDEN OLAN
BERGAPTOL'ÜN ANTİKANSER POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**EVALUATION OF THE ANTICANCER POTANTIAL OF
BERGAPTOL, ONE OF THE FURANOCOUMARIN
COMPOUNDS**

BUSE BEKAR

Dr. ÖĞR. ÜYESİ Handan SEVİM AKAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2025



*Beni her koşulda destekleyen **aileme...***

ÖZET

FURANOKUMARİN BİLEŞİKLERİNDEN OLAN BERGAPTOL'ÜN ANTİKANSER POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Buse BEKAR

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Handan SEVİM AKAN

Ocak 2025, 101 sayfa

Furanokumarinler, birçok bitki tarafından üretilen doğal bileşiklerdendir ve doğu ülkelerinde yüzyıllardır tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Günümüzde furanokumarinler yaygın olarak antiseptik, nöroprotektif, osteoprotektif ve antioksidan açıdan incelenmektedir. Kansere, dünyada hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde her yıl milyonlarca ölüme neden olan en ağır tıbbi durumlardan biri olarak kabul edilmektedir. Mevcut tedavi yaklaşımları arasında en sık tercih edilen yöntemlerden olan kemoterapi ve radyoterapi etkin tedavi yaklaşımları olmalarına karşın hasta açısından pek çok fiziksel ve psikolojik zorluğu beraberinde getirmektedir. Aynı zamanda, kanser hücrelerinin kemoterapötiklere karşı geliştirdiği direnç mekanizması da tedavilerin başarısız sonuçlanmasına neden olabilmektedir. Yukarıda sayılan nedenlerden dolayı, artan kanser vakalarına karşı yeni ve etkin tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi

elzemdir. Doğal ürünler kullanılarak geliştirilen ajanlar, bu konuda iyi alternatifler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, furanokumarin bileşiklerinden olan bergaptol'ün antikanser potansiyeli üç farklı kanser hücre hattı olan MDA-MB-231, HepG2, HeLa hücre hatlarında; anti-anjiyogenik potansiyeli üç boyutlu kültürde (3B) HUVEC hücreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu kapsamda bergaptolün antikanser etkilerinin araştırılması amacıyla; iki boyutlu (2B) hücre kültürü koşullarında MTT ve AO/PI analizleri ile canlılık, Annexin V/PI analizleri ile apoptoz, BrdU ve Cytophase Violet analizleri ile hücre döngüsünün incelendiği deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ardından 3B kültür koşullarında bergaptolün anti-anjiyogenik etkinliğini değerlendirmek amacıyla HUVEC hücreleri CFSE ile işaretlenerek çok hücreli mikro dokular oluşturulmuş ve bergaptol uygulamasını takiben akış sitometrisi ve konfokal mikroskopi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen veriler, bergaptolün kanser hücreleri ve endotel hücrelerinde yüksek sitotoksositeye neden olduğunu, buna karşın; sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu toksik etkinin altında yatan mekanizma incelendiğinde, bergaptol uygulaması sonrası apoptotik hücre oranında artış olduğu ve bu artışın yanı sıra hücre döngüsü inhibisyonu ile birlikte hücre proliferasyonunun baskılandığı tespit edilmiştir. 3B hücre kültürü çalışmaları sonucunda ise; mikro dokulara bergaptol uygulaması sonrası, hücre canlılıklarında azalma ile birlikte sferoid çaplarında küçülmeler meydana gelmiştir. Aynı zamanda, 3B mikro dokularda işaretlenen HUVEC hücrelerinin bergaptol uygulamasının ardından kritik derecede azaldığı görülmüştür. Tüm bulgular birlikte ele alındığında; bergaptolün, yüksek anti-kanser ve anti-anjiyogenik potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Furanokumarinler, bergaptol, anti kanser moleküller, mikro dokular, 3B hücre kültürü, kanserde anjiyogenez

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTICANCER POTENTIAL OF BERGAPTOL, ONE OF THE FURANOCOUMARIN COMPOUNDS



Buse BEKAR

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Handan SEVİM AKAN

January 2025, 101 pages

Furanocoumarins are natural compounds produced by many plants and have been used therapeutically for centuries in eastern countries. Today, furanocoumarins are widely studied as antiseptics, neuroprotectives, osteoprotectives and antioxidants. Cancer is recognized as one of the most serious medical conditions in the world, causing millions of deaths each year in both developed and developing countries. Although chemotherapy and radiotherapy, which are the most preferred methods among the current treatment

approaches, are effective treatment approaches, they bring many physical and psychological difficulties for the patient. At the same time, the resistance mechanisms developed by cancer cells against chemotherapeutics may also lead to unsuccessful treatments. For the above-mentioned reasons, it is essential to develop new and effective treatment approaches against the increasing number of cancer cases. Agents developed using natural products are good alternatives in this regard.

In this thesis, the anticancer potential of bergaptol, a furanocoumarin compound, was evaluated in three different cancer cell lines, MDA-MB-231, HepG2, HeLa cell lines and its anti-angiogenic potential was evaluated using HUVEC cells in three-dimensional culture (3D). In this context, in order to investigate the anticancer effects of bergaptol, experimental studies were carried out under two-dimensional (2D) cell culture conditions in which viability was examined by MTT and AO/PI assays, apoptosis by Annexin V/PI assays, and cell cycle by BrdU and Cytophase Violet assays. Then, in order to evaluate the anti-angiogenic activity of bergaptol in 3D culture conditions, HUVEC cells were labeled with CFSE to form multicellular microtissues and flow cytometry and confocal microscopy analyses were performed following bergaptol treatment.

The data obtained showed that bergaptol caused high cytotoxicity in cancer cells and endothelial cells, whereas it had no toxic effect on healthy cells. When the mechanism underlying this toxic effect was examined, it was found that there was an increase in the rate of apoptotic cells after bergaptol administration, and in addition to this increase, cell proliferation was suppressed with cell cycle inhibition. As a result of 3D cell culture studies; after bergaptol application to micro tissues, cell viability decreased, and spheroid diameters decreased. At the same time, HUVEC cells labeled in 3D microtissues were critically reduced after bergaptol treatment. Taken together, it was concluded that bergaptol has high anti-cancer and anti-angiogenic potential.

Keywords: Furanocoumarins, bergaptol, anti-cancer molecules, microtissues, 3D cell culture, angiogenesis in cancer

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca her koşulda bana destek olan, yol gösteren, motive eden, akademik disiplini ve bilgisiyle yolumu aydınlatan, sevgisini ve desteğini her anımda hissettiğim, çok değerli danışman hocam **Dr. Öğr. Üyesi Handan SEVİM AKAN**'a,

Lisans hayatımdan bu yana bilime dair merakımı tetikleyen, fizyolojiyi sevdiren, değerli bilgileriyle ufkumu açan ve desteğiyle ilerlememi sağlayan sayın hocam **Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR**'a,

Beni her koşulda motive eden, destek olan, yol gösteren, çok değerli tecrübeleri ve bilimsel bakış açılarıyla tez sürecimi kolaylaştıran değerli hocalarım; **Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR**'a, **Doç. Dr. Esin AKBAY ÇETİN**'e ve **Doç. Dr. Hanife GÜLER DÖNMEZ**'e,

En zor anlarımda destekleri ve yardımlarıyla bana güç veren çok değerli arkadaşlarım; **Elçin TANK**, **Cihan Emin KONAN**, **Şefika ÖZCAN** ve **İbrahim KAMACI**'ya. Çalışma ortamımı güzelleştiren, yardıma ihtiyacım olduğu her an yanımda olan değerli ekip arkadaşlarım; **Uğur YILMAZ**, **Teoman Utku YEĞENOĞLU**, **İrem Yağmur GÖK**, **Irmak DAL**, **Seda Nur EKİNCİ**, **Nehir TÜRKKAN** ve **Selen SARAÇOĞLU**'na,

Lisans hayatımın başlangıcından bu yana güzel anılar biriktirmemi sağlayan, her zaman sevgisiyle, desteğiyle beni motive eden can dostum **Laika KARDANA**'ya,

Tüm varlıklarıyla beni destekleyip attığım her adımda bana inanan, sevgiyle sarıp sarmalayan, bana sevgiyi, disiplini ve pes etmeden ilerlemeyi öğreten, her daim kendime olan inancımı arttıran sevgili annem **Ayten BEKAR** ve sevgili babam **Coşkun BEKAR**'a,

Bana hayatın renklerini öğreten, varlıklarıyla yaşamı daha güzel kılan ve destekleriyle yolumu aydınlatan canım kardeşlerim **Büşra**, **Rabia Nur**, **Tuana** ve **Ravza Ayşe**'ye,

Tüm içtenliğimle saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Furanokumarinler	3
2.1.1. Bergaptol	4
2.2. Kanser.....	5
2.2.1. Kanser Mikro Çevresi	8
2.2.3. Kanserde Anjiyogenez.....	9
2.3. Kanserde Tedavi Yaklaşımları	11
2.3.1.Kanserde Güncel Tedavi Yaklaşımları	11
2.3.2 Kanserde Bitkisel Tedavi Yaklaşımları	11
2.3.3. Kanser Tedavisinde 2 Boyutlu ve 3 Boyutlu Sistemler	13
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	16
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	16
3.1.1. Hücre Hatları ve Hücre Kültürü.....	16
3.1.2. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) – Canlılık Analizi	17
3.1.3. Akridin Turuncusu-Propidium İyodür (AT/Pİ) Boyaması	18
3.1.4. Koloni Formasyonu Deneyi	19
3.1.4. BrdU ile Hücre Döngüsünün S Fazındaki Hücrelerin Tespiti	20
İmmünohistokimya Yöntemi	20
3.2. Akış Sitometrisi Analizleri	21
3.2.1. Hücre Apoptozunun Analizi; Annexin V-FITC/Propidium İyodür İşaretleme	21

3.2.2. Hücre Döngüsünün Akış Sitometrik Değerlendirmesi	22
3.3. Sferoidlerin (Mikro Dokuların) Oluşturulması	22
3.4. Mikro Dokularda Hücre Canlılığının Tespiti.....	25
3.5. Endotel Hücrelerin Takibi	25
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	28
4.1.2. AT/Pİ Boyaması	36
4.1.3. Koloni Formasyonu Deneyi	41
4.2. BrdU ile S Fazındaki Hücrelerin İşaretlenmesi	42
4.3. Akış Sitometrisi Analizleri.....	46
4.3.2. Hücre Döngüsünün Akış Sitometrik Değerlendirmesi	60
4.4. Sferoidlerin (mikro dokuların) oluşturulması	70
4.5. Endotel Hücrelerinin Takibi	75
5. YORUM	81
KAYNAKLAR.....	84
EKLER	97
EK - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	98
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Furanokumarin sentez şeması.....	3
Şekil 1.2. Hücre döngüsü kontrol noktalarının görevlerinin özeti.....	6
Şekil 2.3. Meme Kanseri alt tipleri	7
Şekil 2.4. Kansere mikro çevresi ve mikro çevrede bulunan hücre tipleri.....	9
Şekil 2.5. Normal damarlanma ve kanser damarlanması.....	10
Şekil 2.6. Kansere yönelik tedavi yaklaşımları.....	11
Şekil 2.7. Çok hücreli kanser sferoidlerinin gösterimi.....	14
Şekil 3.1. MTT aşamalarının görsel ifadesi.....	17
Şekil 3.2. Kalıp hazırlama adımları.....	23
Şekil 3.3. Asılı damla yöntemi ile hücre ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü.....	24
Şekil 4.1. Bergaptol uygulamasının HeLa hücre canlılığına etkisinin MTT analizi sonuçları.....	28
Şekil 4.2. Bergaptol uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücre canlılığına etkisinin MTT analizi sonuçları.....	29
Şekil 4.3. Bergaptol uygulaması sonrası HepG2 hücre canlılığına etkisinin MTT analizi sonuçları.....	30
Şekil 4.4. Bergaptol uygulaması sonrası HUVEC hücre canlılığına etkisinin MTT analizi sonuçları.....	31
Şekil 4.5. Bergaptol uygulaması sonrası HDF hücre canlılığına etkisinin MTT analizi sonuçları.....	32
Şekil 4.6. Hela hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası floresan görüntüleri.....	35
Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası floresan görüntüleri.....	36
Şekil 4.8. HepG2 hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası floresan görüntüleri.....	37

Şekil 4.9. HUVEC hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası floresan görüntüleri.....	38
Şekil 4.10. HDF hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası floresan görüntüleri.....	39
Şekil 4.11. 25 µM bergaptol uygulaması sonrası HeLa, MDA-MB-231 ve HepG2 hücre hatlarında koloni oluşumunun görüntülenmesi.....	41
Şekil 4.12. Bergaptol uygulaması öncesi ve sonrası BrdU işaretli hücrelerin ifadeleri.....	44
Şekil 4.13. Kanser hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası BrdU pozitif hücre ortalamalarının ifadesi.....	45
Şekil 4.14. Apoptotik analizlerin değerlendirilmesi için şablon düzeni.....	47
Şekil 4.15. MDA-MB-231, 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulamaları sonrası Annexin V-FITC/PI tahlili sonuçları.....	49
Şekil 4.16. HeLa 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulamaları sonrası Annexin V-FITC/PI tahlili sonuçları.....	51
Şekil 4.17. HepG2 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Annexin V-FITC/PI tahlili sonuçları.....	53
Şekil 4.18. HUVEC 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Annexin V-FITC/PI tahlili sonuçları.....	55
Şekil 4.19. 24. Saat kapılama stratejileri ve unstained verileri.....	57
Şekil 4.20. 48. Saat kapılama stratejileri ve unstained verileri.....	58
Şekil 4.21. 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Annexin V-FITC/PI tahlili sonuçları.....	59
Şekil 4.22. HeLa 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Cytophase Violet sonuçları.....	62
Şekil 4.23. MDA-MB-231 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Cytophase Violet sonuçları.....	64
Şekil 4.24. HepG2 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Cytophase Violet sonuçları.....	66

Şekil 4.25. 24. Saat kapılama stratejileri ve unstained verileri.....	67
Şekil 4.26. 48. Saat kapılama stratejileri ve unstained verileri.....	68
Şekil 4.27. 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Cytophase Violet tahlili sonuçları.....	69
Şekil 4.28. Hela+HUVEC+HDF hücreleri ile oluşturulan mikro dokuların bergaptol uygulaması öncesi ve sonrası fotoğrafları.....	72
Şekil 4.29. MDA-MB-231+HUVEC+HDF hücreleri ile oluşturulan mikro dokuların bergaptol uygulaması öncesi ve sonrası fotoğrafları.....	73
Şekil 4.30. HepG2+HUVEC+HDF hücreleri ile oluşturulan mikro dokuların bergaptol uygulaması öncesi ve sonrası fotoğrafları.....	74
Şekil 4.31. CFSE işaretli hücrelerin akış sitometri sonuçları.....	77
Şekil 4.32. Konfokal mikroskopi görüntüleri.....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μM	Mikromolar
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
nm	Nanometre
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
g	Gram

Kısaltmalar

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal Bovine Serum
PBS	Phosphate-Buffered Saline
MTT	3-4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
2B	2 Boyutlu
3B	3 Boyutlu
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü
TNBC	Üçlü Negatif Meme Kanseri Hücreleri

HPV	İnsan Papilloma Virüsü
ECM	Hücre Dışı Matriks
HUVEC	İnsan Göbek Kordonu Endotel Hücreleri
AO/PI	Acridine Orange/Propidium İodid
BrdU	5-bromo-2-deoksiüridin
CFSE	Karboksifloresan Suksinimidil Ester



1. GİRİŞ

Furanokumarinler, birçok bitki tarafından üretilen ve uzun zamandır doğu ülkelerinde tıbbi amaçlı kullanılan fitokimyasallardır [1]. Fenolik bileşikler olan furanokumarinler, bitkilerde enfeksiyon veya saldırı gibi durumlarda oluşan strese karşı üretilir ve saldıran organizmaya karşı toksin işlevi görmektedir [2]. Angilicin ve psoralen, sırasıyla açısı ve lineer furanokumarinler için öncü görevi gören temel furanokumarin bileşikleridir [3]. Kanseri tedavisi amacıyla geliştirilen ilaçların %65'inin doğal kaynaklardan elde edildiği de göz önünde bulundurulduğunda; furanokumarinlerin antikanser potansiyelini değerlendirmek için yapılacak çalışmalar, yeni tedavi yaklaşımları sunulması adına umut verici görünmektedir [4]. Bu bileşiklerden biri olan bergaptol, özellikle limon, greyfurt ve bergamot gibi turunçgillerde doğal olarak bulunan bir furanokumarindir.

Kanser, vücuttaki çeşitli hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı, dünya genelinde görülen en yaygın halk sağlığı sorunlarından biridir [5]. Kanser için mevcut tedavi seçenekleri arasında; cerrahi, radyasyon tedavisi ve kemoterapinin kombinasyonu, hormon tedavisi, immün terapi bulunmaktadır [6]. Ancak, tüm bu tedavi yöntemlerinin yan etkileri göz önünde bulundurulduğunda yeni terapötik alternatifler geliştirmenin önemi ortaya çıkmaktadır. Bu kapsamda, özellikle doğal olarak bitkilerde bulunan etken maddeler önemli araştırma sahası oluşturmaktadır.

Kanser mikro ortamı ve kanser anjiyogenezi, kanser hücrelerinin oluşması, çoğalarak yaşamlarına devam edebilmeleri ve ilaç direnci oluşturmaları için kritik öneme sahiptir. Kanser mikro ortamına bakıldığında; endoteller, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri gibi çeşitli hücreler karşımıza çıkmaktadır [7, 8]. Bu mikro ortam kanser hücresine destek sağlamak ve aynı zamanda morfolojisini, protein ve gen ekspresyon profillerini, hücre göçünü, istilasını ve anjiyogenezi etkilemektedir [9]. Kanser anjiyogenezi, kanserli hücrenin metastazı için yol sağlar. Bu nedenle, kanser ilerlemesi açısından kritik öneme sahiptir. Kanser araştırmalarında anjiyogenezi hedeflemek, kanser ilerlemesini sınırlamak için umut verici bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır [7, 10].

Kanser tedavisine yönelik ilaç geliştirme çalışmaları, iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) kültür sistemlerinde gerçekleştirilmektedir. İki boyutlu koşullarda gerçekleştirilen çalışmalar, kanser mikro ortamını dolayısıyla hücre dışı matriks, hücre-hücre etkileşimleri, hücre-matriks etkileşimleri, hücrelerin oksijen profilleri gibi önemli parametreleri taklit etmede yetersiz kalabilmektedir. İki boyutlu hücre kültürlerinin aksine özellikle de çok hücreli 3B kültürler, kanser mikro ortamını taklit etmede oldukça başarılıdır.

Gerçekleştirdiğimiz tez çalışması kapsamında kullanılan; MDA-MB-231 meme kanseri, HeLa rahim ağzı kanseri ve HepG2 karaciğer kanseri hücre hatları, dünya genelinde sık rastlanan kanser türlerinden olmaları ve anti-kanser potansiyelini değerlendireceğimiz bergaptol bileşiği ile daha önce çalışılmamış olmaları dikkate alınarak seçilmiştir.

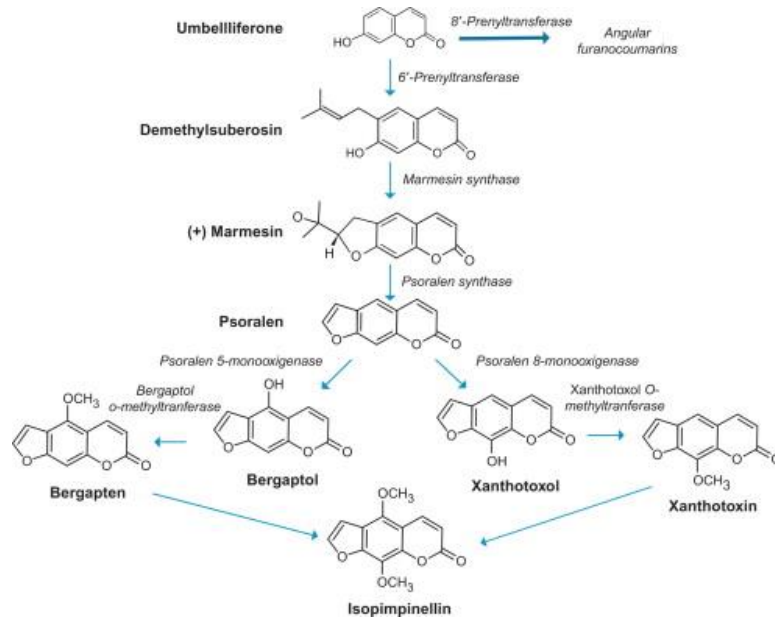
Bu kapsamda çalışmamızda bergaptol bileşiğinin anti-kanser potansiyeli; MDA-MB-231, HeLa ve HepG2 hücre hatları kullanılarak, öncelikle 2B kültürde sitotoksik, apoptotik ve anti-proliferatif açıdan değerlendirilmiş ve ileri deneysel çalışmalarda 3B çok hücreli (HDF+HUVEC+Kanser) kanser mikro dokuları oluşturularak kanser damarlanmasında meydana gelen değişiklikler açısından incelenmiştir. Ayrıca 3B mikro dokularda hücre canlılığı analiz edilerek, endotel ve fibroblastlarla desteklenen kanser ortamında bergaptole karşı verilen cevap anti-kanser özellikleri açısından araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Furanokumarinler

Furanokumarin ailesi; bitkiler tarafından mantar, bakteri ve böcek saldırısı gibi durumlarda strese yanıt olarak üretilen doğal bileşiklerdir [1, 11]. Kimyasal yapısına baktığımızda kumarin ve furan halkası kombinasyonundan oluşan bir yapı karşımıza çıkmaktadır ve furan halkasının konumuna göre doğrusal veya açısıl formda olabilmektedirler [3, 12]. İlk izole edilen furanokumarin, 1838 yılında Kalbrunner tarafından *Citrus bergamia* yağından elde edilen 5-Methoxypsoralendir ve uzun yıllardır bu bileşikler özellikle doğu ülkelerinde vitiligo/sedef hastalığı gibi cilt hastalıkları, astım/bronşit gibi solunum sistemi hastalıkları, mantar/bakteri enfeksiyonları ve sindirim sistemi bozuklukları gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır [3].

Furanokumarin üretimi, başlangıçta umbelliferon ile başlar, sonrasında doğrusal ve doğrusal olmayan furanokumarinler üretmek için iki yola ayrılır [13]. Açısıl furanokumarinler, umbelliferondan 8 dimetil alil transferaz enzimi tarafından ostenol bileşiğinin üretilmesiyle başlarken; doğrusal furanokumarinler **Şekil 2.1**'de görüldüğü gibi umbelliferondan 6 dimetil alil transferaz enzimi ile demetilsüberosinin senteziyle başlar [14].



Şekil 2.1. Furanokumarin sentez şeması [15]

Furanokumarin ailesine ait bazı üyeler fototoksiktir ve ultraviyole radyasyona maruz kaldıklarında cilt üzerinde yanıklara sebebiyet verebilmektedirler [16]. Bu fitokimyasallar, bitkiler arasında en fazla Apiceae familyasının üyelerinde bulunmaktadır. Örneğin bu ailede yer alan yaban otu, ciltte yanıklara neden olabilecek furanokumarinlere sahiptir ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için farmasötiklerde kullanılmaktadır [17]

Furanokumarinler arasında, ksantotoksin olarak bilinen metoksalenin FDA tarafından ilaç olarak kullanılması uygun görülmüştür [17]. Klinik uygulamalara baktığımızda; ksantotoksin ve bergapten, kutanöz T hücreli lenfoma, vitiligo ve sedef gibi hastalıkların tedavilerinde karşımıza çıkmaktadır [2, 11, 18]. Bunun yanında, furanokumarin bileşiklerinin diğer kemoterapötikler ile kullanıldığında kemoterapötiklerin antikanser aktivitelerini artırdığı gözlemlenmiştir ve aynı zamanda hem doğrusal (psoralen, bergapten, ksantotoksin, imperatorin, izoimperatorin, oksipeusedanin) hem de açısallı (angilisin) furanokumarinler için sitotoksik özellikler doğrulanmıştır [1, 17, 19-21].

2.1.1. Bergaptol

Bergaptol (5-hidroksipsoralen veya 5-hidroksifuranokumarin), esas olarak Rutaceae ailesine ait greyfurtta bulunan doğrusal tipte bir furanokumarindir [22]. Moleküler formülü $C_{11}H_6O_4$, moleküler ağırlığı 202.16 g/mol ve yarılanma süresi 8 saattir [23, 24]. **Şekil 2.1.** de görüldüğü gibi psoralen bileşiğinin C-5 pozisyonuna bir hidroksil grubu bağlanmasıyla sentezlenir.

Son çalışmalar, bergaptolün potansiyel anti-kanser ve anti-inflamatuar etkiye sahip bir ajan olduğunu göstermektedir [18]. Bergaptolün sitokrom p450'lerin (CYP), aktivitelerini inhibe ederek, bazı ilaçların ve toksinlerin metabolizmasını etkileyebileceği kanıtlanmıştır. Bunun yanında, P-glikoprotein gibi ilaç taşıyıcıların baskılayabileceği ve böylece kemoterapötiklerin ilaç direncini yenebileceği düşünülmektedir [25]. Aynı zamanda bergaptolün tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interlökin (IL-1 β ve IL-6) seviyelerini önemli ölçüde azaltarak inflammatuar faktörlerin ekspresyonunu inhibe ettiği de aydınlatılan etki mekanizmaları arasında yer almaktadır [26]. Bergaptolün emilimi ve yarı ömrü üzerine yapılan çalışmalar, orta derecede emilime sahip olduğunu ve plazmada

diğer 15 kumarine göre daha uzun süre kalabildiğini göstermiştir [25, 27]. Fototoksisitenin araştırıldığı *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarda ise diğer furanokumarinlerin aksine bergaptolün fototoksik veya fotomutajenik olmadığı bulunmuştur [28, 29]. Bu sonuçlar; bergaptolü diğer furanokumarinlere göre daha tercih edilebilir kılmaktadır. Mevcut literatüre dayanarak, bergaptolün potansiyel etkilerini değerlendirmek ve farmakolojik potansiyelini doğru şekilde anlayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

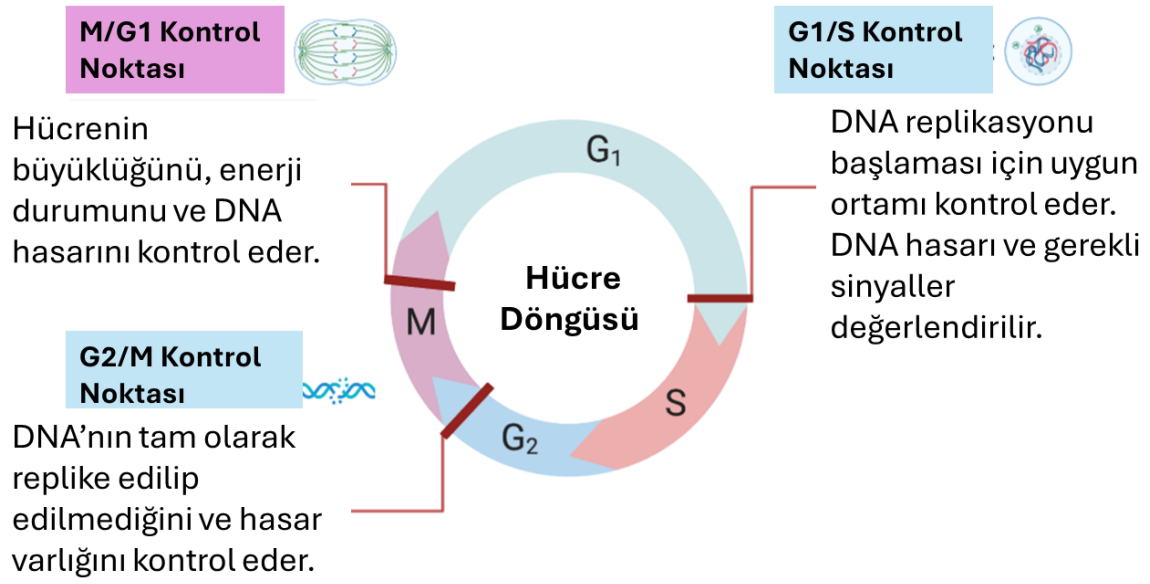
2.2. Kanser

Kanser, dünya çapında her yıl milyonlarca ölüme neden olan yaygın ölümcül hastalıklardan biridir [30]. Bu yaygın prevalansa neden olan faktörler arasında; tütün ve alkol kullanımındaki artış, fiziksel aktivitede azalma, genetik yatkınlık, beslenme bozuklukları ve buna bağlı olarak vücut kitle indeksinin artması sıralanabilir.

Normal şartlarda, hücre bölünmesini ve büyümesini kontrol eden mekanizmalar sayesinde, hücre bölünmesi kontrol altında tutulur. Bu mekanizmalarda bir hata meydana geldiğinde, hücreler öngörülemez bir şekilde bölünmeye başlar ve kanser oluşumu meydana gelir. Genel olarak, kanser hücrelerinin tümü, sınırsız bölünme potansiyeline sahip olmakla birlikte; büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık geliştirmeleri, dokuyu istila etmeleri, sürekli olarak damarlanma eğilimi göstermeleri ve apoptozdan kaçmaları ile karakterizedir.

Kanserde, onkogenlerin aktivasyonu veya kanser baskılayıcı genlerin deaktivasyonu, hücre döngüsünün kontrolünün kaybedilmesine ve apoptoz mekanizmasının yok olmasına yol açar [31]. Apoptoz, vücutta homeostazın sürdürülmesi için elzem olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır [32]. Fetal gelişim sırasında ve yetişkin dokularda gerçekleşen çeşitli fizyolojik süreçlerde kritik rol oynamaktadır [33]. Kanserin oluşum sürecini incelediğimizde ise, hücrel çöğalma ve programlanmış hücre ölümü arasındaki dengesizliğin yol açtığı anormal ve aşırı hücre birikimi karşımıza çıkmaktadır [34]. Aynı zamanda, apoptoz sürecinde meydana gelen kusurlar kanser metastazına ve ilaç direncine neden olabilmektedir [35]. Bu nedenle, kanser tedavisine yönelik çalışmaların apoptoz mekanizmasını aktive etmesi önemlidir [36].

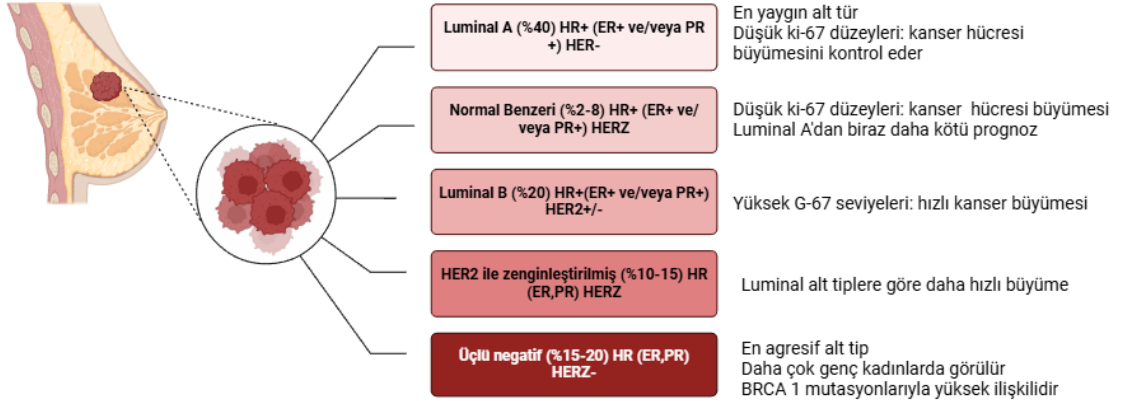
Normal koşullarda; mutasyona uğramış veya yaşlı hücreler, hücre döngüsünün kontrol noktalarından geçemez ve yok edilir. Ancak hücre döngüsündeki bozulma bu hücrelerin bölünmeye devam etmesine ve böylece mutasyon birikmesine neden olmaktadır [37]. Hücre döngüsündeki kontrolün kaybıyla birlikte, kontrolsüz çoğalan hücrelerin apoptozdan da kaçmalarıyla kanser oluşumu meydana gelir. Bu nedenle, kanser tedavisine yönelik çalışmalarda, hücre döngüsünü hedefleyerek proliferasyonu baskılayabilmek ve apoptozu aktive edebilmek kritik öneme sahiptir.



Şekil 2.2. Hücre döngüsü kontrol noktalarının görevlerinin özeti (Biorender ile oluşturulmuştur).

Dünya çapında en sık rastlanan ve kanser araştırmaları için yüksek öneme sahip kanser türlerini ele alacak olursak; ilk sırada karşımıza meme kanseri çıkmaktadır. Meme kanseri; meme lobüllerinde, tüplerinde veya bağ dokusunda gelişim gösterebilen bir kanser çeşididir [38]. Meme kanserinin oluşmasında ve ilerlemesinde, pek çok genetik ve çevresel faktör veya bunların kombinasyonu rol oynamaktadır. Bu içsel veya dışsal faktörlerle gelişen kanserin mikro çevresindeki, pek çok kötü huylu ve iyi huylu hücrenin etkileşimi; kanserli hücrenin hayatta kalması, büyümesi ve metastazında kritik rol oynamaktadır [39].

Meme Kanseri Alt Tipleri



Created in BioRender.com

Şekil 2.3. Meme Kanseri alt tipleri (Biorender ile oluşturulmuştur).

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık teşhis edilen kanser türü olmasıyla; büyük bir küresel sağlık sorunu haline gelmiştir [40]. Son 10 yıl içerisinde, meme kanseri hastalığında sağ kalım oranındaki artışa karşın bununla doğru orantılı olarak hastalığın görülme sıklığı da her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle, meme kanserini önlemeye ve tedavisine ilişkin çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

Meme kanseri hücreleri genellikle östrojen, progesteron ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) için reseptörlere sahiptir. Bu reseptörlerin, üçünün de ifade edilmediği hücreler üçlü negatif meme kanseri hücreleri (TNBC) olarak adlandırılmaktadır (**Şekil 2.3**). Bu reseptörlerin hiçbirinin ifade edilmemesi, kanserin hızla ilerlemesine ve tedavisine yönelik yaklaşımların kısıtlanmasına neden olmaktadır. MDA-MB-231 hücre hattı, bu hücre tiplerinden birini temsil eden ve *in vitro* çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır [41].

Kadınlar arasında sık rastlanan ve kanser araştırmalarında önemli yer edinmiş bir diğer kanser türü de rahim ağzı kanseridir. Vakaların %80'inde insan papilloma virüsü (HPV) rol oynamaktadır [42, 43]. Gelişmiş ülkeler, rahim ağzı kanserini önlemeye ve insidansı azaltmaya yönelik aşılama ve tarama programları geliştirse de hala dünya çapında büyük bir sağlık sorunu olmaya

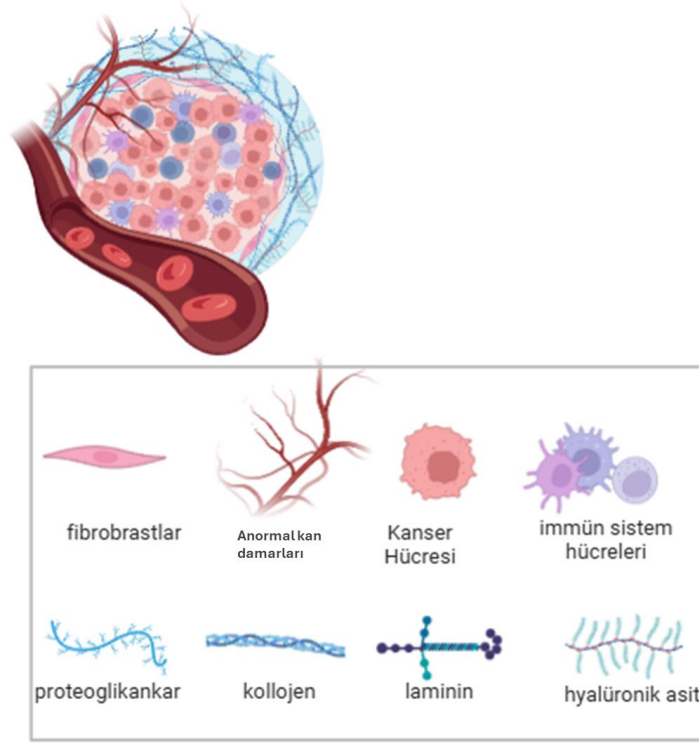
devam etmektedir [44, 45]. Güncel tedavi yaklaşımları, genellikle kalıcı tedaviden ziyade kemoterapi ve cerrahiye içeren sağ kalım süresini uzatmaya yönelik stratejileri içerir [46].

Hepatosit karsinom veya karaciğer kanseri, dünyada en çok görülen primer karaciğer malignitesidir ve dünyada kansere bağlı ölümler arasında üçüncü sırada gelmektedir [47, 48]. Hepatosit karsinomu, birincil karaciğer kanserinin %80-90'a yakın kısmını oluşturmaktadır [49]. 2025 yılına kadar her yıl 1 milyon üzerinde kişinin birincil karaciğer kanserinden etkileneceği tahmin edilmektedir [50]. Giderek artan görülme sıklığı bu hastalığı önemli bir araştırma konusu haline getirmiştir [51]. Aynı zamanda primer kanserin haricinde, karaciğerin anatomik lokalizasyonu, endotelial fenestrasyonu ve immüno-supresif ortamı nedeniyle, başka kanserli doku ve organların metastazından kaynaklanan sekonder karaciğer kanseri de yaygın olarak görülmektedir [52]. Hücre hatları, kanser dokularının eşdeğerleri olarak *in vitro* çalışmalarda kullanılmaktadır [47]. HepG2 hücre hattı da *in vitro* ortamda kullanılan önemli bir hepatik hücre hattıdır.

Yukarıda belirtilen nedenlerle çalışmamızda bu üç farklı tip kanser seçilmiştir. Bu kanser türlerinin tümünde insidansın ve ölüm oranlarının yüksek olması nedeniyle bu alanda gerçekleştirilecek çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

2.2.1. Kanser Mikro Çevresi

Kanserli dokuda, kanser hücrelerinin yanı sıra kanser patogeneğinde rol oynayan çeşitli hücreler bulunur [53]. Bu hücreler ve bunlar arasındaki etkileşimler, kanser mikro çevresini oluşturur. Kanser mikro çevresi; kanser oluşumu, invazyonu ve ilerleyişini anlamamız için kritik öneme sahiptir. Bu mikro çevreyi oluşturan hücre tiplerine baktığımızda; fibroblastlar, endotel hücreleri, bağışıklık hücreleri gibi heterojen bir hücre topluluğu karşımıza çıkmaktadır (**Şekil 2.4**) [54]. Çeşitli hücre tiplerinin heterojen karışımının yanı sıra kanser hücrelerinin oluşumunda hücre dışı matriks (ECM) ve hücrelerden salgılanan farklı tipteki salgılar da rol oynar [55]. Bu mikro çevre, kanserin ilerlemesinde kritik rol oynamaktadır.



Şekil 2.4. Kanser mikro çevresi ve mikro çevrede bulunan hücre tipleri (Biorender ile oluşturulmuştur).

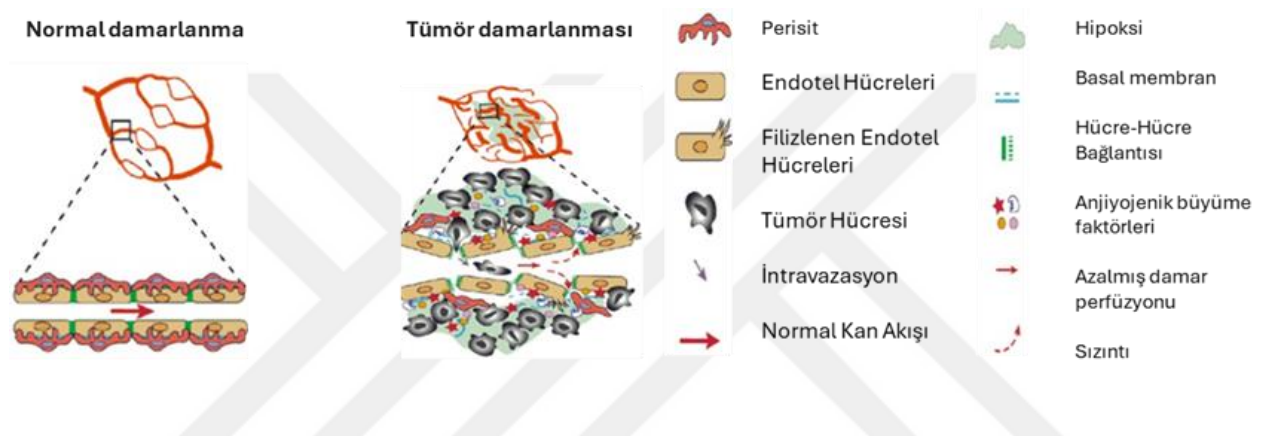
Kanser hücreleri, bağışıklık hücreleri, endotel hücreleri ve hücre dışı matriks arasındaki etkileşimler, oluşan kanserin plastisitesini etkileyerek, metastatik yayılıma yol açmaktadır [56]. Kanser hücresinin, mikro çevresindeki kötü huylu olmayan hücreleri kullanarak hayatta kalması ve işgalci bir yapıya bürünmesi nedeniyle, kanser mikro çevresi “şeytan sığınağı” olarak nitelendirilmiştir [57]. Bu konunun çalışılması kanser tedavisine yönelik çalışmalardaki başarının artması açısından önemlidir.

2.2.3. Kanserde Anjiyogenez

Tüm gelişmiş organizmalar büyümek ve hayatta kalmak için işlevsel bir damar sistemine ihtiyaç duymaktadır. Damar sisteminin en temel görevi, doku ve organlara oksijen ve besin taşımak olmakla birlikte tüm bunların ötesinde hayati pek çok işleve sahiptir [58]. Anjiyogenez veya yeni kan damarı oluşumu olarak adlandırılan süreç embriyogenezde veya yetişkin bir canlıdaki yeniden damar şekillenmesi (doku rejenerasyonu, yara iyileşmesi) aşamalarında kritik rol oynamasının yanı sıra kanser gelişimi ve ilerlemesi gibi pek çok patolojik

durumda da kendini göstermektedir [59, 60]. Bu nedenle, anjiyogenez süreci normal fizyolojik koşullar altında sıkı bir şekilde denetlenmektedir [61].

Kanser damarlanması, normal damarlanmaya kıyasla bazı fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler gösterme eğilimindedir. Normal damar yapısında görülen bazal membran ve perisit örtüsünü sağlamlaştıran sıkı hücre-hücre bağlantıları kanser damarlarında oldukça deforme olmuş bir form sergilemektedir (**Şekil 2.5.**). Bu deforme olmuş endotel bağlantıları nedeniyle kanser hücreleri bulundukları yerden ayrılıp çevre dokulara yayılabilme potansiyeli gösterirler.



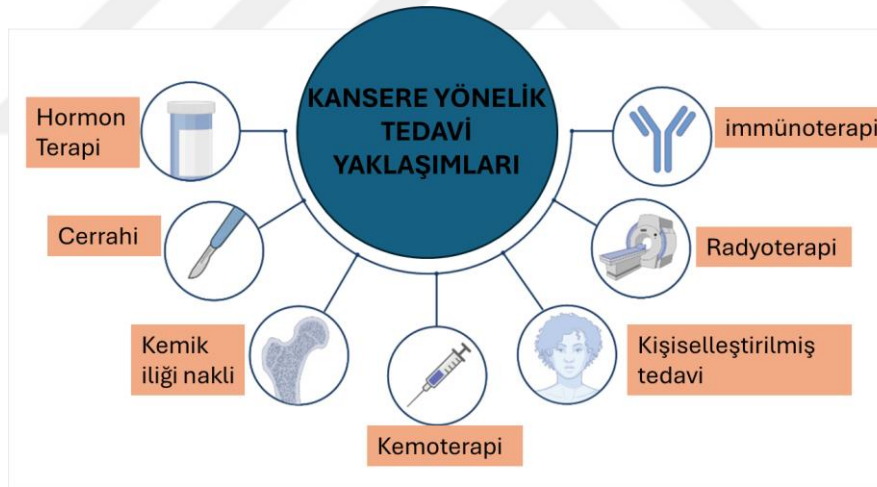
Şekil 2.5. Normal damarlanma ve kanser damarlanmasının karşılaştırılması [62]

Anjiyogenez yeteneği, kanserin en belirgin özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir [63, 64]. Büyüyen kanserli doku, yüksek besin ve oksijen ihtiyacı duymaya başlar ve bu nedenle yeni kan damarları geliştirmesi gerekmektedir. Aynı zamanda, geliştirdiği kan damarları sayesinde bulunduğu konumdan ayrılarak başka doku ve organlara da metastaz yapabilmektedirler [65]. Eğer damarlanma gerçekleşmezse, kanser dokuları nekroza veya apoptoza uğrayabilmektedirler [62]. Bu durumda kanser dokusunun damarlanmasını baskılamak, kansere yönelik tedavilerin başarısını arttırmak için büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla, hücre kültürü ortamında gerçekleştirilen çalışmalar için insan göbek kordonu endotel hücreleri (HUVEC) model oluşturma çalışmalarında sık tercih edilen bir hücre hattını temsil etmektedir. Bu hücre hattı, tüm endotel hücre tiplerini temsil etmiyor olsa da vasküler endotel özellikleri ve endotellerin biyolojik fonksiyonlarını incelemek için çok kullanışlı bir model sergilemektedir [66].

2.3. Kanserde Tedavi Yaklaşımları

2.3.1.Kanserde Güncel Tedavi Yaklaşımları

Kanser tedavisine yönelik geleneksel yaklaşımlar arasında; kanser dokusunun cerrahi operasyon ile çıkarılması, kanserli bölgeye radyoterapi uygulama gibi lokal etkiye sahip yöntemler veya kemoterapi ve immün terapi gibi sistemik etki eden yöntemler bulunmaktadır (**Şekil 2.6.**) [67]. Kemoterapötikler, bitki kaynaklı ve sentetik kökenli olarak iki sınıfa ayrılmaktadır ve kanser tedavisi için en çok tercih edilen tedavi yöntemidir [68]. Ancak kemoterapi ve radyoterapi, hastalar açısından çeşitli fiziksel ve psikolojik zorluklara neden olmaktadır. Son zamanlarda bu alanda gerçekleştirilen çalışmalar ışığında geliştirilen moleküler hedefli ajanlar, hücresel tedaviler ve gen terapileri hem hassas olarak kanser hedeflemesi sağlamayı hem de hastalara çok daha konforlu bir tedavi süreci sunmayı amaçlamaktadır [69].



Şekil 2.6. Kansere yönelik tedavi yaklaşımları (Biorender ile oluşturulmuştur).

2.3.2 Kanserde Bitkisel Tedavi Yaklaşımları

Kemoterapi ve radyoterapi kanser tedavisinin mihenk taşlarıdır. Ancak, her iki tedavi yöntemi de hasta için ciddi fizyolojik ve psikolojik olumsuzluğa neden olmaktadır. Aynı zamanda kanser dokusu, kemoterapötiklere karşı direnç geliştirme eğilimindedir. Bu nedenle, mevcut kemoterapötiklerin etkinliğini

arttıracak yöntemlere ve bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkisel bileşikler, yapay olarak geliştirilen bileşiklerin aksine daha az toksisiteye neden olmaları ve yararlanımlarının yüksek olması nedeniyle bu alanda umut vadeden ajanlardır.

Vitaminler, polifenoller, bitki bazlı biyoaktif bileşikler, doğal anti-oksidan ve anti-inflamatuar ajanlar olarak bilinir ve vücudu zararlı kimyasallardan koruduğu kabul edilir. Bunun yanında, bu bileşiklerin anti-proliferatif ve pro-apoptotik özelliklerinin keşfi kanser araştırmalarında önemli yer edinmelerini sağlamıştır [70]. Temel olarak doğal bileşikler, kemoterapötiklerle kullanıldığında; kanser hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına duyarlılığını arttırabilir, kemoterapi direncini tersine çevirebilir veya kemoterapi ilaçlarının sağlıklı hücrelerde neden olduğu toksisiteyi engelleyebilir [71]. 1981-2019 yılları arasında onaylanan antikanser ilaçların %25'inin doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler olduğu göz önünde bulundurulduğunda doğal bileşiklerin bu alanda yüksek potansiyel vadeden ajanlar olduğu sonucuna varılmaktadır [72].

Çalışmamızda kullandığımız kanser türlerinden olan meme kanserine karşı; kuarsetin, tetrandri, kurkumin, silibinin, timokinon, resveratrol, honokiol, diosgenin, genistenin ve garcinol etkinliği tanımlanmış doğal bileşiklerden birkaçıdır [73]. Bileşikler bunlarla sınırlı kalmamakla birlikte; psoralen, isoimperatorin ve bergapten gibi meme kanseri hücrelerinde etkinliği değerlendirilen çeşitli furanokumarinlerin bileşikleri de bulunmaktadır [3, 74-76]. Bu bileşiklerin apoptozu indükleyerek, ilaç direncinde rol oynayan proteinleri bloke ederek veya proliferasyonu inhibe ederek meme kanseri invazyonunu baskıladığı bilinmektedir. Benzer şekilde, rahim ağzı kanseri tedavisine yönelik etkinliği test edilmiş ve apoptozu teşvik eden, anjiyogenezi, metastazı ve ilaç direncini inhibe eden pek çok doğal bileşik bulunmaktadır [77]. Flavonoidler, terpenoidler, alkaloidler ve fenoller bu bileşiklerden bazılarını temsil etmektedir [78]. İmperatorin ve angelicin gibi etkinliği rahim ağzı kanseri hücrelerinde değerlendirilen bazı furanokumarin bileşikleri de mevcuttur [79, 80]. Karaciğer kanseri için de; çeşitli flavanoidler, alkaloidler, kurkumin gibi polifenoller ve resveratrol araştırma konusu olmuş doğal bileşiklerin bazılarıdır [81]. Aynı zamanda, imperatorin ve 8-metoksipsoralen gibi furanokumarinler de etkinliği değerlendirilen bileşikler arasında yer almaktadır [82, 83]. Doğal bileşikler yenilikçi ve etkili terapiler geliştirilmesi için önemli kaynaklardır. Tüm bu bileşikler,

kanser tedavisine yönelik yüksek potansiyel sergilese de özellikle toksisiteleri açısından derinlemesine araştırmalar yapılması güvenli bir şekilde kliniğe taşınmaları için ön koşuldur. Bu nedenle, mevcut literatüre ek gerçekleştirilecek ayrıntılı çalışmalar, bu alandaki ilerlemenin hızını arttırmak adına elzemdir. Doğal bileşiklerin bu şekilde terapötik kullanımının geliştirilmesi, modern tıp ve geleneksel tedavi yöntemlerini birleştiren bir yaklaşım olarak önem kazanmaktadır.

2.3.3. Kanser Tedavisinde 2 Boyutlu ve 3 Boyutlu Sistemler

Uzun yıllardır kanserin mekanizmasını anlamaya ve tedavisine yönelik çok sayıda çalışma gerçekleştirilmesine ve bu alanda umut vadeden büyük adımlar atılmasına rağmen, tedavi yaklaşımlarının çok azı klinikte uygulanabilmektedir. Kanser araştırmalarında göz ardı edilen mikro evre, bu başarısızlığın nedenlerinden biridir. Bu nedenle, araştırmacılar klinik öncesi basamakta deneysel süreci daha gerçekçi yürütebilmenin yolunu aramaktadır. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen geleneksel 2B hücre kültürü çalışmaları ve *in vivo* koşullarda fare, sıçan gibi hayvanlar kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, kanser biyolojisi ve ilaç taraması çalışmaları için 20. yüzyılın başından beri standart prosedürler olarak uygulanmaktadır [84, 85]. Ancak, 2B hücre kültürü modelleri kanserleri çok basit düzeyde mimik etmektedir ve normal şartlarda *in vivo* ortamda meydana gelen hücresel organizasyondan ve kanser mikro çevresinden yoksundur [86]. Hayvan modellerinde ise; yüksek maliyet, etik sorunlar ve insan kanserlerini yansıtmadaki yetersizlikler sınırlamalara neden olmaktadır [87]. Bu sınırlamalara karşı çözüm arayışına giren araştırmacılar, 1992 yılında 3B hücre kültürü modellerini geliştirmek için ilk adımları atmaya başladılar ve bu alana duyulan ilgi hızla arttı [88].

3B hücre kültürü sisteminde oluşturulan sferoidler, katı kanser dokularındaki mikro çevrenin karmaşık yapısını simüle edebilir ve kanser dokusunda bulunan hipoksik ortamı, hücre dışı matriks etkileşimlerini, pH, besin ve ilaca erişim gibi koşulları iyi bir şekilde yansıtabilir [89]. Günümüzde 3B hücre kültürü sistemleri iskele bazlı modeller ve iskelesiz modeller olarak ikiye ayrılmaktadır. İskele bazlı modellerde; hücreler ekstraselüler matrisi taklit eden bir substrat üzerinde

büyürken; iskelesiz modellerde, hücre agregatlarının bir araya toplanarak sferoid oluşturmaları beklenir [90].



Şekil 2.7. Çok hücreli kanser sferoidlerinin gösterimi (Kamatar A. ve ark. dan değiştirilerek hazırlanmıştır) [91].

Kanser araştırmalarında sferoidler tek bir kanser hücresiyle veya kanser hücresi, fibroblast, endotel ve bağışıklık hücreleriyle ortak kültüre edilerek oluşturulabilir [84]. Kültüre edilen hücreler ekim yapıldıktan sonra kümelenir ve küresel şekil oluşturur. Burada oluşan kürelerin dış katmanında çoğalan proliferatif fazdaki hücreler, iç katmanda hareketsiz hücreler ve çekirdekte nekrotik hücreler konumlanır (**Şekil 2.7**) [84, 92].

Yukarıda verilen literatür bilgileri ışığında; bergaptolün, kanser hücrelerinde sitotoksik etki göstererek apoptoz indüksiyonu ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu yoluyla antikanser etki sergilerken, aynı zamanda anjiyogenez süreçlerini baskılayarak tümör büyümesi ve metastazı engelleyici bir potansiyele sahiptir hipotezi tez kapsamında kurulmuştur. Bu hipotez doğrultusunda tez çalışması kapsamında; anti-kanser etkilerinin MDA-MB-231, HeLa, HepG2 kanser hücre hatları üzerinde incelenmesi; anti-anjiyogenik etkilerinin HUVEC hücresi kullanılarak 3B mikrodokular üzerinde incelenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda bergaptolün antikanser etkileri; sitotoksikite, apoptoz ve hücre döngüsü kontrolü açısından değerlendirilmiştir. Aynı zamanda, kanser mikro

evresinin tedavide ve ilaç direncindeki önemi de göz önünde bulundurularak; bergaptolün etkinliği endotel, fibroblast ve kanser hücresinin bulunduğu, çok hücreli kanser mikro dokuları (sferoid) oluşturularak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların, kansere yönelik bitkisel tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayabileceği ve aynı zamanda bu alanda 3B kültür koşullarında gerçekleştirilmek istenen çalışmalar için temel bir sistem sağlayabileceği düşünülmektedir.



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.1.1. Hücre Hatları ve Hücre Kültürü

Bu tez kapsamında HDF insan dermal fibroblast hücre hattı, HUVEC insan göbek damarı endotel hücre hattı, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı, HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı, HeLa rahim ağzı kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Tüm hücre hatları laboratuvarımızdaki hücre bankasından temin edilmiştir (Hacettepe Üniversitesi/Fizyoloji ABD/Hücre kültürü laboratuvarı). İlk olarak her hücre sonraki deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere çoğaltılarak depolanmıştır. Tüm deneysel çalışmalarda bergaptol, dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülerek 10 mg/ml stok çözeltisi olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tez çalışması boyunca kullanılan tüm hücre hatlarına ait kültür koşulları aşağıda sıralanmıştır:

MDA-MB-231 hücre kültürü; MDA-MB-231 hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde, 37°C, %95 hava ve %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde standart koşullarda kültüre edilmiştir.

HeLa hücre kültürü; HeLa hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde, 37°C, %95 hava ve %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde standart koşullarda kültüre edilmiştir.

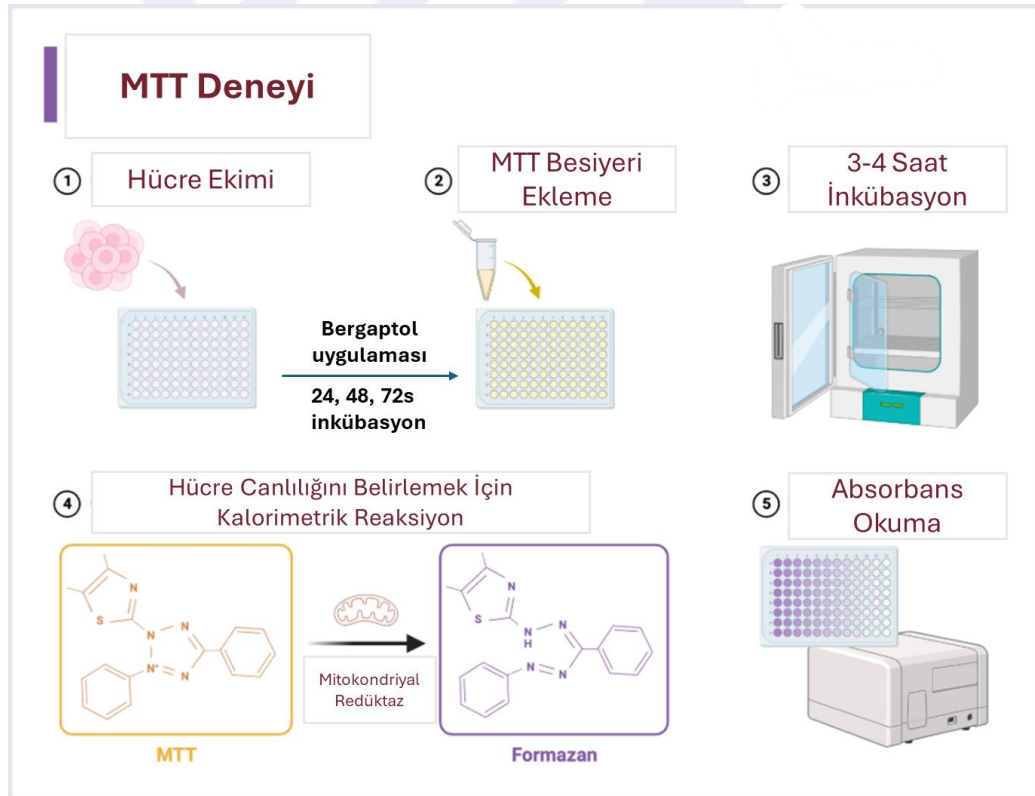
HepG2 hücre kültürü; HepG2 hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde, 37°C, %95 hava ve %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde standart koşullarda kültüre edilmiştir.

HUVEC hücre kültürü; HUVEC, insan umbilikal ven endotel hücreleri, %0,1 mg/ml heparin, %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde, 37°C, %95 hava ve %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde standart koşullarda kültüre edilmiştir.

HDF hücre kültürü; HDF, insan dermal fibroblast hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren yüksek glukozlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde, 37°C, %95 hava ve %5 CO2 içeren nemli inkübatörde standart koşullarda kültüre edilecektir.

3.1.2. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) – Canlılık Analizi

Bergaptolün hücreler üzerindeki etkisini incelemek ve ileri deneysel çalışmalar için uygun dozu belirlemek amacıyla, öncelikle canlılık analizi deneyleri yapılmıştır. Canlılık analizi deneyi için MTT testi gerçekleştirilmiştir. Bu test, kolorimetrik olarak hücrelerdeki canlılık düzeyini belirlemek için indirgeyici bir renklendirme ajanı olan tetrazolyum tuzu ve mitokondriyal dehidrojenazın aktivelerinin analizine dayanmaktadır [93].



Şekil 3.1. MTT aşamalarının görsel ifadesi. 1. Hücre ekimi, 2. Bergaptol uygulamasının ardından MTT besiyeri ekleme, 3. İnkübasyon, 4. Reaksiyon, 5. Absorbans okuması (Biorender ile oluşturulmuştur).

MTT analizi için öncelikle HDF, HepG2, MDA-MB-231, HeLa ve HUVEC hücre hatlarının her birine 5, 25, 50, 100 ve 150 μ M bergaptol uygulamaları yapılmış ardından 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Bu deneyde uygulanan konsantrasyon aralığı literatürde daha önce çalışılan 30, 90 ve 120 μ M bergaptol uygulamalarının alt ve üst değerleri belirlenerek seçilmiştir [4]. Gerçekleştirilen deneyler sonrası 5 μ M bergaptol uygulamasının hücre canlılıkları üzerinde herhangi bir etkinliği olmaması nedeniyle bu konsantrasyon uygulama gruplarından çıkarılmıştır.

MTT analizi için takip edilen adımlar aşağıda sıralanmıştır:

1. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
2. Inkübasyon süresinin sonunda hücrelere 5, 25, 50, 100 ve 150 μ M bergaptol uygulaması yapılmış ve ardından zamana bağlı etkisini de analiz edebilmek için 24, 48, 72 saatlik inkübasyonlara bırakılmışlardır.
3. Inkübasyon sürelerinin sonunda besiyerleri aspire edilmiş ve %10 MTT solüsyonu içeren serumsuz besi ortamı kuyucuklara eklenerek karanlık ortamda 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.
4. Inkübasyon süresinin sonunda MTT içeren besi ortamı aspire edilmiş ve kuyucuklara izopropil alkol eklenerek 570 nm'de ELISA okuyucu (μ Quant™, BiotekW Instruments Inc, ABD) cihazında absorbans okutulmuştur.
5. Deney her bir konsantrasyon için 3 kez tekrar edilmiş ve istatistiksek olarak analiz edilmiştir.

3.1.3. Akridin Turuncusu-Propidium İyodür (AT/PI) Boyaması

Akridin turuncusu (AT) ve propidyum iyodür (PI), hücrelerde sırasıyla canlı ve geç apoptotik/nekrotik durumlara özgüllük gösteren floresan özellikli boyalardır [94]. Bu yöntemde; AT tüm hücrelere nüfuz eder ve DNA'ya bağlanarak yeşil floresan ışıma verir. PI ise, yalnızca zarları hasar görmüş hücrelere girer ve DNA'ya bağlanarak kırmızı floresan ışıma verir [95].

Tez çalışması kapsamında; canlı ve ölü hücrelerin tespiti için, AT/PI boyaması yapılmıştır. Bu amaçla HDF, HepG2, MDA-MB-231, HeLa ve HUVEC hücre

hatlarının her birine farklı konsantrasyonlarda (5, 25, 50, 100, 150 μ M) bergaptol uygulaması yapılmış ve ardından 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon sürelerinin ardından hücrelerin üzerinden besiyerleri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Boyalar 1:1 oranında birbirine karıştırılmış ve kuyucukların üzerine eklenerek 20 saniye bekletilmiştir. Bu sürenin ardından, PBS ile iki kez yıkama yapılmış ve floresan mikroskobu (Olympus, Japan, 460-490/510-550nm) ile görüntüleme yapılmıştır.

3.1.4. Koloni Formasyonu Deneyi

MTT analizi sonrası belirlenen etkin konsantrasyonda bergaptol'un kanser hücresi koloni oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. Koloni formasyon deneyi için; 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen HeLa, MDA-MB-231, HepG2 hücreleri seçilen konsantrasyonda (25 μ M) bergaptol uygulamasının ardından 10-14 gün boyunca %5 CO₂ içeren nemli, 37°C'de standart koşullarda inkübe edilmiştir. Her bir koloninin birbirlerine yakın temasta bulunmamaları göz önünde bulundurularak deney sonlandırılmıştır. Kuyucuklar fotoğraflanmış ve koloni sayımı ImageJ programı kullanılarak yapılmıştır.

Koloni fiksasyonu ve boyaması için gerekli adımlar aşağıdaki gibidir;

- Hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklar soğuk PBS ile yıkanmıştır.
- Kültür plakaları buz üzerine alınarak hücrelerin üzerine %100 soğuk metanol eklenmiş ve 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Kültür plakaları buz üzerinden alınmış ve metanol uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa %1 kristal viyole eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Boyama sonrası yıkama yapılmıştır.
- Beyaz zemin üzerinde koloniler fotoğraflanarak Image J programı yardımıyla koloni sayımı yapılmıştır.

3.1.4. BrdU ile Hücre Döngüsünün S Fazındaki Hücrelerin Tespiti

İmmünohistokimya Yöntemi

BrdU ile İşaretleme

BrdU, hücre döngüsünün DNA sentez aşamasında yeni sentezlenen replike DNA ile birleşir. Bu da bize, bu yöntemi kullanarak hücre proliferasyonunu tespit etme imkânı vermektedir.

Tez çalışması kapsamında bergaptol uygulaması sonrası, S fazındaki hücre oranındaki değişimin tespiti için BrdU (5-bromo-2-deoksiüridin) ile işaretleme yapılmıştır. Bunun için kanser hücreleri (MDA-MB-231, HepG2, HeLa) 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve ardından hücreler BrdU ile işaretlendikten sonra mikroskop altında görüntülenmiştir (OlympusIX70, Japan, 10X). Elde edilen görsellerden seçilen 5 farklı alanda, BrdU pozitif ve negatif hücreler ImageJ programı kullanılarak sayılmıştır.

BrdU işaretlemede aşağıdaki adımlar uygulanmıştır;

1. 10 mM'lik bir BrdU stok çözeltisi hazırlanmış ve besiyeri ile seyreltilerek 10 µM'lik BrdU etiketleme solüsyonu hazırlanmıştır.
2. Hücrelerin üzerine BrdU etiketleme solüsyonu eklenmiştir ve etiketlenen hücreler etüvde 24 saat inkübe edilmiş ardından immün boyama protokolüne geçilmiştir.

İmmün boyama protokolünde aşağıdaki adımlar izlenmiştir;

- Hücreler %70 etanolle 30 dakika fikse edilmiş ve 30 dakika sonunda 2 kez PBS ile yıkama yapılmıştır.
- %30'luk hidrojen peroksit metanol ile 1:10 oranında seyreltilmiş ve hücrelerin üzerinde eklenerek 10 dakika inkübe edilmiştir yapılmıştır.
- 2-3 damla denatürasyon solüsyonu kuyucuklara damlatılmış ve 30 dakika boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir.
- 2-3 damla blocking buffer kuyucuklara eklenmiş ve 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- Kuyucuklara 2-3 damla dedektör antikör eklenmiş ve 60 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında streptevadin HRP konjuge eklenmiş ve oda ısısında 10 dakika inkübe edilmiştir.

- Her kuyucuğa DAB eklenmiş ve 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Karşıt boyama için 2-3 damla hemotoksilen eozin her kuyucuğa eklenmiş ve 10 sn inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda renk kalmayana kadar yıkama yapılmış ve görüntüleme yapılmıştır. Her bir kuyucukta farklı alanlardan fotoğraflar çekilmiş ve her uygulama için birbirinden farklı alanlardan seçilen 5 fotoğrafta pozitif ve negatif hücreler ImageJ programı yardımıyla sayılmıştır.

3.2. Akış Sitometrisi Analizleri

Bu aşamada daha önceki deneysel basamaklarda uygulamanın 72. saatinde hücre canlılığı %50'nin çok altına düştüğü için yalnızca 24 ve 48. saatlerde analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Hücre Apoptozunun Analizi; Annexin V-FITC/Propidium İyodür İşaretlemesi

Annexin V/Propidyum iyodür tahlili, apoptotik hücre hasarını nekrotik hücre hasarından ayırt etmek için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir [96]. Tez kapsamında apoptotik hücrelerin miktarı, Annexin V/propidyum iyodür kiti (Cat no: 640914 Biolegend) kullanılarak ölçülmüş ve akış sitometrisi kullanılarak tespit edilmiştir. HepG2, HeLa, MDA-MB-231 ve HUVEC hücreleri, $2-4 \times 10^5$ hücre/kuyu yoğunluğunda 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24-48 saat süreyle inkübe edildikten sonra, farklı konsantrasyonlarda (0-100 μ M) bergaptol uygulaması yapılmıştır. Bergaptol uygulamasının ardından 24 ve 48. saatler için aşağıdaki adımlar izlenerek apoptotik analizler gerçekleştirilmiştir

1. Hücreleri soğuk BioLegend Hücre Boyama Tamponu ile iki kez yıkanmış ve ardından hücreler $0,25-1,0 \times 10^7$ hücre/mL konsantrasyonunda Annexin V Bağlama Tamponu içinde yeniden süspanse edilmiştir.
2. 100 μ L hücre süspansiyonu üzerine 5 μ L FITC Annexin V, 10 μ L Propidium İyodür Solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında (25°C) karanlıkta 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

3. Her tüpe 400 µL Annexin V Bağlama Tamponu eklenmiş ve sonra akış sitometrisi (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer) ile analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Hücre Döngüsünün Akış Sitometrik Değerlendirmesi

3.2.2.1. Cytophase Violet ile Hücre Fazlarının Tespiti

Tez kapsamında hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki değişimleri tespit ederek bergaptolün hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için Cytophase violet (Cat no: 425701, Biolegend) işaretlemesi kullanılmıştır.

HepG2, HeLa, MDA-MB-231, hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0-100 µM) bergaptol ile 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler trypsinize edilmiş ve santrifüjlenerek toplanmıştır. Hücreler $0.5-1 \times 10^6$ hücre/ml'lik bir konsantrasyonda uygun hücre kültürü ortamında hazırlanmıştır. 5 µM (1:1000)-10 µM (1:500) solüsyon elde etmek için hücre süspansiyonuna CytoPhase™ Violet (Biolegend) boyası eklenmiş ve 37°C inkübatörde 90 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından numuneler akış sitometrisi (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer) ile analiz edilmiştir.

Akış sitometrisi kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmaların tümünde Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HUNİTEK) altyapısı kullanılmıştır.

3.3. Sferoidlerin (Mikro Dokuların) Oluşturulması

Mikro dokuların oluşturulması amacıyla iki farklı yöntem kullanılmıştır; bunlardan ilkinde Petri Dish® (Sigma, Z764019-6EA) kalıpları, ikincisinde ise asılı damla yöntemiyle mikro dokular oluşturulmuştur.

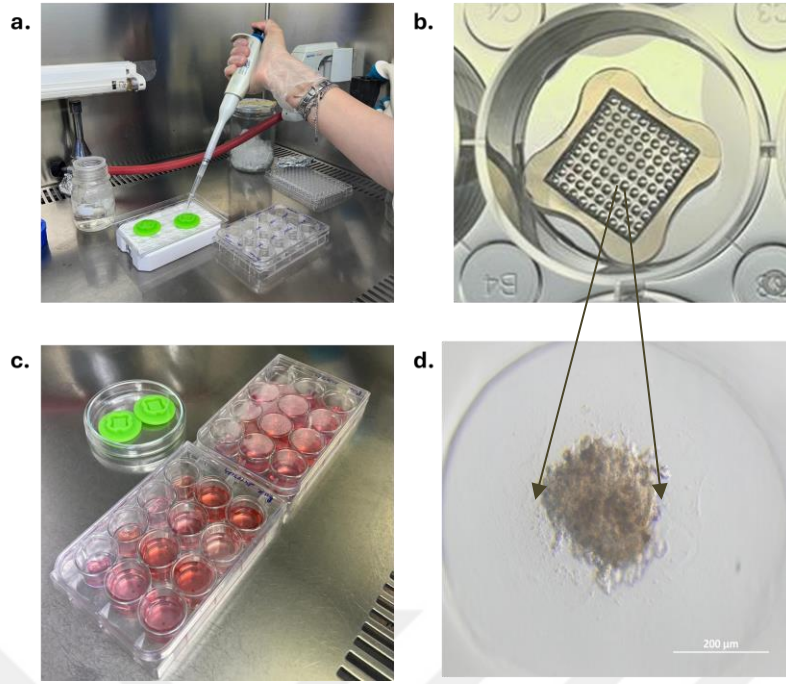
Mikro dokular oluşturulurken aşağıdaki protokol izlenmiştir:

1. **Petri Dish® yönteminde** kalıplara agar solüsyonu eklenmiş ve solüsyon katılaştığında kalıptan çıkarılıp 12 kuyucuklu hücre plaklarına alınmıştır. Ardından kuyucuklara serumsuz besiyeri eklenerek 15 dakika etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri aspire

edilmiş ve her bir kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu eklenerek 1 saat boyunca etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda kalıp yardımıyla oluşturulan agar jeller üzerindeki homojen boşluklarda hücreler kendiliğinden kümelenmiştir. Sferoid oluşumu her gün takip edilmiş ve 7. güne gelindiğinde bergaptol uygulaması gerçekleştirilmiştir. Uygulamayı takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde Kalsein AM-PI floresan boyaması yapılarak canlı ve ölü hücreler belirlenmiştir.

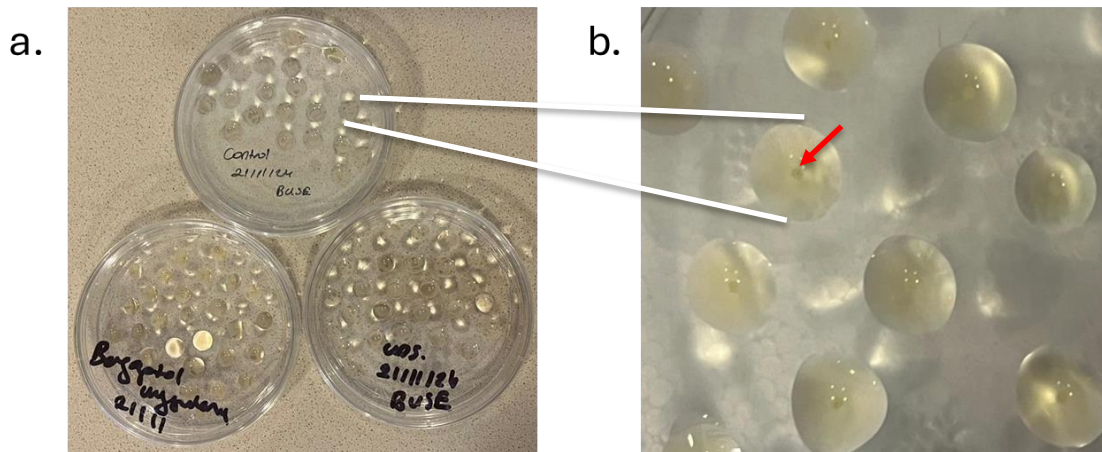
3B Petri Dish® ile Kalıpların Hazırlanması ve Hücre Ekimi

1. Bir gram toz agaroz (%2'lik (g/ml)) 50 ml salin içerisinde çözündürülmüş ve ardından otoklavlanmıştır.
2. Solüsyonun 60-70°C'ye kadar soğuması beklenmiş ardından steril koşullarda petri dish kalıplarına aktarılmıştır.
3. Agar solüsyonunun oda sıcaklığında polimerleşmesi beklenmiş ardından kalıplar esnetilerek agar jeller çıkarılmıştır.
4. Kalıpların üzerine serumsuz besiyeri eklenerek etüvde 15 dakika inkübe edilmiştir.
5. Agar jeller üzerine 750 hücre/kuyucuk HUVEC, 750 hücre/kuyucuk fibroblast, 1500 hücre/kuyucuk kanser hücresi olacak şekilde 100 µl hücre süspansiyonu eklenmiştir.
6. Hücre ekiminden 1 saat sonra kuyucuk başına 2,5 ml besiyeri eklenmiştir ve sferoid oluşumu takip edilmiştir.



Şekil 3.2. Kalıp hazırlama adımları. a. Agarın kalıplara dökülmesi, b. Kalıptan çıkarılan agarın görüntüsü, c. Hücre ekiminin ardından besiyeri eklenmiş kalıpların görüntüsü, d. Kalıp içinde oluşmuş çok hücreli mikro doku görüntüsü.

2. **Asılı damla yönteminde** hücreler uygun oranda (750 HUVEC+750 HDF+1500 kanser) karıştırılmış ve petri kalıbının kapağında her biri 30 µl hacimde olacak şekilde damlacıklar oluşturulmuştur.



Şekil 3.3. a. Asılı damla yöntemi ile hücre ekimi yapılan petri kaplarının görüntüsü, b. Oluşan sferoid görüntüsü (sferoid kırmızı ok ile gösterilmiştir).

3.4. Mikro Dokularda Hücre Canlılığının Tespiti

3.4.1. Kalsein AM-Propidyum İyodür Boyaması

Kalsein AM, canlı hücrelerde hücre içi esterazlar ile asetoksimetil ester hidrolizine uğrar ve yeşil floresan ışıma verir [97]. PI ise nekrotik hücrelerin hasar görmüş hücre zarından içeri girerek hücrede kırmızı bir floresan ışımaya neden olur.

Çalışmamız kapsamında, 3B hücre kültürü yöntemleri ile oluşturulan mikro doku yapılarında hücre canlılığı tespiti ve çap hesaplamalarının gerçekleştirilmesi amacıyla kalsein AM-PI kullanılmıştır. Hücreler Bergaptol ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra hücreler üzerinden besiyeri aspire edilmiş ve kuyucuk başına 100 µl boya karışımı eklenerek etüvde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda mikro dokular uygun floresan filtrelerde görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır (Olympus, Japan, 10X, 460-490nm).

3.5. Endotel Hücrelerin Takibi

3.5.1. Endotel hücrelerinin CFSE işaretlenmesi ve anjiyogenezin incelenmesi

CFSE, iki asetat ve bir süksinimidil ester fonksiyonel grubu içeren bir floresan moleküldür. Bu formda, floresan ışıma vermez ve hücre zarından geçebilir. Hücre içi ortamda difüzyondan sonra, endojen esterazların asetat grubundan uzaklaşmasıyla floresan form kazanır ve artık hücre zarından geçemez hale gelir [98]. Bu özelliği onun uzun süre floresan ışıma verebilmesini sağlar. Tez kapsamında endotel hücrelerinin floresan işaretlenmesi için CFSE Cell Division Tracker Kit (Cat no. 423801, Biolegend) kullanılmıştır. Bergaptol uygulamasının endotel ifadesi üzerinde etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için akış sitometrisi ve konfokal mikroskopi kullanılarak CFSE işaretli hücre oranını incelenmiştir. Bunun için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir:

HUVEC hücrelerinin CFSE ile işaretlenmesi ve takibi:

1. 5 µM'lik CFSE çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
2. 5 µM'lik çalışma solüsyonu içinde hücreler $10-100 \times 10^6$ hücre/mL oranında olacak şekilde hazırlanmıştır.

3. Hücreler 37°C karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilmiş ve ardından 5 ml hücre kültürü ortamı eklenerek boyama durdurulmuştur.
4. CFSE etiketli hücreler mikro doku oluşturma protokolünde tarif edildiği gibi kanser hücreleri ve fibroblastlarla ortak kültürler halinde ekilmiştir.
5. CFSE ile işaretlenen HUVEC hücrelerinde bergaptol uygulaması öncesi ve sonrasında endotel hücrelerinin miktarındaki değişim akış sitometrisi ve konfokal mikroskopi (Zeiss LSM980, konfokal/multifoton mikroskop) yardımıyla incelenmiştir. Hücre miktarındaki değişim kanser mikro dokularındaki damarlanmanın belirteci olarak kabul edilmiştir. Böylece bergaptolün kanser mikro doku anjiyogenezi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

3.5.2. CFSE işaretli hücrelerin akış sitometrisi ile tespit edilmesi

Çok hücreli kanser mikro dokularına bergaptol uygulaması sonrası endotel hücre oranındaki değişimi analiz etmek için HUVEC hücreleri CFSE ile işaretlenmiş ardından HeLa ve HDF hücreleri ile birlikte kültürlenerek asılı damla yöntemi ile sferoidler oluşturulmuştur. Sferoid oluşumu takip edilerek hücre ekimini takip eden 6. gün sferoidler toplanmış ve CFSE ile işaretlenen hücreler akış sitometrisi kullanılarak tespit edilmiş ve elde edilen veriler analiz edilerek bergaptolün anjiyogeneze üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

3.5.3. CFSE işaretli hücrelerin konfokal mikroskopi ile tespit edilmesi

Endotel hücrelerinin floresan işaretlenmesi için CFSE Cell Division Tracker Kit (Cat no: 423801 Biolegend) kullanılmıştır. Hücreler CFSE ile işaretlendikten sonra Petri Dish® kalıpları kullanılarak mikro dokular oluşturulmuştur. Gruplar 0. gün uygulama grubu, 6. Gün uygulama grubu ve kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Burada iki grup arasında bergaptolün sferoid oluşum sürecinde HUVEC hücreleri üzerine etkisi ve sferoid oluştuktan sonra HUVEC hücreleri üzerinde etkilerini karşılaştırmak amaçlandırılmıştır. Hücre ekimini takip eden 7. günde tüm gruplarda çekirdekler DAPI ile işaretlenmiş ve konfokal mikroskopi ile görüntüleme yapılmıştır.

Konfokal mikroskopi kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmaların tümünde Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HUNİTEK) altyapısı kullanılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analizler

Tez kapsamında deneysel çalışmalardan elde edilen veriler GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu ile uygulama grubu arasındaki farklar t-testi kullanılarak incelenmiş ve p değeri 0,05'ten küçük olan durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

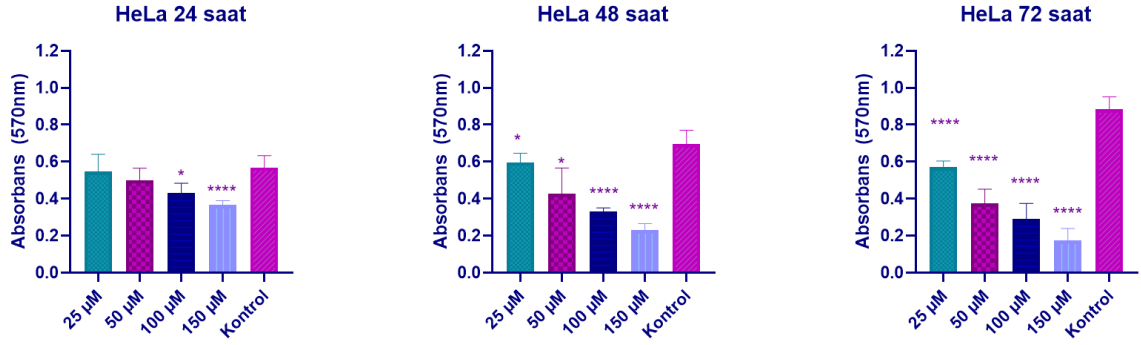
4.1.1. Bergaptol Uygulaması Sonrası MTT Canlılık Analizi Sonuçları

Bergaptolün hücre canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmek için MDA-MB-231, HeLa, HepG2, HUVEC ve HDF hücreleri kullanılarak MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

MTT analizi sonuçları; kanser hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası, artan konsantrasyona paralel olarak hücre canlılığının kontrole göre önemli derecede azaldığını göstermektedir. Bu etkinin özellikle 48 saatlik inkübasyon sonrası arttığı görülmektedir (**Şekil; 4.1, 4.2, 4.3**).

Sonuçları tek tek hücre bazında incelendiğinde;

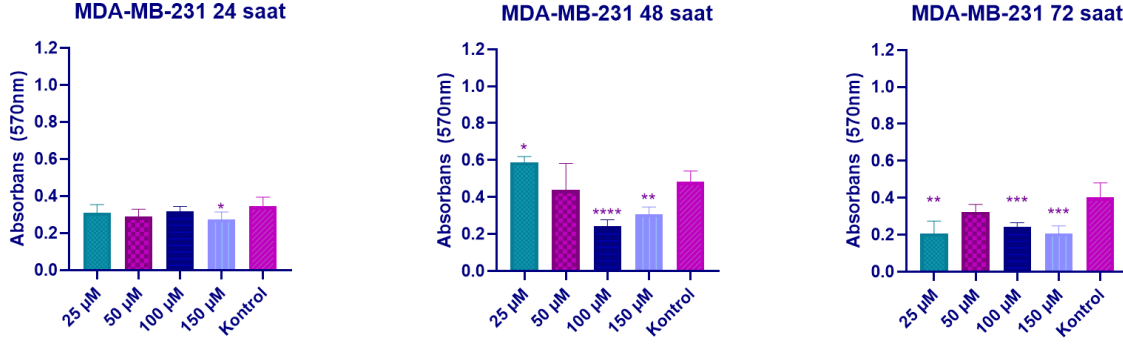
HeLa hücre hattında (Şekil 4.1) 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrasında, 100 μ M konsantrasyondan itibaren hücre canlılığının azaldığı görülmektedir. Burada grafik üzerinden gözlemlenebilen sonuçlar, istatistiksel olarak kontrole göre yüksek derecede anlamlı bulunmuştur (****; $p \leq 0.0001$). 48 ve 72 saatlik bergaptol uygulamasından sonra ise en düşük konsantrasyon olan, 25 μ M konsantrasyondan itibaren hücre canlılığı konsantrasyonla doğru orantılı olarak azalmıştır ve bu sonuç kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı değerler ifade etmektedir (*; $p \leq 0.05$), (****; $p \leq 0.0001$). Özellikle 100 ve 150 μ M'lık konsantrasyonlarda, hücre canlılığında yüksek oranda azalma gerçekleşmiş ve bu veriler kontrole göre istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bulunmuştur. Hücre canlılığı grafikleri yüzde canlılık olarak analiz edildiğinde hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC50 değeri 48. saatte 94 μ M, 72. saatte 43,1 μ M olarak bulunmuştur. Bu sonuca göre; HeLa hücre hattında, bergaptolün konsantrasyonundaki ve uygulama süresindeki artışın oldukça toksik etkiye neden olduğunu ve sürenin toksik etkinin artmasında önemli bir parametre olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. Bergaptol uygulamasının HeLa hücre canlılığına etkisinin MTT analizi sonuçları; artan konsantrasyonla hücre canlılığında azalma olduğu görülmüştür. 24 ve 48 saatlik uygulamalarda elde edilen veriler en yüksek konsantrasyonda kontrole göre istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bulunurken; 72. saate en düşük konsantrasyondan itibaren canlılıkta kontrole göre istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bir azalma gerçekleşmiştir (*; $p \leq 0.05$), (****; $p \leq 0.0001$).

(*sembolü; kontrol grubu ile uygulama grupları arasındaki istatistiksel farkı ifade etmektedir)

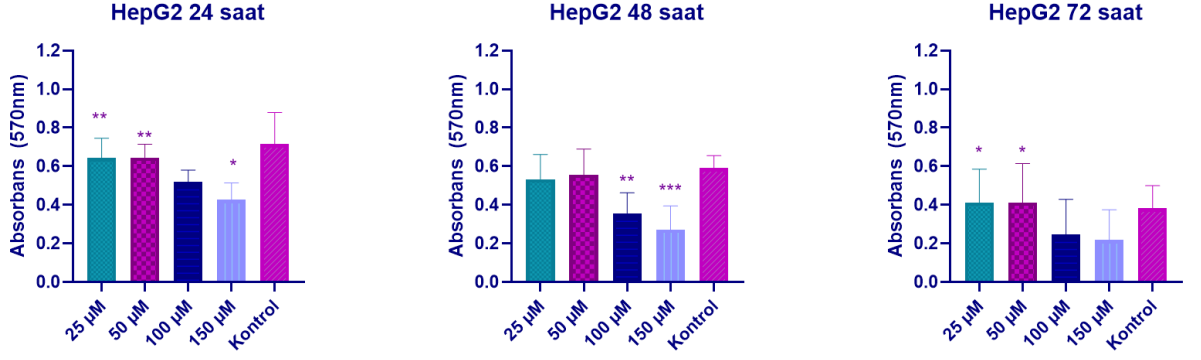
MDA-MB-231 hücre hattında (Şekil 4.2.) bergaptol uygulamasını takip eden 24. saatte hücre canlılığı en yüksek konsantrasyon olan 150 µM'lık bergaptol uygulamasına kadar önemli bir azalma göstermemiştir. 150 µM'lık bergaptol uygulaması sonrasında ise hücre canlılığındaki azalma kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*; $p \leq 0.05$). Bergaptol uygulamasını takip eden 48. saatte 50 µM, 72. saatte ise 25 µM konsantrasyondan sonra hücre canlılığı artan konsantrasyona bağlı olarak önemli derecede azalmıştır. Toksisiteye bağlı hücre canlılığındaki azalmadan elde edilen bu veriler kontrole göre istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bulunmuştur (*; $p \leq 0.05$), (**; $p \leq 0.005$), (***; $p \leq 0.0009$), (****; $p \leq 0.0001$). Hücre canlılığı grafikleri yüzde canlılık olarak analiz edildiğinde hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC50 değeri 48. saatte 100 µM, 72. saatte 125 µM olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar; MDA-MB-231 hücre hattında bergaptolün uygulama süresinin hücre canlılığını baskılamasında önemli rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 4.2. Bergaptol uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücre canlılığına etkisinin MTT analizi sonuçları; konsantrasyon ve uygulama süresindeki artışla birlikte hücre canlılığında azalma olduğu görülmüştür. Özellikle 48 ve 72. saate en düşük konsantrasyondan itibaren canlılıkta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gerçekleşmiştir (*; $p \leq 0.05$), (**; $p \leq 0.005$), (**; $p \leq 0.0009$), (****; $p \leq 0.0001$).

(*sembolü; kontrol grubu ile uygulama grupları arasındaki istatistiksel farkı ifade etmektedir)

HepG2 hücre hattında (Şekil 4.3.), bergaptolün uygulama süresinden bağımsız olarak, hücrelerde özellikle; 100 ve 150 µM konsantrasyonlardan sonra canlılık oranının azaldığı görülmektedir. Hücre canlılığındaki bu azalma kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*; $p \leq 0.05$), (**; $p \leq 0.009$), (**; $p \leq 0.0002$). Hücre canlılığı grafikleri yüzde canlılık olarak analiz edildiğinde hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC50 değeri 48. Saatte 98 µM 72. saatte 96 µM olarak bulunmuştur. Bu sonuç; HepG2 hücre hattında yüksek bergaptol konsantrasyonlarının sitotoksik etkiye neden olduğunu göstermektedir.

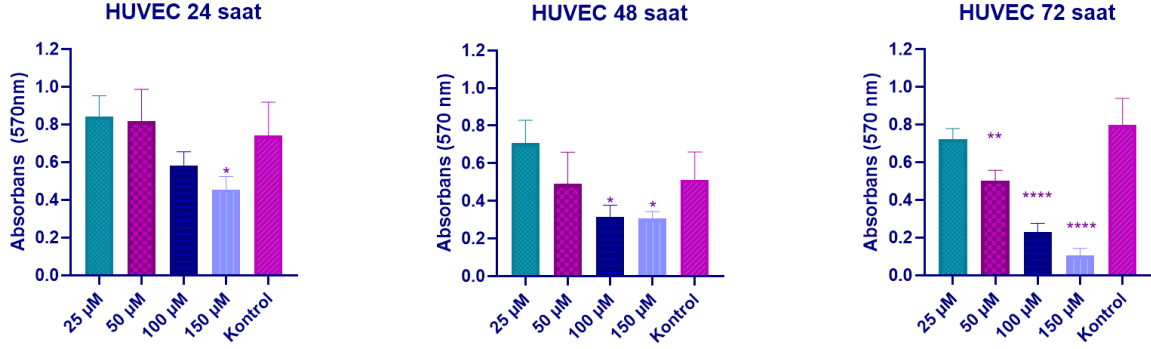


Şekil 4.3. Bergaptol uygulaması sonrası HepG2 hücre canlılığına etkisinin MTT analizi sonuçları; konsantrasyon ve uygulama süresindeki artışla birlikte hücre canlılığında azalma gerçekleşmiştir. Elde edilen veriler kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*; $p \leq 0.05$), (**; $p \leq 0.009$), (***; $p \leq 0.0002$).

(*sembolü; kontrol grubu ile uygulama grupları arasındaki istatistiksel farkı ifade etmektedir)

Bergaptolün kanser damarlanması üzerindeki etkisini 3B modelde değerlendirme öncesinde gerçekleştirilen MTT analizi sonuçları incelendiğinde; bergaptolün endotel hücre hattında toksik etki gösterdiği ve bu etkinin bergaptolün artan konsantrasyonu ile birlikte önemli derecede arttığı görülmektedir (**Şekil 4.4**).

HUVEC hücre hattında (Şekil 4.4) bergaptol uygulamasından sonraki 24. saatte 25 ve 50 µM'lık uygulamadan sonra hücre canlılığında herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Ancak, 100 µM'lık konsantrasyondan itibaren hücre canlılığında konsantrasyondaki artışa paralel olarak azalma gerçekleşmiştir ve elde edilen veriler kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*; $p \leq 0.05$). Uygulamanın 48. saatinde 100 µM'lık, 72. saatte ise 50 µM'lık bergaptol uygulamasından sonra hücre canlılığı konsantrasyonun artışıyla birlikte giderek azalmıştır (*; $p \leq 0.05$), (**; $p \leq 0.005$), (****; $p \leq 0.0001$). Hücre canlılığı grafikleri yüzde canlılık olarak analiz edildiğinde hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC50 değeri 72. saatte 69 µM olarak bulunmuştur. Bu sonucu değerlendirecek olursak; bergaptolün yalnızca kanser hücrelerinde değil, aynı zamanda kanser gelişimi ve metastazında kritik rol oynayan endotel hücresinde de konsantrasyona ve uygulama süresine bağlı olarak toksik etki gösterdiği söylenebiliriz.

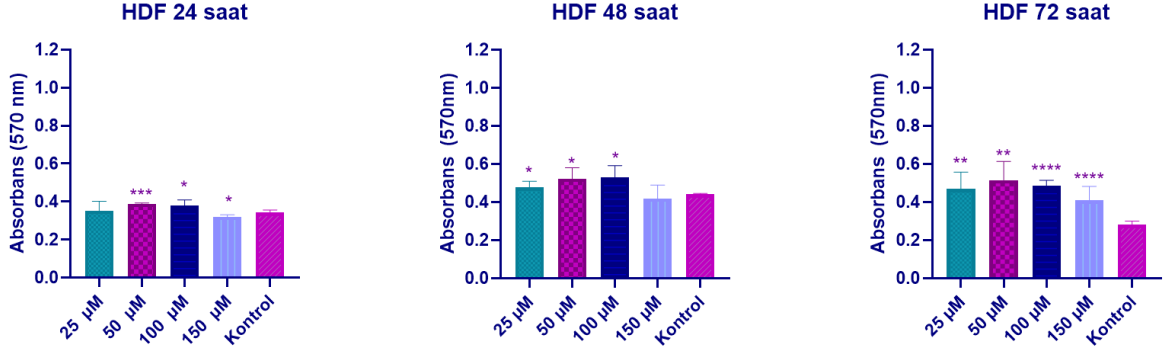


Şekil 4.4. Bergaptol uygulaması sonrası HUVEC hücre canlılığına etkisinin MTT analizi sonuçları; konsantrasyon ve uygulama süresindeki artışla birlikte hücre canlılığında azalma olduğu görülmüştür. Özellikle 48 ve 72. saatlerde 100µM ve üstü bergaptol uygulamalarının ardından canlılıkta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gerçekleşmiştir. Bu azalma 72. saatte istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bulunmuştur (*; $p \leq 0.05$), (**; $p \leq 0.005$), (****; $p \leq 0.0001$).

(*sembolü; kontrol grubu ile uygulama grupları arasındaki istatistiksel farkı ifade etmektedir)

Kanser hücreleri ve endotel hücresi üzerinde toksik etki gösteren bergaptolün, sağlıklı hücre üzerinde nasıl bir etki göstereceğini incelemek için sağlıklı kontrol grubu olan HDF hücrelerinde canlılık analizi yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde; bergaptolün fibroblastlar üzerinde toksik etki göstermediği, tüm gruplarda hücre canlılığının benzer düzeyde olduğu görülmektedir (**Şekil 4.5**).

HDF hücre hattında (şekil 4.5.) 24, 48 ve 72. saatlerde, hücre canlılığında kontrole göre herhangi bir azalma gerçekleşmemiştir. Ancak, tüm gruplarda hücrelerin çoğalmaya devam etmesi nedeniyle; bazı gruplardaki hücre sayıları, kontrol grubundaki hücre sayılarının önüne geçmiştir. Bu sonuç bergaptolün fibroblast hücreleri üzerinde toksik etkiye neden olmadığı, tam tersi hücrelerin çoğalma yönünde bir profil izlemesine sebep olduğunu göstermektedir. Hücre sayılarındaki bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değerler ifade etmektedir (*; $p \leq 0.05$), (**; $p \leq 0.005$), (***; $p \leq 0.0006$). Bergaptolün sağlıklı kontrol grubu olan HDF hücre hattında toksik etki göstermemesi terapötik kullanımı için umut verici görünmektedir.



Şekil 4.5. Bergaptol uygulaması sonrası HDF hücre canlılığına etkisinin MTT analizi sonuçları; Bergaptol uygulaması sonrası HDF hücre canlılığında azalma gerçekleşmemiş, bunun aksine özellikle 72. saatte artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında artış gerçekleşmiş ve bu artış kontrole kıyasla istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bulunmuştur (*; $p \leq 0.05$), (**; $p \leq 0.005$), (***, $p \leq 0.0006$).

(*sembolü; kontrol grubu ile uygulama grupları arasındaki istatistiksel farkı ifade etmektedir)

Tez çalışması kapsamında, bergaptolün kanser hücreleri, endotel hücresi ve fibroblast hücresi üzerindeki etkinliği sitotoksikite testi ile değerlendirilmiştir. Aynı zamanda, sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi de fibroblastlar kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, bergaptolün HeLa (**Şekil 4.1.**), MDA-MB-231 (**Şekil 4.2.**) ve HepG2 (**Şekil 4.3.**) hücre hatları üzerinde toksik etkiye neden olduğunu ancak sağlıklı kontrol hücresi olan HDF (**Şekil 4.5.**) hücre hattında herhangi bir toksisiteye neden olmadığı göstermiştir. Bu bulgular, literatürde yer alan bilgilerle desteklenmektedir.

Literatürdeki bilgilere baktığımızda; 2016 yılında Ge Z. C. ve ark., MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bergaptolün antikanser ve apoptotik etkilerini 30, 60, 90, 120 µM'lık konsantrasyonlarda değerlendirmiş ve bergaptolün bu hücre hattında 52,2 µM'lık konsantrasyondan sonra oldukça etkin bir şekilde kanseri baskıladığını göstermiştir [4]. Bu sonuç, bizim çalışmamızdaki meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinden bergaptol uygulaması sonrası elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Ancak, çalışmamız kapsamında 72 saatlik

inkübasyon süresinin sonunda, 25 μ M bergaptol uygulamasında da hücre canlılığındaki azalma kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Zsido B. Z. ve ark., tarafından yayınlanan çalışmada bergamottinin etkinliğini HeLa hücre hattı üzerinde değerlendirilmiş ve MTT analizi sonucu toksisiteye rastlanmadığı rapor edilmiştir [99]. Aynı hücre hattı üzerinde bergaptol bileşiğinden elde ettiğimiz sonuçlar, bu sonuçlarla örtüşmemektedir. Bergaptol, en düşük konsantrasyondan itibaren HeLa hücre canlılığını güçlü bir biçimde baskılamıştır. Bu da bergaptolün bu hücre hattında bergamottinden çok daha etkin bir şekilde antikanser profil sergilediğini göstermektedir. Issa Y. M. ve ark., gerçekleştirdikleri çalışmada, ksantotoksinin HepG2 hücre hattında yüksek sitotoksisiteye neden olduğunu göstermişlerdir [100]. Yang H. ve ark., ise başka bir furanokumarin olan 8-metoksipsoraleni HepG2 hücre hattı üzerinde yüksek toksisiteye neden olduğunu rapor etmişlerdir [83]. Burada gözlemlenen etkiler, çalışmamız kapsamında bergaptolün HepG2 hücre hatlarında gözlemlediğimiz etkileriyle benzerlik göstermektedir. Bu da furanokumarin bileşiklerinin, HepG2 hücre hattında yüksek toksisiteye neden olduğunu ortaya koymaktadır. Xu ve ark., tarafından Şubat 2024'de yayınlanan güncel çalışmada isoimperatorin adlı furanokumarin bileşiğinin HUVEC hücreleri üzerinde 50 μ M'a kadar toksik etkiye neden olmadığı ancak VEGF ile uyarılmış HUVEC çoğalmasının isoimperatorin uygulaması sonrası baskılandığı rapor edilmiştir [101]. Aynı bileşiğin kullanıldığı bir başka çalışmada HUVEC hücrelerindeki etkin dozun 100 μ M olduğu sonucuna varılmıştır [102]. Benzer şekilde çalışmamız kapsamında bergaptol uygulaması sonrası 50 μ M'a kadar HUVEC hücrelerinde yüksek toksisite gözlenmesi de bu etki 72. saatte tersine dönerek istatistiksel olarak anlamlı derecede toksisiteye neden olmuştur. Barthomeuf ve ark., tarafından yayınlanan çalışmada umbelliferonun etkileri değerlendirmiş ve bu furanokumarin bileşiğinin MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile normal fibroblast hücrelerinde benzer derecelerde toksisiteye neden olduğu rapor edilmiştir [103]. Oh J H. ve ark. tarafından isopimpinellin adı verilen furanokumarinin HDF hücreleri üzerindeki etkinliği değerlendirilmiş ve 20, 25 μ M'lık uygulamalardan sonra hücre canlılığında kontrole göre anlamlı derecede azalma olduğunu gözlemlemişlerdir [104]. Bunlara karşın, tez çalışmamız kapsamında etkinliğini araştırdığımız furanokumarin bileşiği olan bergaptolün, HDF hücreleri üzerinde en yüksek konsantrasyonda dahi hücre canlılığını azaltmadığını gözlemledik. Kanser

tedavilerinde etkinliği arttırılmış, toksisitesi azaltılmış bileşiklere ihtiyaç duyulması nedeniyle; bu sonuçlar, bergaptolün kanser tedavisine yönelik tamamlayıcı yaklaşımlarda kullanılabilecek bir bileşik olduğunu göstermektedir.

Hücre canlılığından elde ettiğimiz tüm sonuçlar bergaptolün kanser hücrelerinde ve endotel hücresinde toksik etkiye neden olduğunu buna karşın sağlıklı kontrol hücreleri olan fibroblastlarda toksik etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu sonucun altında yatan mekanizmanın daha iyi anlaşılması için detaylı moleküler analizlere ve sinyal yolağı çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bu durum yorumlandığında olası birkaç neden karşımıza çıkmaktadır: bunlardan ilki endotellerin ve kanser hücrelerinin hiperaktif sinyal yolaklarına bağımlıyken, fibroblastların bu sinyal yolaklarını çok daha düşük düzeyde kullanması; ikincisiye, endotel ve kanser hücrelerinin apoptoz sinyallerine daha duyarlı olmasıdır [105, 106]. Daha önce bergaptol ile yapılan sinyal yolağı çalışmaları bu önermeleri doğrular niteliktedir. 2020 yılında Shen ve ark., tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada bergaptolün tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) seviyelerini ciddi oranda azalttığı ettiği rapor edilmiştir [26]. 2024 yılında gerçekleştirilen güncel bir çalışmada ise bergaptol uygulamasının glioma hücrelerinde STAT-3/Bcl-2 yolağını inhibe ederek apoptozu teşvik edip hücre çoğalmasını engellediği rapor edilmiştir [107]. Bu durum, bergaptolün kanser oluşumunda ve endotel gelişiminde rol oynayan sinyal yolakları ile etkileşime girerek toksik etkiye neden olduğunu göstermektedir.

Bergaptol uygulama süresindeki değişimlerin konsantrasyona bağlı hücre canlılığı üzerindeki etkinlikleri incelendiğinde; bazı hücrelerde düşük konsantrasyonlarda bergaptol uygulamasının 48 ve 72. saatlerde etkinlik göstermediği sonucuna varılmıştır. Bu durumun bergaptolün 8 saatlik yarılanma ömründen kaynaklanma olasılığı yüksektir [23]. Her 8 saatte bir bileşiğin etkinliği düşmüş ve bu nedenle ilerleyen uygulama sürelerinde bergaptolün düşük konsantrasyonlardaki etkinliği azalmıştır. Ancak çoğu hücre hattında 48 ve 72. saatlerde gözlemlediğimiz etkin hücre ölümü bergaptolün etkin madde miktarı yarılanırsa da hücrelerin canlılığını baskılamaya devam ettiğini göstermektedir. Aynı zamanda hücrelerin ikilenme süreleri arasındaki farklılıklar da bileşiğin hücreler üzerindeki etkinliklerini değiştirebilir. Buna göre bakıldığında HeLa hücrelerinde 18-24 saat, MDA-MB-231 hücrelerinde 24-30 saat, HepG2

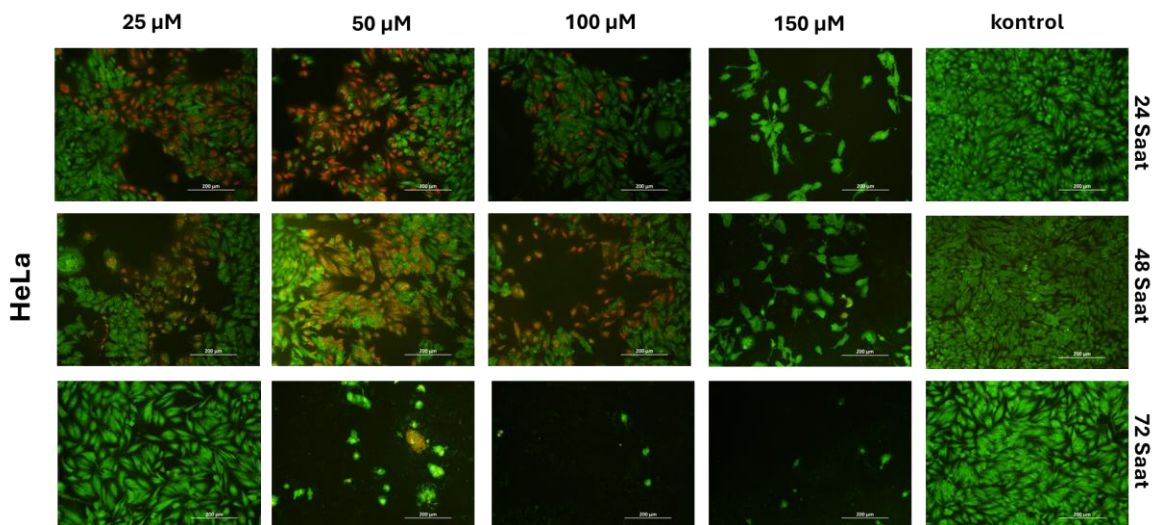
hücrelerinde 24-48 saat, HUVEC hücrelerinde ise 24-36 saatlik ikilenme süreleri bulunmaktadır [108-110]. Bu durum bileşiğin daha hızlı proliferasyon yapan hücrelerde daha fazla etkiye neden olmasına yol açmaktadır.

4.1.2. AT/Pİ Boyaması

Hücrelere bergaptol uygulaması sonrası, MTT analizini takiben canlı ve ölü hücrelerin görüntülenmesi için AT/Pİ boyaması yapılmış ve floresan mikroskobu altında hücreler fotoğraflanmıştır. Fotoğraflanan hücrelerdeki canlı hücreler yeşil ve ölü hücreler kırmızıyla nitelendirilmiştir.

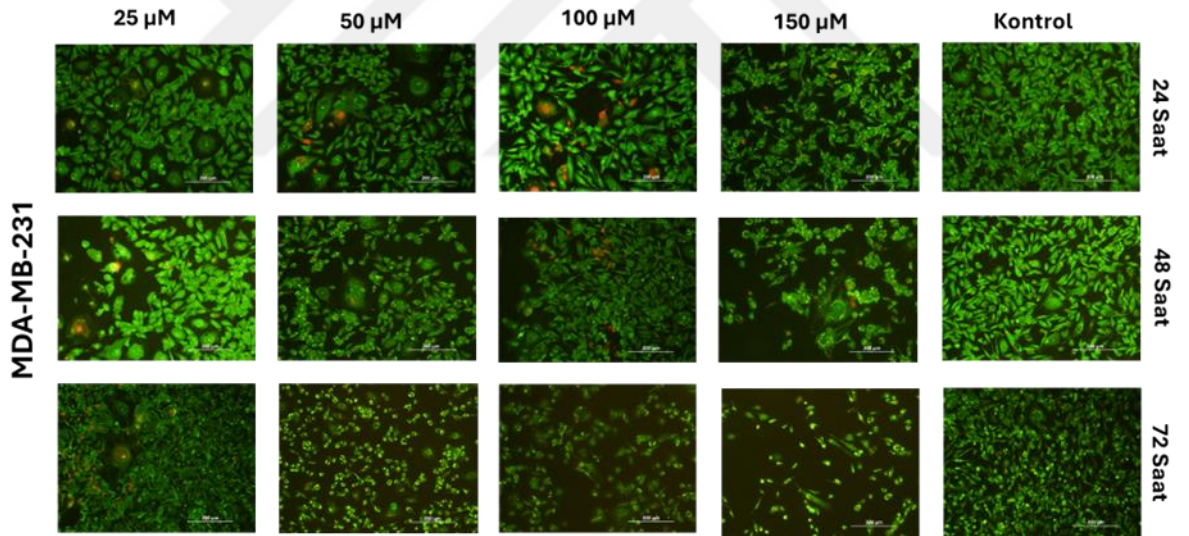
Sonuçları tek tek hücre bazında incelendiğinde;

HeLa hücrelerine farklı dozlarda bergaptol uygulaması sonrası AT/Pİ boyaması ile canlı ve ölü hücreler floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir (**Şekil 4.6**). Görüntüler incelendiğinde; uygulanan en düşük konsantrasyon olan 25µM'lık konsantrasyondan itibaren hücre ölümlerinin gerçekleştiği ve artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak hücre ölüm oranının arttığı görülmektedir. Özellikle uygulamanın 72. saatinde hücre canlılığı çarpıcı bir şekilde azalmış ve normal şartlarda kırmızı ile nitelendiren ölü hücrelerin hepsi dökülmüştür. Bu verilere göre; HeLa hücre hattında bergaptolün etkinliği konsantrasyon ve uygulama süresi olmak üzere her iki parametreye de bağlılık göstermektedir. Bu da daha önce MTT analizinden elde edilen verilerle tutarlılık göstermektedir.



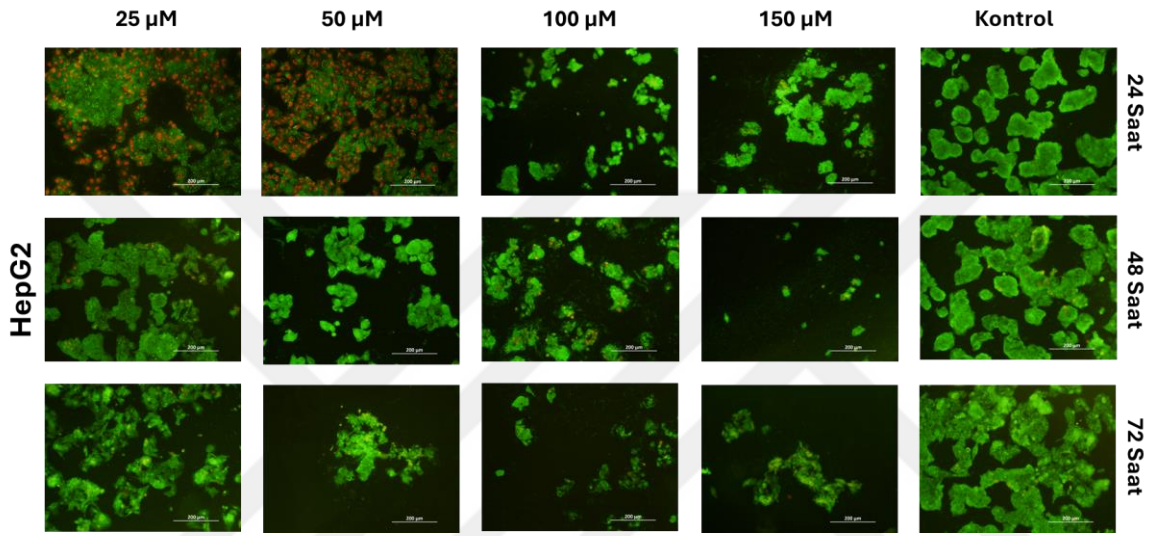
Şekil 4.6. HeLa hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası floresan görüntüleri (OlympusIX70 Mikroskop, 10X, 460-490 nm). Yeşil renk canlı, kırmızı-turuncu renk ölü hücreleri ifade etmektedir. HeLa hücre hattında uygulanan en düşük konsantrasyondan itibaren hücre ölümleri gerçekleşmiştir. En yüksek konsantrasyonda hücrelerin çoğu dökülmüştür.

MDA-MB-231 hücrelerine bergaptol uygulamasının ardından canlı ve ölü hücrelerin tespiti için AT/PI boyaması yapılmış ve floresan mikroskobu altında hücreler görüntülenmiştir (**Şekil 4.7**). Sonuçlar incelendiğinde; artan bergaptol konsantrasyonuna bağlı olarak ölü hücre sayısının arttığı görülmektedir. Özellikle 48 ve 72. saatlerde 50 μ M konsantrasyondan itibaren canlı hücre sayısının dikkate değer biçimde azaldığı ve hücre morfolojilerinde bozulmalar ile ölü hücre sayısının arttığı görülmektedir. Bu sonuçlar bize, yine uygulama süresinin önemli bir parametre olduğunu ve verilerin MTT analizinden elde edilen sonuçlarla paralellik gösterdiğini ifade etmektedir.



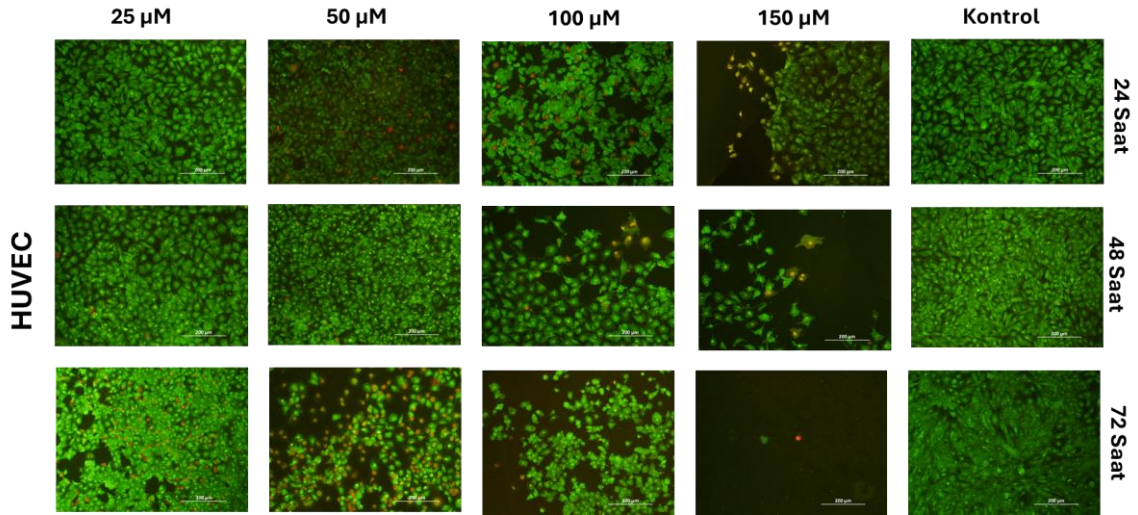
Şekil 4.7. MDA-MB-231 hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası floresan görüntüleri (OlympusIX70 Mikroskop, 10X, 460-490 nm). Yeşil renk canlı, kırmızı-turuncu renk ölü hücreleri ifade etmektedir. MDA-MB-231 hücre hattında uygulanan en düşük bergaptol konsantrasyonundan itibaren hücre ölümünün gerçekleştiği ve uygulama süresinin artmasıyla birlikte ölü hücre oranının arttığı görülmektedir.

HepG2 hücrelerine bergaptol uygulamasının ardından, canlı ve ölü hücreler AT/Pİ boyaması ile floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir (**Şekil 4.8.**). Elde edilen görüntüler incelendiğinde; bergaptolün en düşük konsantrasyonundan itibaren, HepG2 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı görülmektedir. Bu etki özellikle; 24 saatlik bergaptol uygulamasından sonra 100 μ M, 48 bergaptol uygulamasından sonra 50 μ M ve 72 saatlik bergaptol uygulama sonra 25 μ M'lık uygulamalarda net bir şekilde gözlemlenebilmektedir.



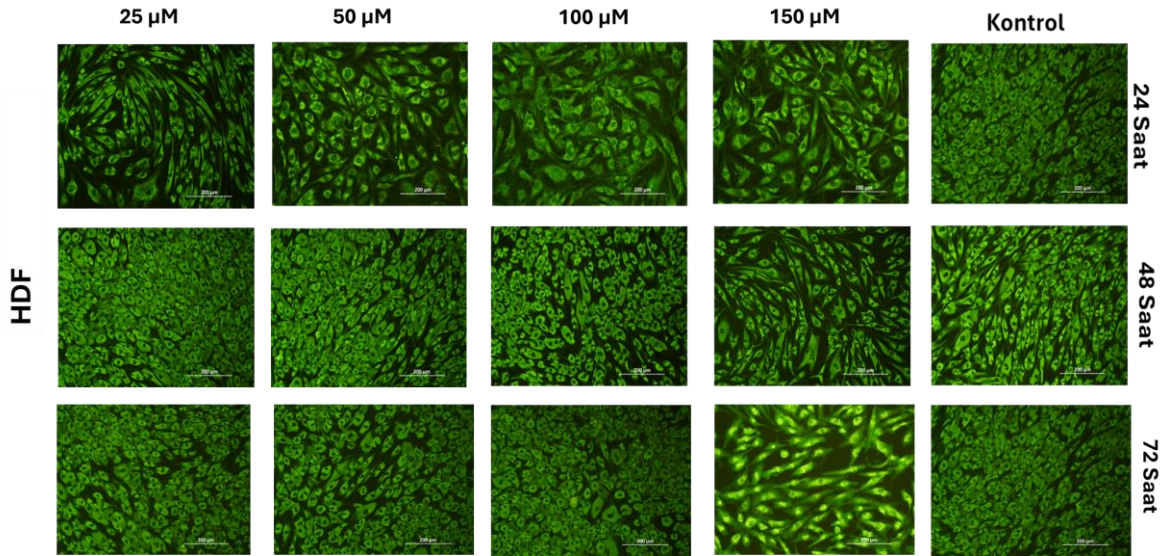
Şekil 4.8. HepG2 hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası floresan görüntüleri (OlympusIX70 Mikroskop, 10X, 460-490 nm). Yeşil renk canlı, kırmızı-turuncu renk ölü hücreleri ifade etmektedir. HepG2 hücre hattında uygulanan en düşük bergaptol konsantrasyonundan itibaren hücre ölümlerinin arttığı ve hücre morfolojilerinde bozulmalar gerçekleştiği görülmektedir. Hücre canlılığı uygulama süresinin artmasıyla birlikte yüksek oranda azalma eğilimi göstermiştir.

HUVEC hücrelerine farklı konsantrasyonlarda bergaptol uygulaması etkisinin AT/Pİ boyaması görüntüleri (**Şekil 4.9**) incelendiğinde; 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası 150 μ M'lık, 48 saat bergaptol uygulaması sonrası 100 μ M, 72 saatlik bergaptol uygulaması sonrası 50 μ M'lık konsantrasyonun üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığının önemli derece azaldığı görülmektedir. Bu sonuca göre; HUVEC hücre hattında hem uygulanan bergaptolün konsantrasyonu hem de uygulaması süresi hücre canlılığı için belirleyici parametrelerdir.



Şekil 4.9. HUVEC hücrelerine bergapton uygulaması sonrası floresan görüntüleri (OlympusIX70 Mikroskop, 10X, 460-490 nm). Yeşil renk canlı, kırmızı-turuncu renk ölü hücreleri ifade etmektedir. HUVEC hücrelerine bergapton uygulaması sonrası özellikle 100 µM konsantrasyondan itibaren hücre canlılığında yüksek oranda azalma görülmüştür. Bu azalma, artan konsantrasyonla doğru orantılı bir profil sergilemektedir.

HDF hücrelerine farklı konsantrasyonlarda bergapton uygulaması etkisinin AT/PI boyaması görüntüleri (**Şekil 4.10.**) incelendiğinde; uygulanan en yüksek bergapton konsantrasyonundan sonra dahi belirgin bir hücre ölümünün olmadığı görülmektedir.

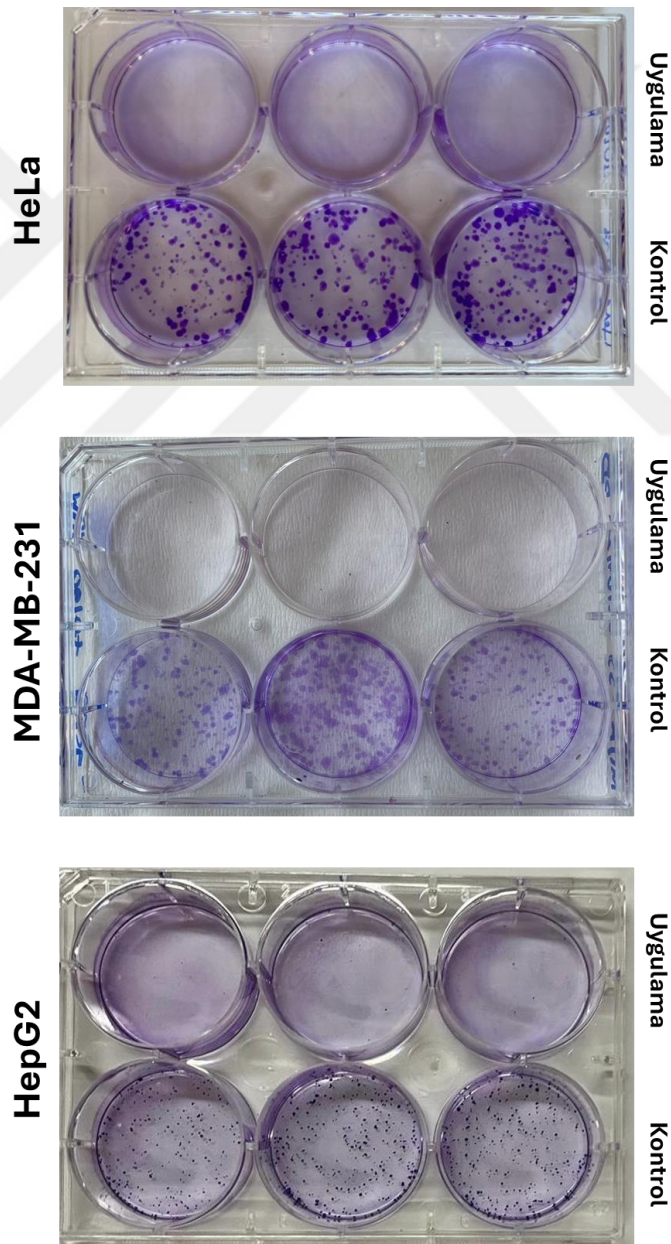


Şekil 4.10. HDF hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası floresan görüntüleri (OlympusIX70 Mikroskop, 10X, 460-490 nm). Yeşil renk canlı, kırmızı-turuncu renk ölü hücreleri ifade etmektedir. HDF hücre hattında bergaptol uygulaması sonrası hücre ölümü gerçekleşmemiştir.

Akridin turuncusu, canlı hücrelerde DNA/RNA'ya bağlanan ve hücre zarına geçirgen olan bir boyadır. Bu boya, DNA'ya bağlandığında yeşil floresan ışımaya yaymaktadır. Propidyum iyodür ise, hücre zarını geçemez ve bu nedenle yalnızca zarları hasar görmüş; nekrotik/geç apoptotik hücrelere nüfuz ederek kırmızı ışımaya neden olmaktadır [111]. AT/Pİ ikili boyama yöntemi, bileşiklerin hücreler üzerindeki toksisitesini değerlendirmek için avantajlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Sundar P. ve ark., tarafından içerisinde furanokumarinlerin de bulunduğu ikincil metabolitlerin sitotoksik etkileri, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde değerlendirilmiş ve AT/Pİ boyaması sonucu 91 µg/ml konsantrasyonda hücrelerin nekrotik profil kazandıkları rapor edilmiştir [112]. Çalışmamız kapsamında, sitotoksitesini değerlendirdiğimiz bergaptol, MDA-MB-231 hücre hattında 25 µM konsantrasyondan itibaren hücre ölümüne neden olmuştur. Bu da kullandığımız furanokumarin bileşiğinin, MDA-MB-231 hücre hattında daha etkin bir şekilde toksisite gösterdiğini ortaya koymaktadır. Başka bir çalışmada, bergamottin ve simvastatinin, insan miyeloid lösemi hücreleri üzerindeki kombine tedavisinin etkileri canlı/ölü hücre boyama metodu ile incelenmiş ve bu bileşik kombinasyonunun 50 µM bergamottin varlığında apoptotik hücre sayısında artışa neden olduğu rapor edilmiştir [113]. Bergaptol ile yaptığımız çalışmada tüm kanser hücre hatlarında 25 µM'lık uygulamalardan itibaren gerçekleştirilen floresan görüntüleme sonucunda hücre ölümlerinin gerçekleştiği görülmektedir. Bu bulgular yorumlandığında, bergaptolün kanser hücreleri üzerinde daha güçlü toksisite gösterdiği sonucuna varılabilmektedir. AT/Pİ deneyinden elde ettiğimiz tüm bulgular, bergaptolün kanser hücreleri ve endotel hücreleri üzerinde toksik etkiye neden olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, bergaptolün özellikle kanser hücreleri için yüksek toksisite sergilediğini ve elde edilen AT/Pİ görüntülerinin MTT sonuçlarını destekler nitelikte olduğunu göstermektedir.

4.1.3. Koloni Formasyonu Deneyi

Bergaptolün kanser hücrelerindeki uzun vadeli etkilerini değerlendirmek ve kanser hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkilerinin tespiti için; HeLa, MDA-MB-231 ve HepG2 hücreleriyle koloni formasyonu deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu deney kapsamında başlangıçta uygulama aralığımızdaki en düşük konsantrasyon olan 25 μ M'lık bergaptol uygulaması ile deneylere başlanmış ancak tekrar eden deneylerin tümünde koloni oluşumu tamamen baskılanmıştır (**Şekil 4.11**).



Şekil 4.11. 25 µM bergaptol uygulaması sonrası HeLa, MDA-MB-231 ve HepG2 hücre hatlarında koloni oluşumunun görüntülenmesi. Mor renk, kristal viyole ile boyanan hücre kolonilerini ifade etmektedir. Bergaptol uygulaması tüm hücre hatlarında koloni oluşumunun tamamen baskılanmasına neden olmuştur.

Bu aşamadan sonra daha düşük konsantrasyonlarda da denemeler yapılmış ve uyguladığımız en düşük konsantrasyon olan 5 µM'lık bergaptol konsantrasyonundan sonra dahi koloni oluşumu tamamen baskılanmıştır. Bu bulgulardan yola çıkarak, bergaptolün uzun vadede kanser hücre proliferasyonu üzerinde güçlü inhibitör etkiye neden olduğunu sonucuna varılmıştır.

Elde ettiğimiz veriler MDA-MB-231, HeLa ve HepG2 hücre hatlarında bergaptolün koloni oluşturma yeteneği üzerinde güçlü inhibitör etkiye neden olduğunu göstermektedir. Dong L. ve ark., tarafından 2017 yılında yayınlanan çalışmada; furanokumarin bileşiklerinden olan marmesinin, U937 insan lösemi hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve marmasin konsantrasyonuna bağlı olarak koloni oluşumunun baskılandığını rapor etmiştir [114]. Mi C. ve ark., tarafından imperatorinin HCT116 kolon kanseri hücre hattında anti-proliferatif etkilerini uzun vadede gözlemleyebilmek üzere gerçekleştirilen çalışmada, konsantrasyona bağlı olarak koloni oluşumunun baskılandığı görülmüştür [115]. Aynı şekilde başka bir furanokumarin bileşiği olan oroselolün SSC-4 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak koloni oluşumunu baskıladığı literatürde yer almaktadır [116]. Bu sonuçlar, bizim bergaptol ile gerçekleştirdiğimiz koloni oluşturma deneyinden elde ettiğimiz sonuçlar ile benzerlik gösterse de bergaptol, kullandığımız kanser hücre hatlarının koloni oluşturma yeteneklerini daha etkin bir şekilde baskılamıştır. Bu da bergaptolün uzun vadede kanser hücrelerinin proliferasyonunu tamamen baskıladığını ve kanserde proliferasyonu hedeflemede yüksek potansiyelli bir ajan olduğunu göstermektedir.

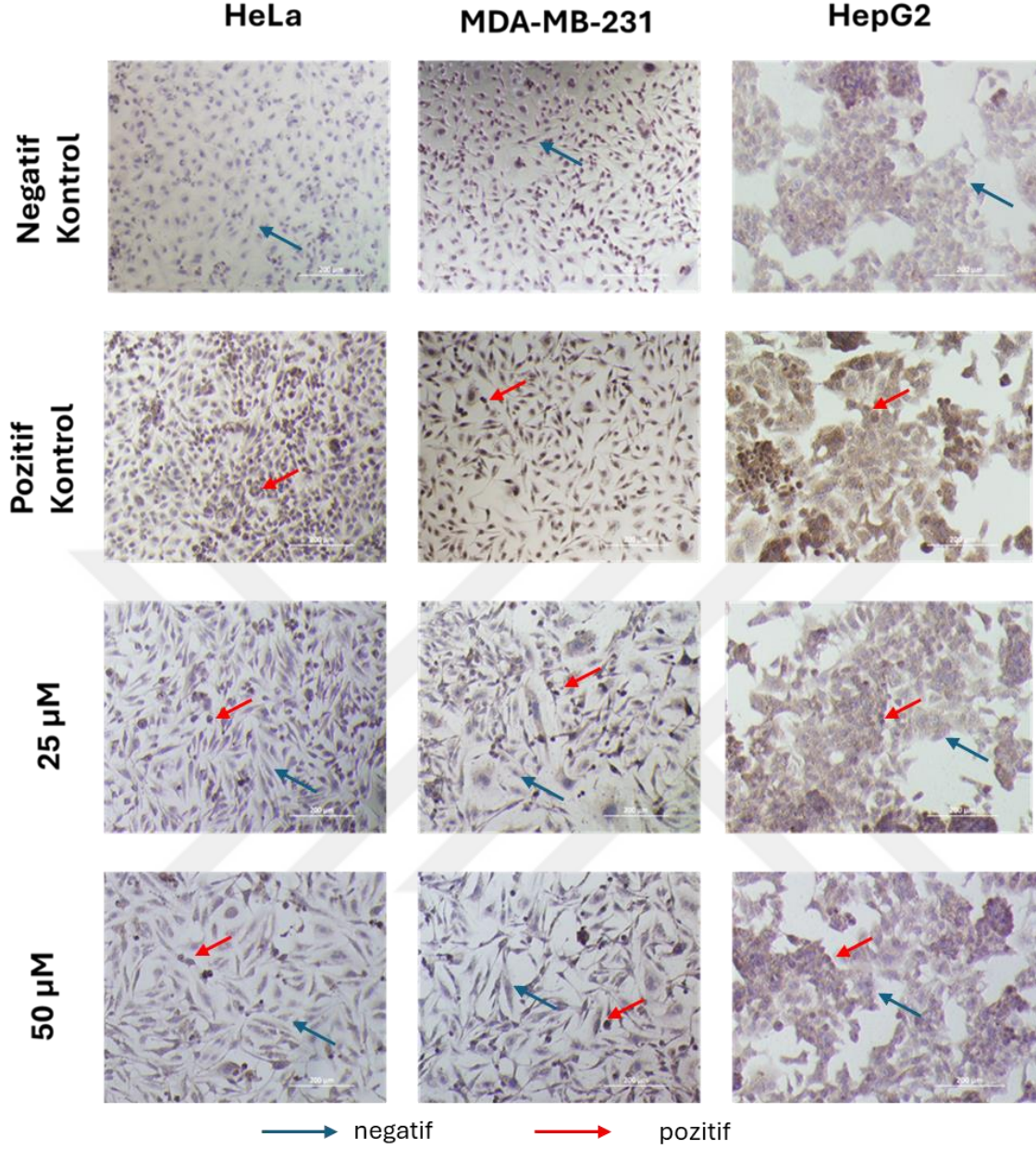
4.2. BrdU ile S Fazındaki Hücrelerin İşaretlenmesi

Tez çalışması kapsamında, daha önce bergaptolün hücre proliferasyonu üzerine etkilerinin değerlendirilmediği; HeLa, HepG2 ve MDA-MB-231 hücrelerinde bergaptol uygulaması sonrası proliferasyon oranları analiz edilmiştir.

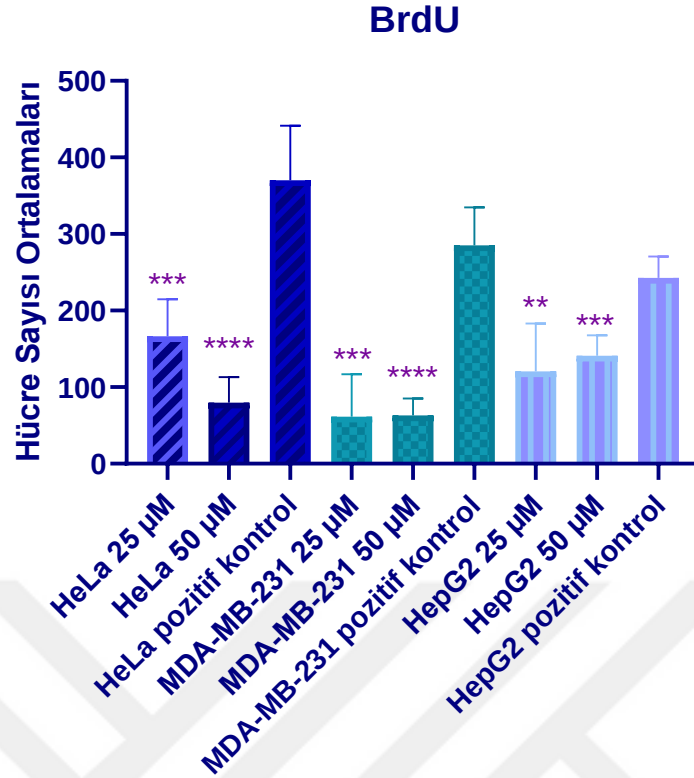
Bunun için immunositokimya yöntemi kullanılarak, bergaptol uygulaması sonrası hücre döngüsünde S fazına giren hücre oranlarındaki değişimler incelenmiştir. Başlangıçta optimizasyon sağlamak adına, pozitif ve negatif kontrol grupları oluşturularak yüzey işaretlemeleri gerçekleştirilmiş ve hücrelerin normal koşullarda BrdU ifade edip etmediği kontrol edilmiştir. Oluşturulan pozitif ve negatif kontrol gruplarının yanı sıra; 48 saat boyunca 25 μ M ve 50 μ M bergaptol uygulaması yapılan iki ayrı grup oluşturulmuştur. Hücreler, BrdU ile işaretlenmiş ve boyamanın ardından koyu kahverengi renkli görünen hücreler BrdU pozitif, açık renkli görünen hücreler BrdU negatif olarak değerlendirilmiştir.

Mikroskop altında fotoğraflanan hücrelerden, her bir grup için 5 farklı alandan hücre sayımı yapılmış ve elde edilen sayıların ortalaması alınarak grafik ile görselleştirilmiştir. Ardından her grubun kendi kontrol grubu ile uygulama grupları arasında istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir (**Şekil 4.13.**). Böylece; BrdU ile işaretlenmiş, yani proliferasyon olmuş hücre oranları tespit edilerek bergaptolün hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Elde edilen veriler incelendiğinde; her üç hücre hattında da bergaptol uygulamasının ardından S fazına geçen (BrdU pozitif) hücre sayısında önemli derecede azalma görülmüştür ve kontrol grupları ile uygulama grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**Şekil 4.13.**). Özellikle, Hela ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 50 μ M bergaptol uygulaması sonrası elde edilen veriler kontrole kıyasla istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlılık ifade etmektedir. Bu sonuçlar bize; bergaptolün, kanser hücre proliferasyonu üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.12. Bergaptol uygulaması öncesi ve sonrası BrdU işaretli hücrelerin ifadeleri; negatif kontrol grubu işaretleme yapılmamış hücreleri ifade ederken, pozitif kontrol grubu BrdU işaretleme yapılmış hücreleri ifade etmektedir. Bu şekilde, BrdU pozitif ve negatif hücre görüntüleri için optimizasyon sağlanmıştır. Hem 25 μ M hem de 50 μ M bergaptol uygulaması sonrası tüm kanser hücre hatlarında S fazına geçen hücre sayısında azalma gerçekleşmiştir. (OlympusIX70 Mikroskop, 10X).



Şekil 4.13. Kanser hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası BrdU pozitif hücre ortalamalarının ifadesi. Grafik farklı konsantrasyonlarda bergaptol uygulaması sonrası hücre döngüsünün S fazına geçen hücre ortalamalarını ifade etmektedir. Tüm kanser hücre hatlarında kontrol gruplarına göre S fazına geçen hücre oranları istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. HeLa ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 50 µM bergaptol uygulaması sonrası elde edilen veriler kontrole göre yüksek derecede anlamlı bulunmuştur (**; $p \leq 0.001$), (***; $p \leq 0.0005$), (****; $p \leq 0.0001$).

(* sembolü: kontrol grubu ile uygulama grupları arasındaki istatistiksel farkı ifade etmektedir).

Modifiye edilmiş bir nükleotid ve timidin analogu olan 5-Bromo-2'-deoksiuridin (BrdU), proliferatif hücreleri tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir [117]. Esas olarak, S fazında DNA sentezi sırasında bölünen hücrelerin DNA'sına kalıcı olarak entegre olur ve bu sayede yeni oluşan hücreler işaretlenmiş olur [118].

Daha önce Ge Z. C. ve ark., tarafından 2016 yılında yayınlanan bir çalışmada MCF-7 hücre hatları üzerinde bergaptolün antiproliferatif etkileri analiz edilmiş ve bergaptolün MCF-7 proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür [119]. 2024 yılında

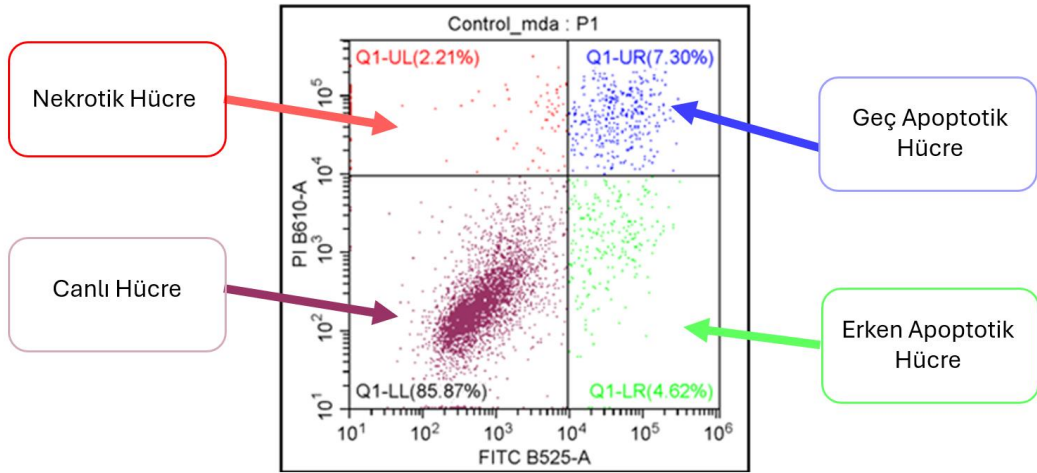
yayınlanan bir başka çalışmada Hoa H. ve ark., bergaptolün glioblastoma proliferasyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve güçlü bir şekilde bu hücrelerde proliferasyonu inhibe ettiği rapor edilmiştir [107] . Bartmik M. ve ark., tarafından 8-metoksipsoralen ile SK-N-AS nöronlastoma ve SW620 kolon kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise uygulama sonrası BrdU işaretli hücre sayısının azaldığı gözlemlenmiş ve bu doğrudan konsantrasyona bağlı olarak DNA sentezi inhibisyonu ile ilişkilendirilmiş [120] . Yine Baertnik M. ve ark., tarafından yayınlanan bir başka çalışmada furanokumarinlerden olan isopimpinellinin konsantrasyona bağlı olarak Saos-2 hücrelerinde BrdU pozitif hücre sayılarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [121]. Bu sonuçlar bizim BrdU boyamasından elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik göstermektedir. S fazındaki hücre sayısındaki azalmalar, bergaptol uygulaması sonrası hücre döngüsünün inhibe olduğu ve DNA sentezinin durduğunu göstermektedir. Bergaptolün bu etkisi, kanser hücrelerinin ilerleyici profilini engellemek ve çoğalmasını baskılamak adına kritik öneme sahiptir.

4.3. Akış Sitometrisi Analizleri

4.3.1. Hücre Apoptozunun Analizi; Annexin V-FITC/Propidium İyodür İşaretlemesi

Tez çalışması kapsamında, bergaptol uygulaması sonrası kanser hücrelerinde ve endotel hücresindeki apoptoz oranının tespiti için Annexin V-FITC/Propidium İyodür tahlili gerçekleştirilmiştir. Bunun için hücre ekimini takiben; 25, 50 ve 100 μ M'lık bergaptol uygulaması yapılmış ve ardından 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda akış sitometrisi ile apoptotik hücre oranları tespit edilmiştir.

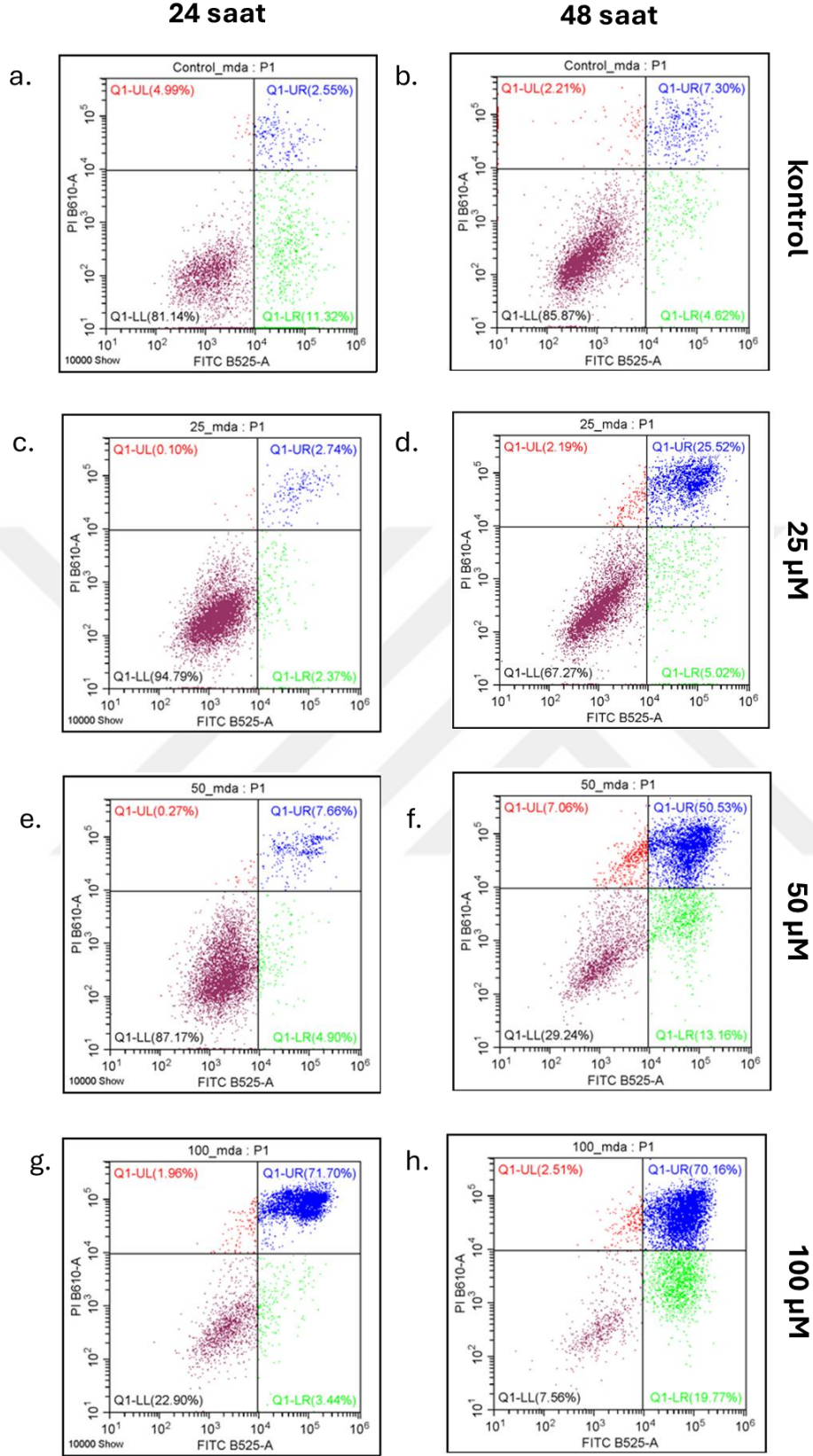
Sonuçlar değerlendirirken **Şekil 4.14**'de yer alan şablon düzeni kullanılmıştır.



Şekil 4.14. Apoptotik analizlerin değerlendirilmesi için şablon düzeni.

Hücrelerin bergaptol uygulamasından sonra gerçekleşen apoptoz oranlarını tek tek hücre bazında incelendiğinde;

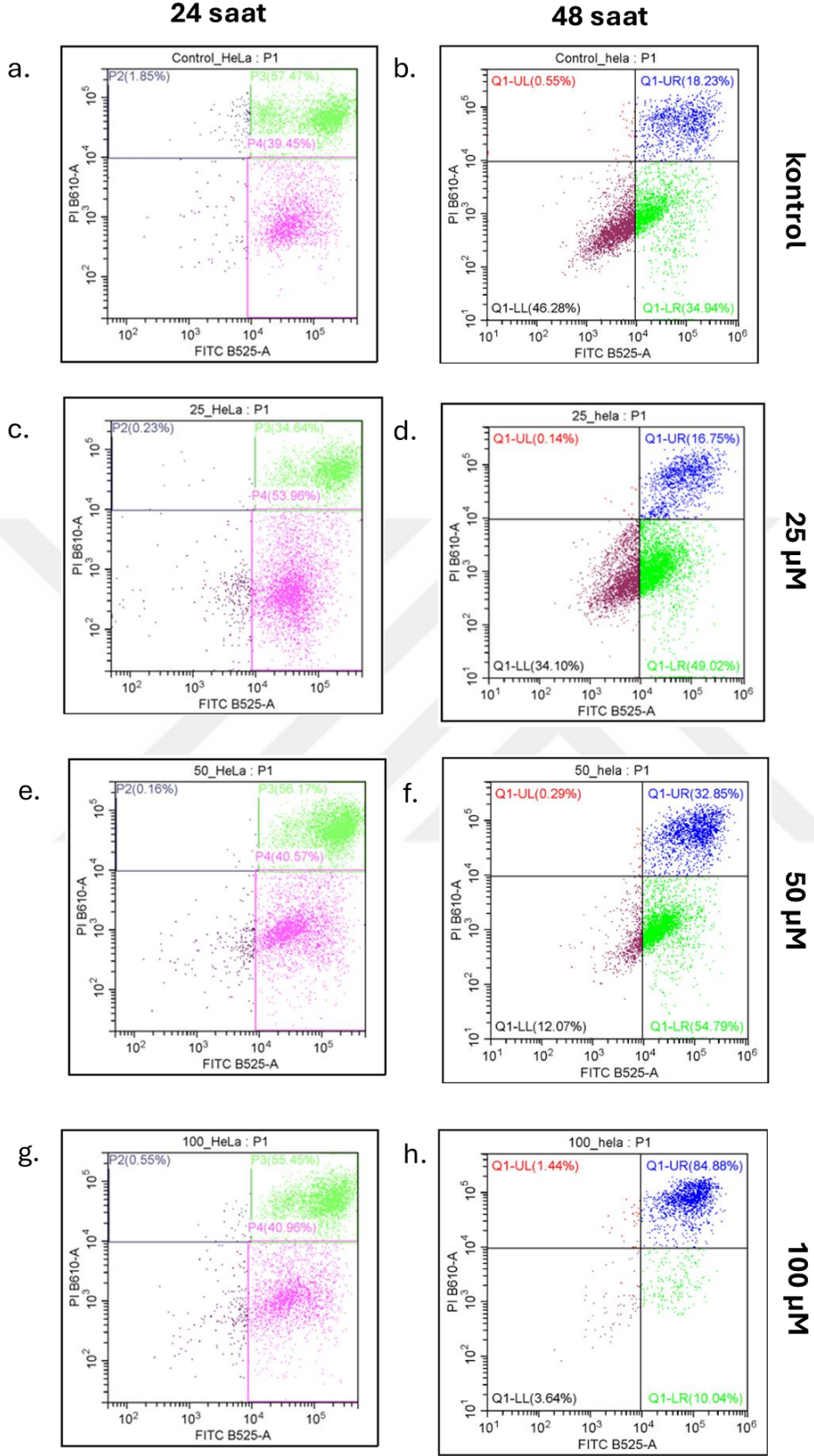
MDA-MB-231 hücre hattında (Şekil 4.15), 24 saatlik bergaptol inkübasyonu sonrasında, artan bergaptol konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak erken ve geç apoptotik hücre oranları artmıştır. Apoptozdaki en keskin artış 100 μ M bergaptol uygulaması sonrasında gerçekleşmiştir. Burada geç apoptotik hücre oranı %71,70'e kadar yükselirken, canlı hücre oranı %22,90'a düşmüştür. 48 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen veriler de 24. saatte elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. Ancak, 100 μ M'dan daha düşük bergaptol uygulamalarında 24. saate göre daha fazla geç ve erken apoptotik hücre olduğu yani bergaptolün hücre apoptozuna yönelik etkinliğinin arttığı görülmektedir. Bu da canlı hücre sayısının kritik oranda düştüğünü göstermektedir. Sonuç olarak, bergaptolün MDA-MB-231 hücre hattında apoptotik etki gösterdiği ve bu etkinin bergaptol konsantrasyonu ve uygulama süresiyle doğru orantılı olarak arttığını söyleyebiliriz. Daha önceki deneysel adımlardan elde ettiğimiz tüm sonuçlarda olduğu gibi Annexin V/PI analizinden elde ettiğimiz sonuçlarda da MDA-MB-231 hücre hattında bergaptolün etkinliğindeki artış için uygulama süresi önemli bir parametreyi temsil etmektedir ve uygulama süresindeki artışla birlikte hücre canlılığı azalmaktadır.



Şekil 4.15. MDA-MB-231, 24 ve 48 saatlik bergapton uygulamaları sonrası Annexin V-FITC/PI tahlili sonuçları. a. 24 saat kontrol, b. 48 saat kontrol, c. 25 μ M bergapton uygulaması sonrası 24. saat, d. 25 μ M bergapton uygulaması

sonrası 48. Saat, e. 50 μ M bergaptol uygulaması sonrası 24. Saat, f. 50 μ M bergaptol uygulaması sonrası 48. Saat, g. 100 μ M bergaptol uygulaması sonrası 24. Saat, h. 100 μ M bergaptol uygulaması sonrası 48. Saat. 24 saat verilerinde 100 μ M'lık bergaptol uygulaması sonrası apoptotik hücre oranı yüksek oranda artış göstermiştir. 48 saat verilerinde ise en düşük konsantrasyonda bergaptol uygulamasını takiben apoptozdaki kademeli artış dikkat çekici görünmektedir. Her grupta en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).

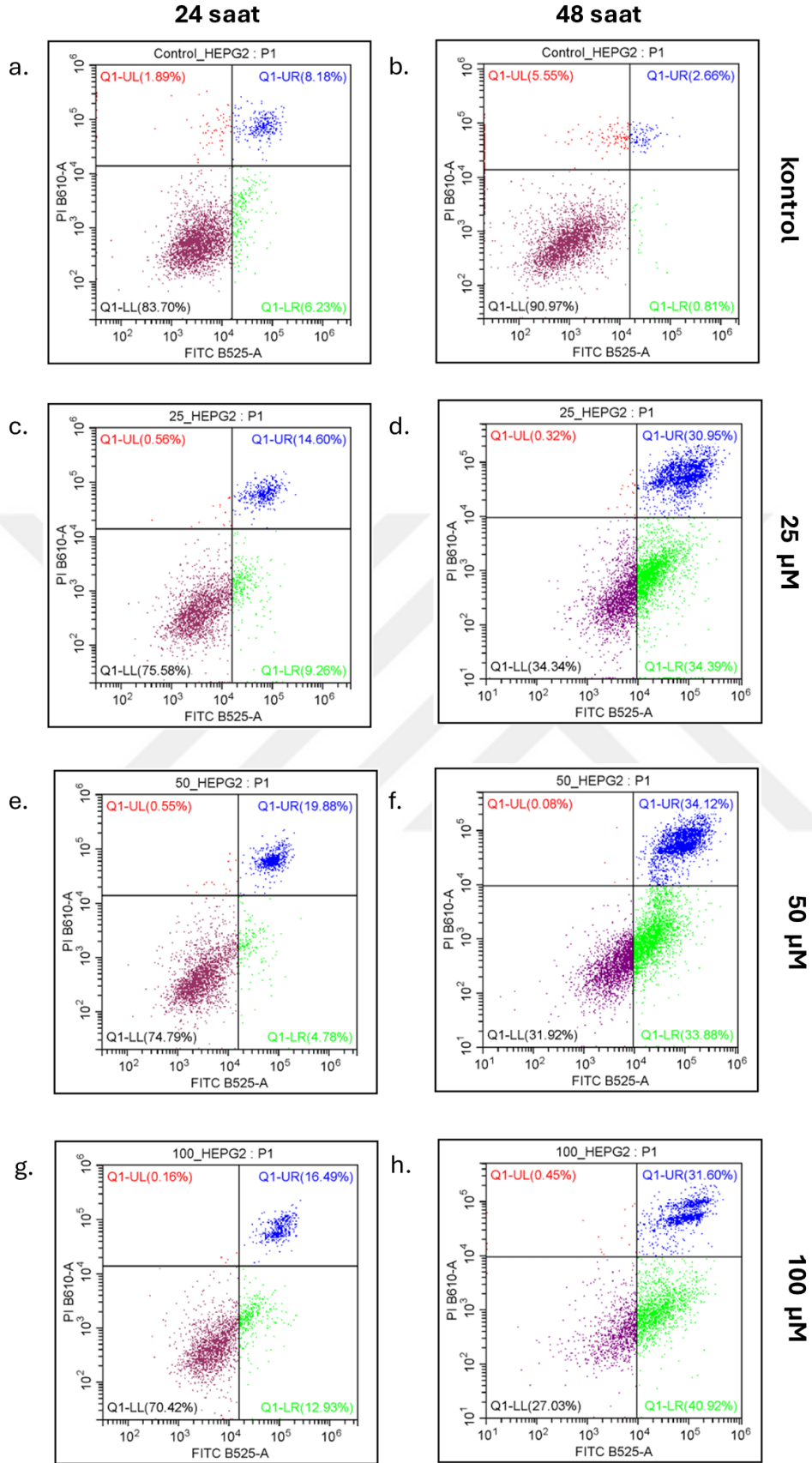
HeLa hücre hattında (Şekil 4.16), 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası 25 μ M'da %34,64 olan geç apoptotik hücre oranı 100 μ M'da %55,45'e çıkmıştır. 48 saatte ise 25 μ M'da %16,75 olan geç apoptotik hücre oranı 100 μ M'da %84,88'e yükselmiştir. Burada apoptozdaki artış oranı, bergaptol konsantrasyonu ve bergaptolün uygulama süresiyle artış göstermiştir. Bu sonuçlara göre, bergaptolün uygulama süresindeki artış özellikle yüksek konsantrasyonlarda HeLa hücre hattı üzerinde güçlü apoptotik etkiye neden olmuştur. Buradan elde ettiğimiz veriler, tez kapsamında yer alan önceki deneysel basamakların tümünden elde ettiğimiz verilerle tutarlılık göstermektedir.



Şekil 4.16. HeLa 24 ve 48 saatlik bergapton uygulamaları sonrası Annexin V-FITC/PI tahlili sonuçları. a. 24 saat kontrol, b. 48 saat kontrol, c. 25 μ M bergapton

uygulamasý sonrası 24. saat, d. 25 µM bergaptol uygulamasý sonrası 48. Saat, e. 50 µM bergaptol uygulamasý sonrası 24. Saat, f. 50 µM bergaptol uygulamasý sonrası 48. Saat, g. 100 µM bergaptol uygulamasý sonrası 24. Saat, h. 100 µM bergaptol uygulamasý sonrası 48. Saat. HeLa hücre hattında hem 24 hem 48 saatlik bergaptol uygulamasý apoptotik hücre oranında yüksek derecede artışa neden olmuştur ve canlı hücre sayısı dikkate değer bir biçimde azalmıştır. Her grupta en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).

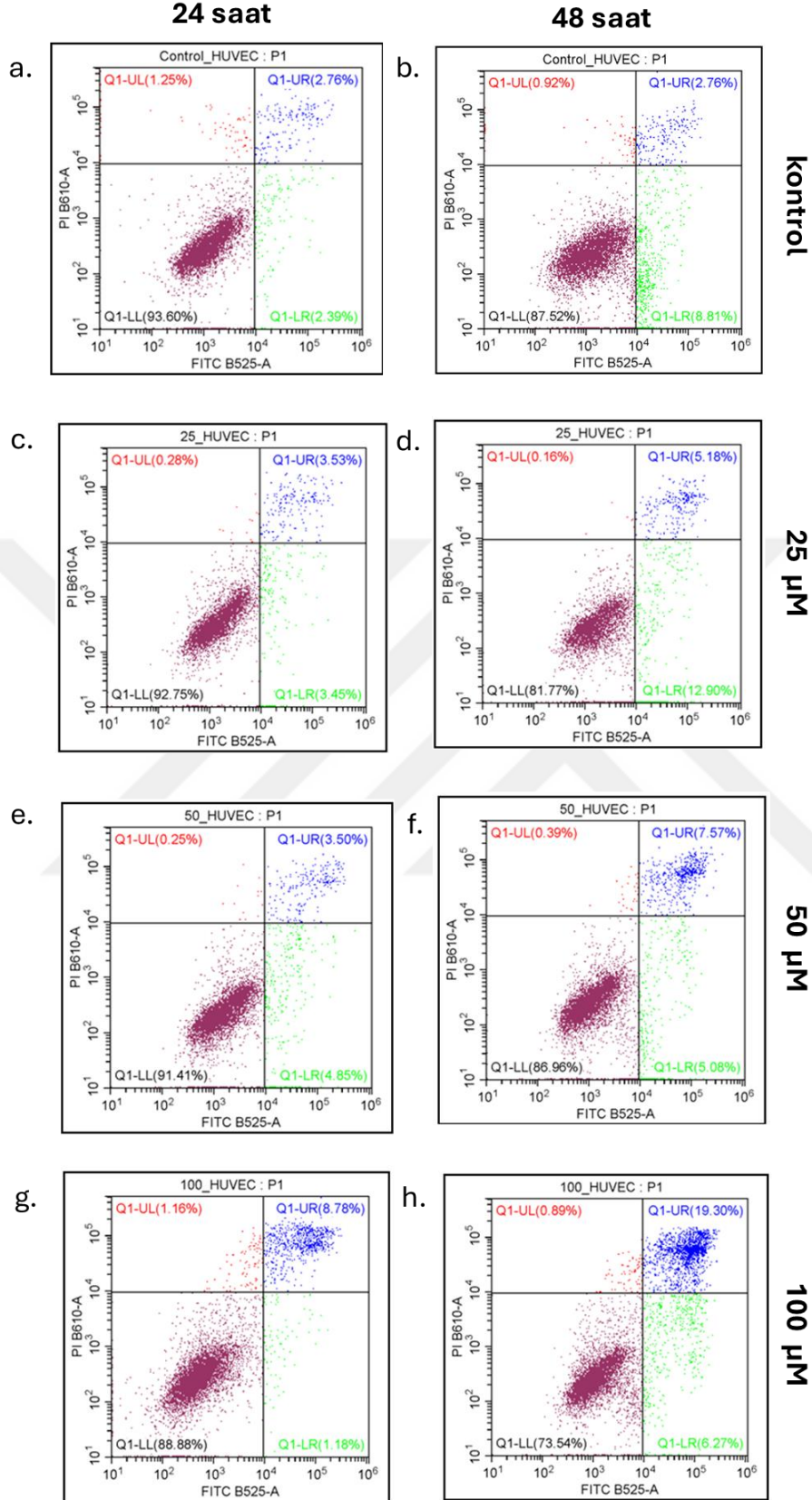
HepG2 hücre hattında (Şekil 4.17), 24 saatlik bergaptol uygulamasý sonrası geç apoptotik hücre oranında konsantrasyona bağılı artış görülmüş ve bu etki 48. saate yaklaşık iki katına çıkmıştır. Ancak, diğer hücre hatlarından elde edilen verilere kıyasla; HepG2 hücre hattında geç apoptotik hücre oranından ziyade, erken apoptotik hücre oranında daha fazla artış görülmüştür. Bu bize, hücrelerin apoptotik yola girdiğini ve bergaptolün uygulama süresinde gerçekleştirilecek artışın, geç apoptotik hücre oranında artışa neden olabileceğini göstermektedir. Buna göre, HepG2 hücre hattında bergaptolün konsantrasyona ve uygulama süresine bağılı olarak apoptoza neden olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 4.17. HepG2 24 ve 48 saatlik bergapton uygulaması sonrası Annexin V-FITC/PI tahlili sonuçları. a. 24 saat kontrol, b. 48 saat kontrol, c. 25 μ M bergapton

uygulamasý sonrası 24. saat, d. 25 µM bergaptol uygulamasý sonrası 48. Saat, e. 50 µM bergaptol uygulamasý sonrası 24. Saat, f. 50 µM bergaptol uygulamasý sonrası 48. Saat, g. 100 µM bergaptol uygulamasý sonrası 24. Saat, h. 100 µM bergaptol uygulamasý sonrası 48. Saat. HepG2 hücre hattına bergaptol uygulamasý sonrası özellikle 48 saatlik inkübasyondan sonra apoptotik hücre oraný artış göstermiştir. Her grupta en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).

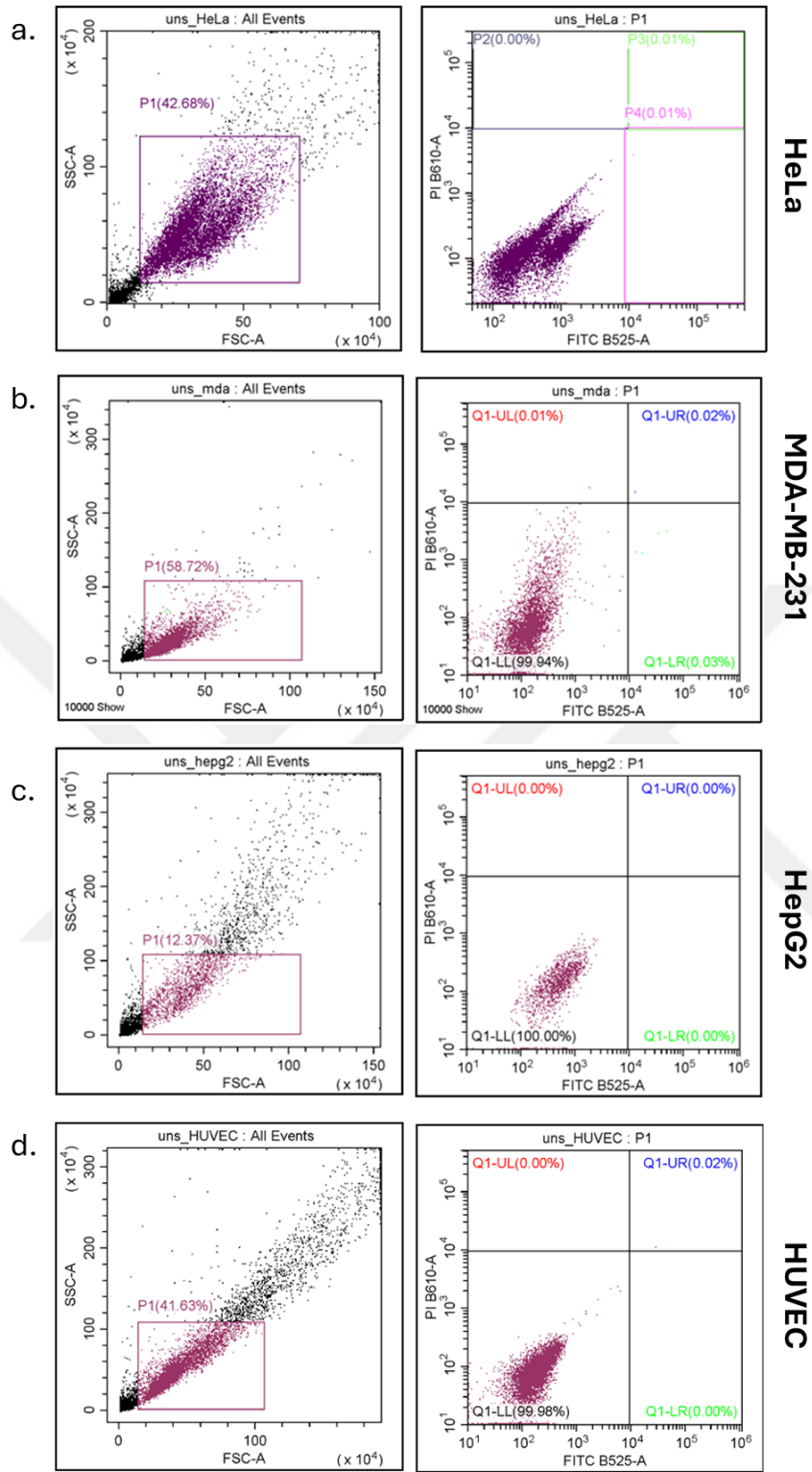
HUVEC hücre hattında (Şekil 4.18), bergaptol uygulamasını takip eden 24.saatte uygulanan en yüksek konsantrasyon olan 100 µM'lık bergaptol uygulamasından sonra geç apoptotik hücre oranı %8,78 iken 48. saatte %19,30'a yükselmiştir. Her iki veride de kontrole göre apoptotik hücre sayısında artış görülmüştür. Apoptotik etki, kanser hücre hatlarındaki kadar yüksek olmasa da apoptozda konsantrasyona ve uygulama süresine göre kademeli bir artış olmuştur.



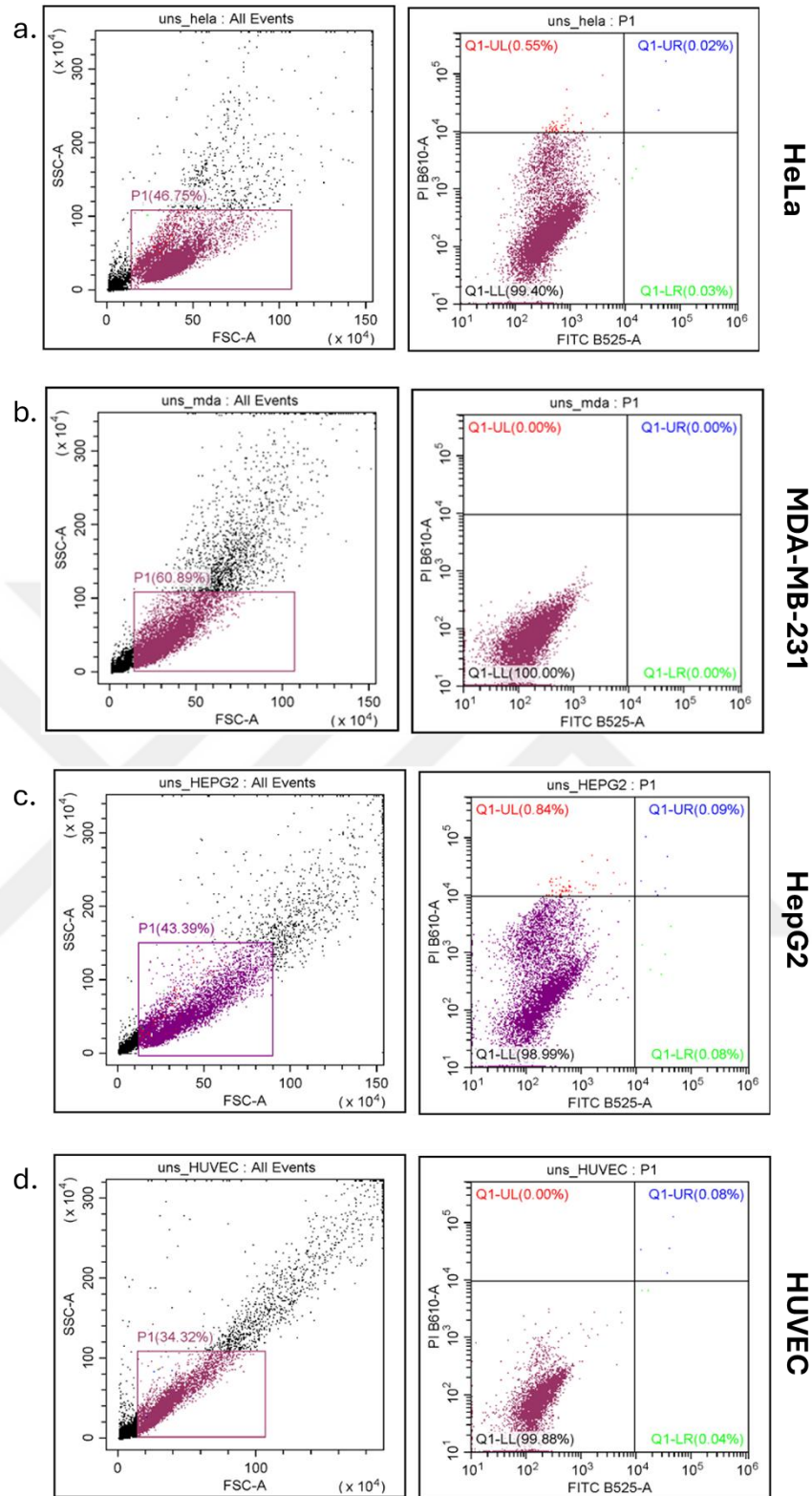
Şekil 4.18. HUVEC 24 ve 48 saatlik bergapton uygulaması sonrası Annexin V-FITC/PI tahlili sonuçları. a. 24 saat kontrol, b. 48 saat kontrol, c. 25 µM bergapton uygulaması sonrası 24. saat, d. 25 µM bergapton uygulaması sonrası 48. Saat, e.

50 μ M bergaptol uygulaması sonrası 24. Saat, f. 50 μ M bergaptol uygulaması sonrası 48. Saat, g. 100 μ M bergaptol uygulaması sonrası 24. Saat, h. 100 μ M bergaptol uygulaması sonrası 48. Saat. HUVEC hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası hem 24 hem 48. Saatlerde apoptotik hücre oranında konsantrasyona bağlı kademeli artış görülmektedir. Her grupta en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).

Hücrelerin tümünde; en yüksek apoptoz oranı 100 μ M'lık bergaptol uygulamasından sonra görülmektedir. Hücrelerde 48. saatte 100 μ M'lık bergaptol uygulamasından sonra gözlemlenen geç apoptotik hücre oranlarını kıyaslayacak olursak; HeLa (%84,88)> MDA-MB-231 (%70,16)> HepG2 (%31,60)> HUVEC (%19,30) olarak sıralayabiliriz. Buna göre, en yüksek etki HeLa hücre hattında, en düşük etki HUVEC hücre hattında görülmektedir. Sonuçlar MTT analizi ve AO/PI sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir.



Şekil 4.19. 24. Saat kapılama stratejileri ve unstained verileri. a. HeLa, b. MDA-MB-231, c. HepG2, d. HUVEC. Her bir hücre için akış sitometrisi ile en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).



Şekil 4.20. 48. Saat kapılama stratejileri ve unstained verileri. a. HeLa, b. MDA-MB-231, c. HepG2, d. HUVEC. Her bir hücre için akış sitometrisi ile en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).



Şekil 4.21. 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Annexin V-FITC/PI tahlili sonuçları. a. 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası erken apoptotik hücre yüzdesi, b. 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası geç apoptotik hücre yüzdesi, c. 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası erken apoptotik hücre yüzdesi, d. 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası geç apoptotik hücre yüzdesi. 24. Saatte HeLa, HepG2 ve HUVEC hücre hatlarında erken apoptotik hücre oranları artarken geç apoptotik hücre oranı tüm gruplarda artış göstermiştir. 48. Saatte MDA, HepG2 ve HUVEC hücre hatlarında erken apoptotik hücre oranları artarken geç apoptotik hücre oranı tüm hücrelerde artış göstermiştir.

Sağlıklı ve canlı bir hücrenin plazma membranının iç ve dış yüzeyinde asimetrik olarak dağılmış lipidler bulunmaktadır. Bunlardan biri olan fosfatidilserin (PS), normal şartlarda membranın iç yüzeyinde bulunsa da apoptozla birlikte kaybolan membran asimetrisi nedeniyle dış yüzeye çıkar [122]. Ca^{2+} iyonlarının varlığında, Annexin V dış yüzeye çıkan PS'lere güçlü bir şekilde bağlanma eğilimi gösterir. Bunun yanında, PI yalnızca nekrotik ve geç apoptotik hücrelerin DNA'sına bağlanır [123]. Bu nedenle Annexin V/PI kullanılarak erken-geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücre oranları tespit edilebilmektedir.

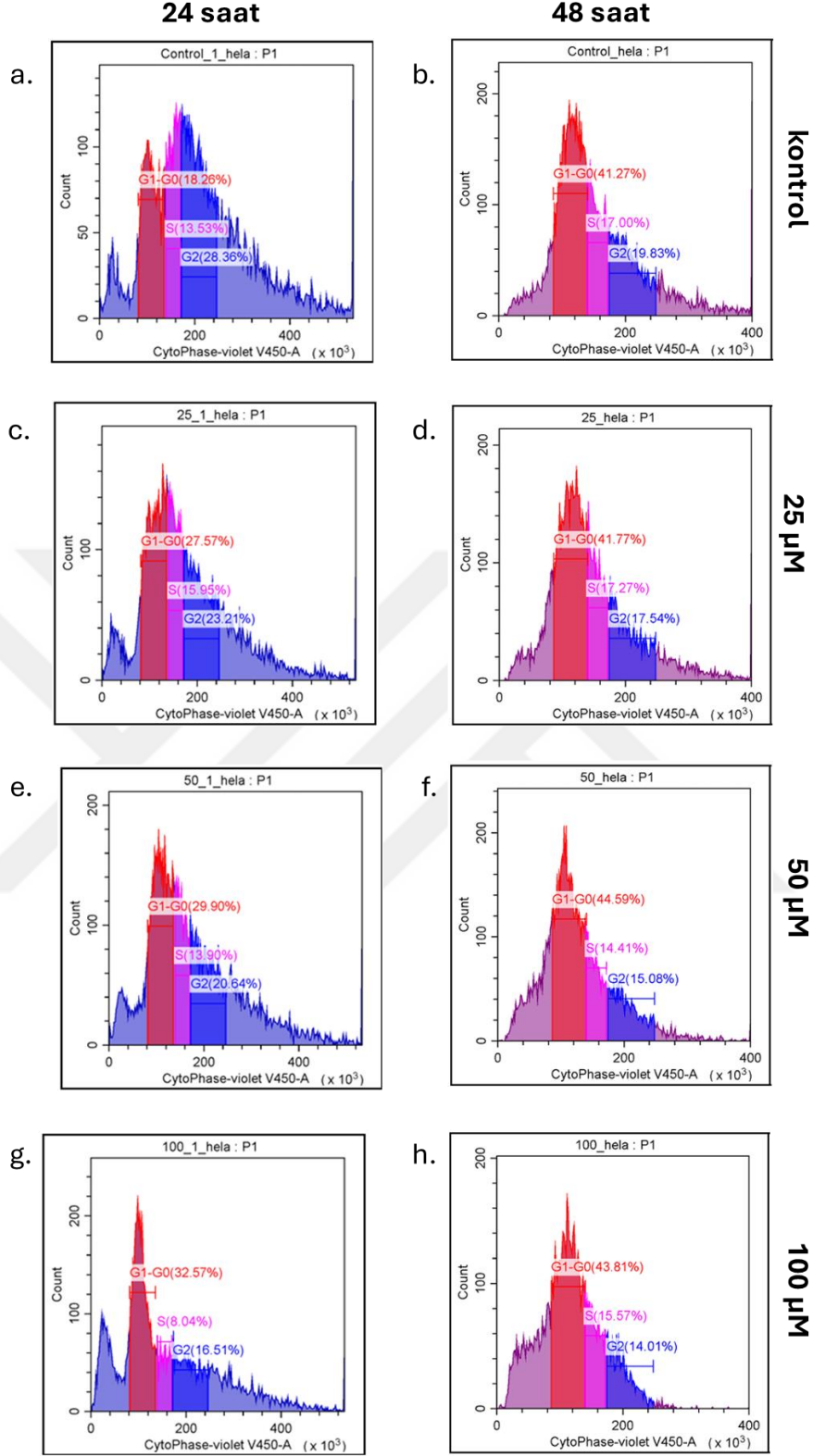
Akış sitometrisinden elde edilen sonuçlara göre; artan bergaptol konsantrasyonuna bağlı olarak, apoptotik hücre sayısında artış görülürken; canlı hücre sayısı da dikkate değer biçimde azalmıştır. Yang H. ve ark., tarafından HepG2 hücre hattı üzerinde 8-metoksipsoralenin apoptotik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada; 25, 50, 100 μ M'lık uygulama gruplarında 48 saatlik inkübasyonun ardından apoptotik hücre oranında artış olduğu rapor edilmiştir [83]. Bizim çalışmamızda bergaptol uygulaması sonrası HepG2 hücre hattından elde ettiğimiz sonuçlar, bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterse de HepG2 hücrelerinde apoptozu 8-metoksipsoralenden daha fazla arttırmış ve uygulamanın 24. saatinde de etki göstermiştir. Ge Z. C. ve ark., tarafından MCF-7 hücre hattı üzerinde bergaptol uygulaması sonrası Annexin V/PI yöntemiyle apoptotik hücre oranları analiz edilmiş ve bergaptol konsantrasyonuna bağlı olarak hücre apoptozunda artış gerçekleştiğini rapor edilmiştir [4]. Bu sonuç tez çalışması kapsamında kullandığımız hücre hatlarına bergaptol uygulaması sonrası elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Cao L. H. ve ark., tarafından gerçekleştirilen çalışmada furanokumarin bileşiklerinden olan ksanthotoksinin HUVEC hücreleri üzerinde koruyucu etkiye neden olduğu rapor edilmiştir [124]. Buna karşın bergaptol ile gerçekleştirdiğimiz çalışmadan elde ettiğimiz veriler bergaptolün HUVEC hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermektedir. Bhagavatheeswaran S. ve ark., tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise başka bir furanokumarin bileşiği olan isopimpinellinin HUVEC hücre canlılığı üzerinde inhibitörük etki gösterdiği rapor edilmiştir ve bu sonuç bizim sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir [125]. Bu bağlamda, tüm sonuçlar ele alındığında; analiz ettiğimiz hücre hatlarında, özellikle geç apoptotik hücre sayısındaki artışlar dikkat çekici görünmektedir. 24 ve 48 saatlik uygulamalar arasındaki farka baktığımızda ise 48 saatlik uygulamanın ardından apoptotik hücre artışı net olarak görülmektedir. Bu da bergaptole bağlı hücre apoptozunun hem konsantrasyon hem de uygulama süresiyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Annexin V/PI işaretlemesinden elde ettiğimiz tüm veriler, bergaptolün kanser hücrelerinde ve endotel hücresinde gösterdiği toksik etkinin mekanizmasının yüksek oranda apoptozla ilişkili olduğunu ve bu bileşiğin, apoptozun hedeflenmek istediği kanser çalışmaları için önemli bir bitkisel ajan olduğu göstermektedir.

4.3.2. Hücre Döngüsünün Akış Sitometrik Değerlendirmesi

4.3.2.1. Cytophase Violet ile Hücre Fazlarının Tespiti

Hücre döngüsünün akış sitometrik analizi, üreticinin protokolü izlenerek gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde, hücrelere bergaptol uygulaması sonrası G₀-G₁, S ve G₂-M fazındaki hücre oranlarındaki değişimler incelenmiştir. Tek tek hücre bazında elde edilen tüm sonuçlar aşağıda yer almaktadır.

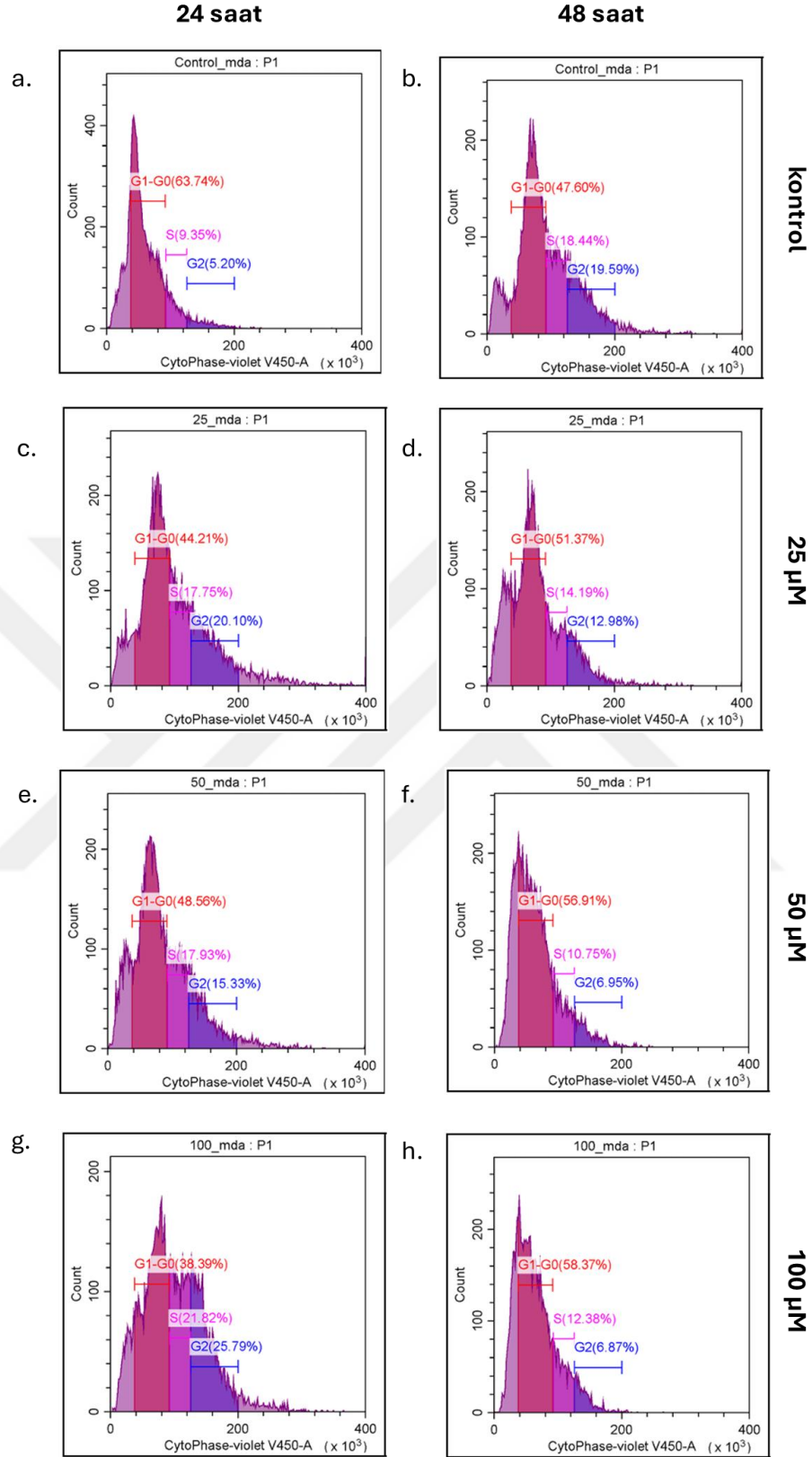
HeLa hücre hattında (Şekil 4.22), hem 24 hem de 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası G₀-G₁ kontrole kıyasla bergaptol konsantrasyonundaki artışa paralel olarak artarken; S ve G₂-M fazındaki hücre oranı azalmıştır. Bu da G₀-G₁'de hücre döngüsünün durduğu ve bu aşamada hücrelerin biriktiğini göstermektedir. Hücrelerin, G₀-G₁'de durgunluğa geçmesi nedeniyle, S ve G₂-M fazındaki hücre sayısı azalmıştır. Bu sonuç bize bergaptolün HeLa hücre hattında hücre döngüsü inhibisyonuna neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.22. HeLa 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Cytophase Violet sonuçları. a. 24 saat kontrol, b. 48 saat kontrol, c. 25 μ M bergaptol uygulaması sonrası 24. saat, d. 25 μ M bergaptol uygulaması sonrası 48. Saat, e. 50 μ M bergaptol uygulaması sonrası 24. Saat, f. 50 μ M bergaptol uygulaması sonrası

48. Saat, g. 100 μ M bergaptol uygulaması sonrası 24. Saat, h. 100 μ M bergaptol uygulaması sonrası 48. Saat. Bergaptol uygulaması sonrası 24. Saatte G_0 - G_1 fazında artış, S ve G_2 -M fazında azalma gerçekleşmiştir. 48 saatte ise G_0 - G_1 fazında kontrole kıyasla çok az artış gerçekleşirken S ve G_2 -M fazında azalma gerçekleşmiştir. Her grupta en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).

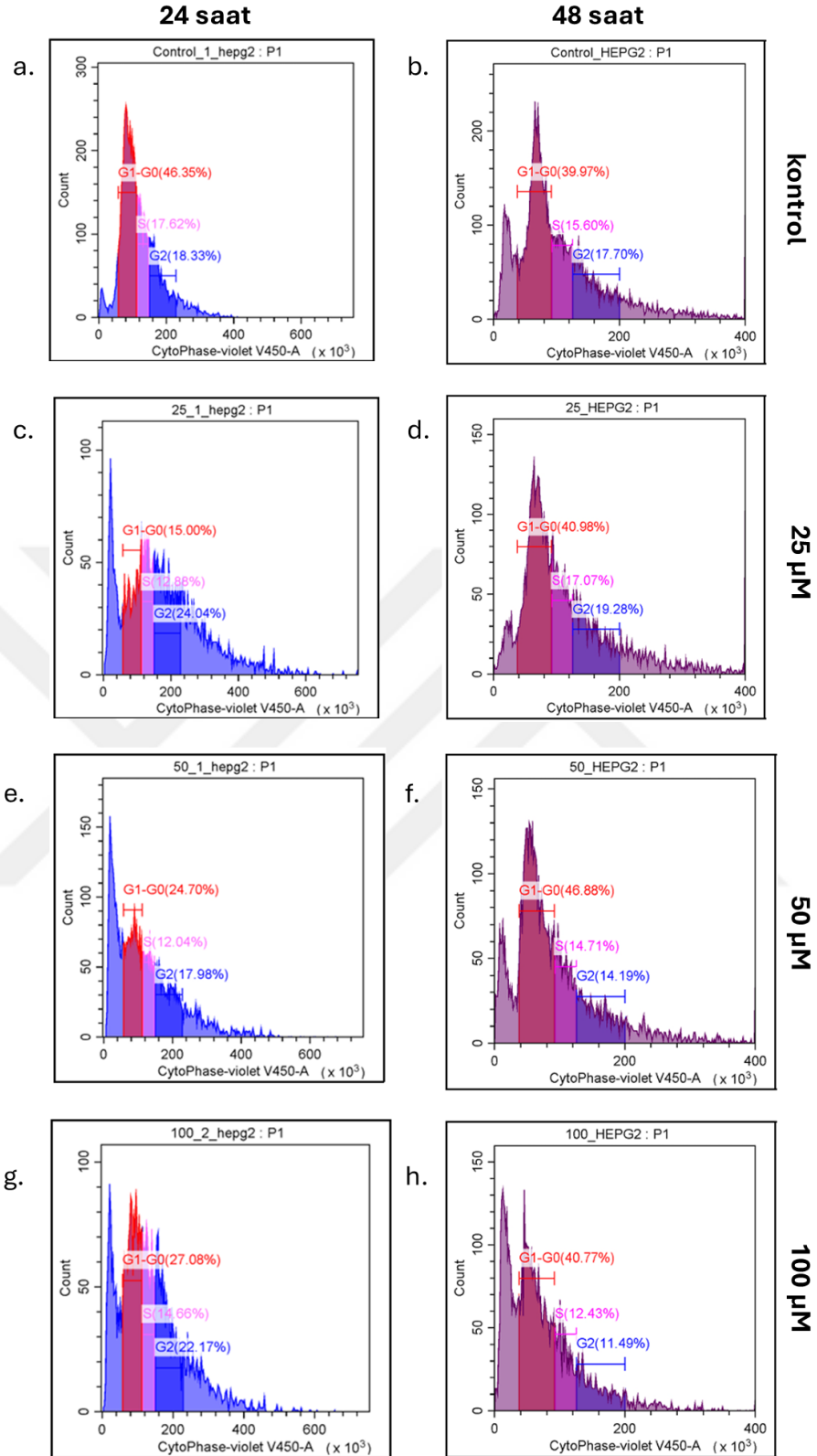
MDA-MB-231 hücre hattında (Şekil 4.23), 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası, G_0 - G_1 'de hücre sayısı azalırken; S ve G_2 -M fazındaki hücre sayısı artmıştır. Bunun aksine, 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası G_0 - G_1 'de hücre sayısı artarken; S ve G_2 -M fazındaki hücre sayısı azalmıştır. Buna göre, bergaptolün uygulama süresindeki artışın, proliferasyonu baskılama yeteneğinde artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır. Çünkü, 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası, hücre döngüsünde ilerlemeye devam eden hücreler; 48 saatlik uygulama sonrası, G_0 - G_1 'de durgunluğa geçmiştir. Bu da tez çalışması kapsamında daha önceki deneysel adımlarda MDA-MB-231 hücre hattından elde edilen verileri desteklemektedir.



Şekil 4.23. MDA-MB-231 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Cytophase Violet sonuçları. a. 24 saat kontrol, b. 48 saat kontrol, c. 25 µM bergaptol uygulaması sonrası 24. saat, d. 25 µM bergaptol uygulaması sonrası

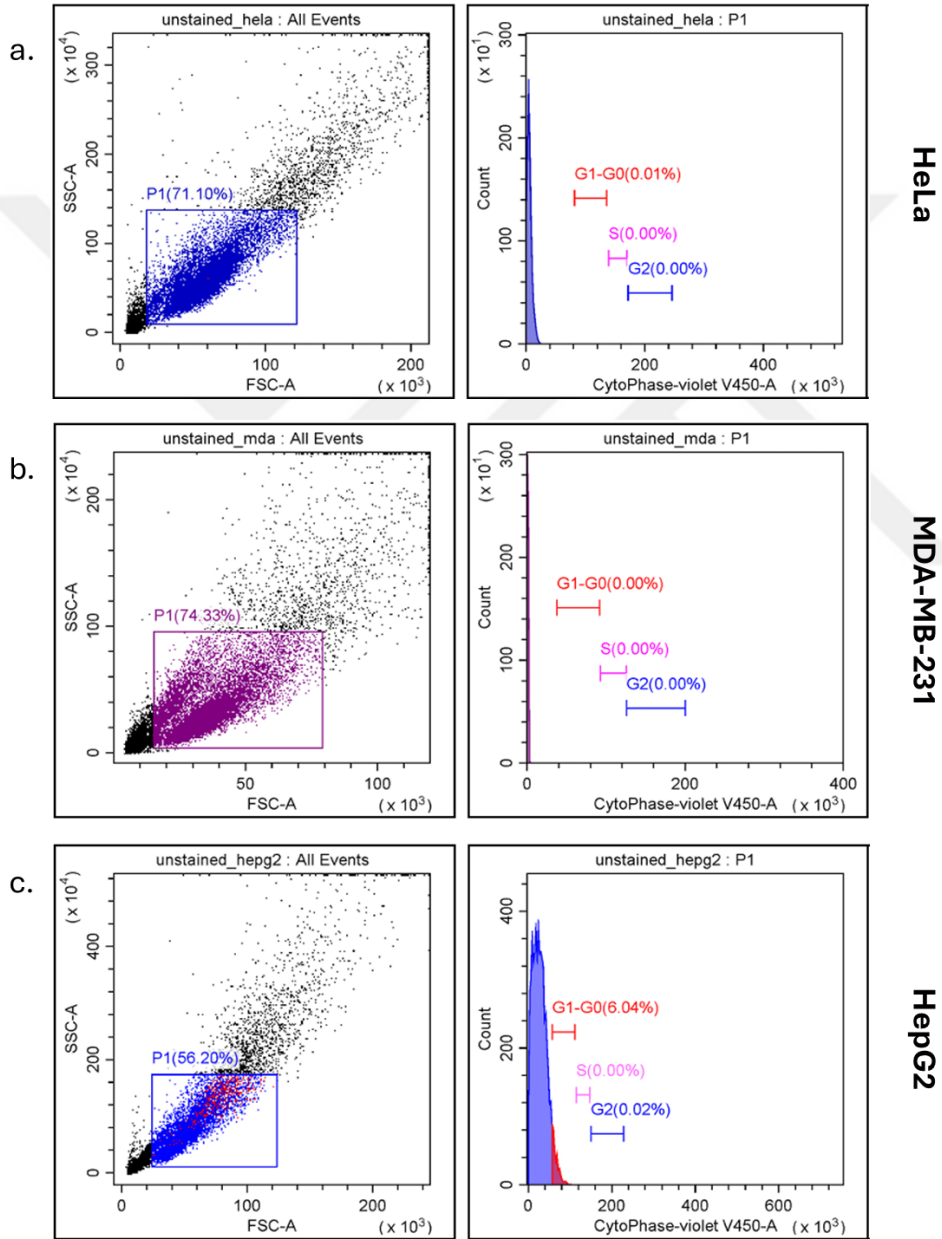
48. Saat, e. 50 μ M bergaptol uygulaması sonrası 24. Saat, f. 50 μ M bergaptol uygulaması sonrası 48. Saat, g. 100 μ M bergaptol uygulaması sonrası 24. Saat, h. 100 μ M bergaptol uygulaması sonrası 48. Saat. Bergaptol uygulaması sonrası 24. saatte G_0 - G_1 fazında azalma, S ve G_2 -M fazında ise artış gerçekleşmiştir. 48. saatte bu etki tersine dönmüş ve G_0 - G_1 azalırken, S ve G_2 -M fazında artış gerçekleşmiştir. Her grupta en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).

HepG2 hücre hattında (Şekil 4.24), 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası G_0 - G_1 ve S'de hücre sayısı azalırken; G_2 -M fazındaki hücre sayısı artmıştır. Bunun aksine 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası G_0 - G_1 'de hücre sayısı artarken; S ve G_2 -M fazındaki hücre sayısı azalmıştır. Bu veriler yorumlandığında, HepG2 hücre hattında 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası bergaptolün proliferasyonu baskılama yeteneğinin arttığı sonucuna varılmıştır.

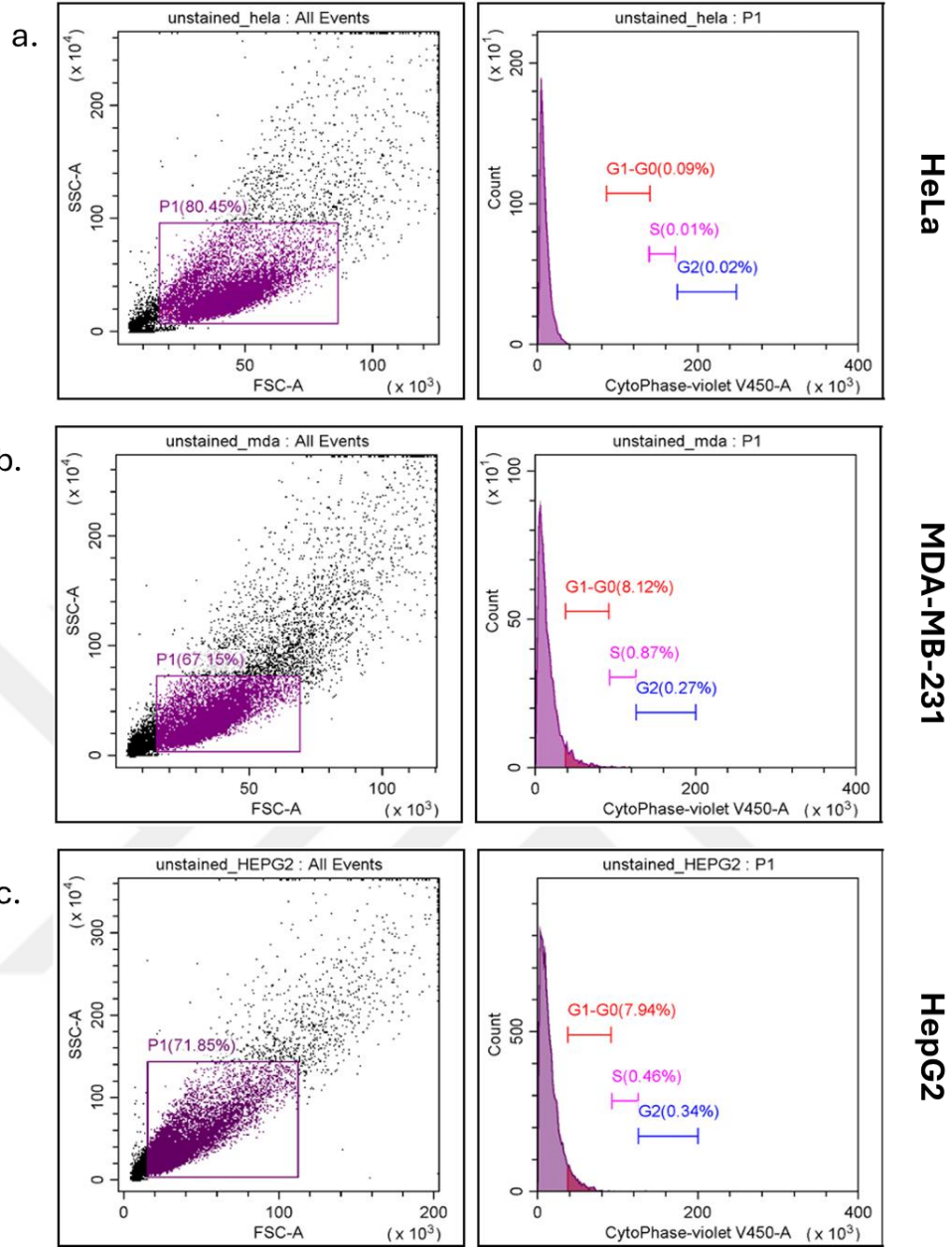


Şekil 4.24. HepG2 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Cytophase Violet sonuçları. a. 24 saat kontrol, b. 48 saat kontrol, c. 25 µM bergaptol uygulaması sonrası 24. saat, d. 25 µM bergaptol uygulaması sonrası 48. Saat, e. 50 µM bergaptol uygulaması sonrası 24. Saat, f. 50 µM bergaptol uygulaması

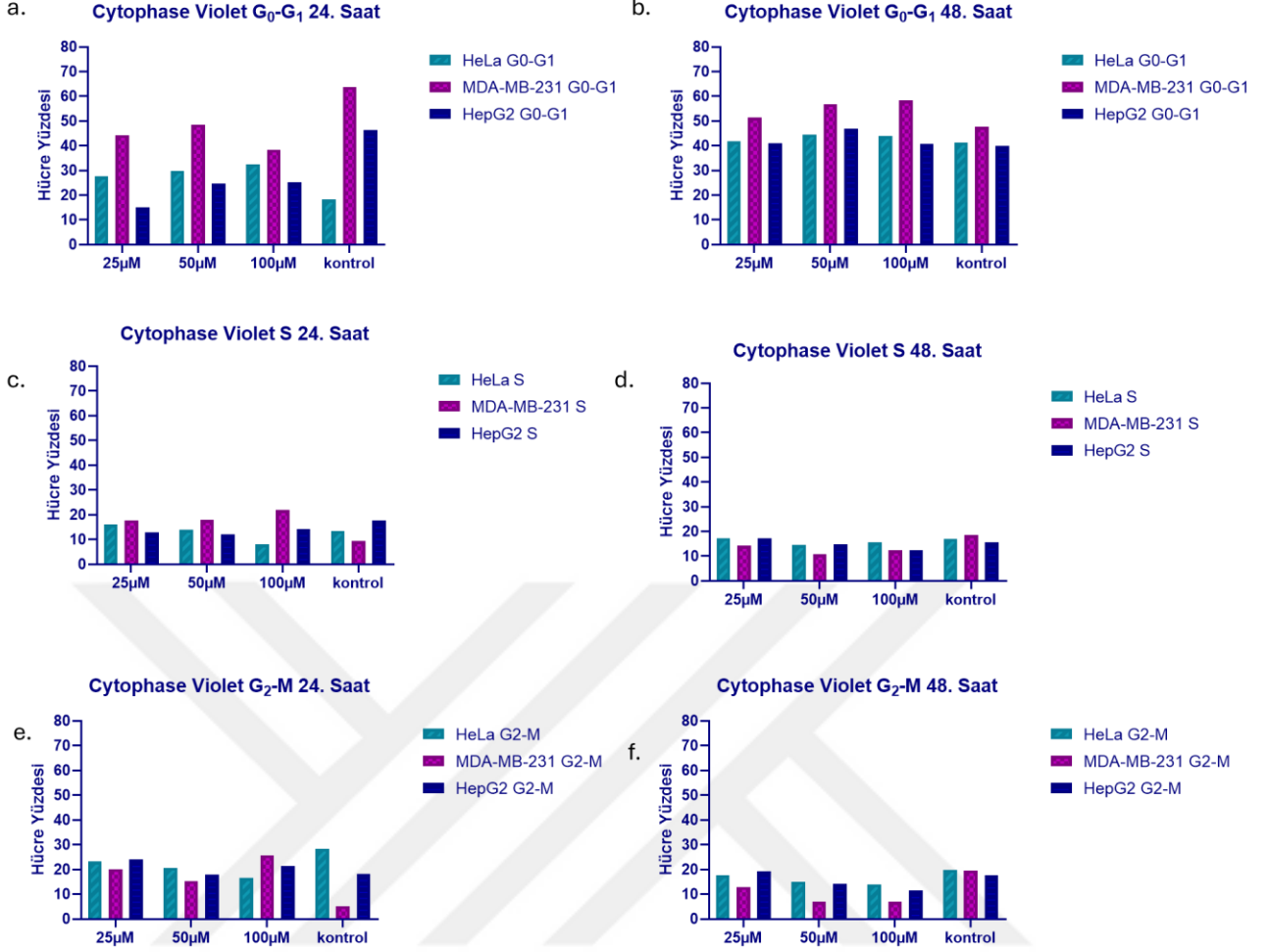
sonrası 48. Saat, g. 100 μ M bergaptol uygulaması sonrası 24. Saat, h. 100 μ M bergaptol uygulaması sonrası 48. Saat. Bergaptol uygulaması sonrası 24. saatte G_0 - G_1 ve S fazındaki hücre sayısı azalırken, G_2 -M fazındaki hücre oranında artış gerçekleşmiştir. 48. Saatte ise G_0 - G_1 artarken, S ve G_2 -M fazındaki hücre oranı azalmıştır. Her grupta en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).



Şekil 4.25. 24. Saat kapılama stratejileri ve unstained verileri. a. HeLa, b. MDA-MB-231, c. HepG2. Her bir hücre için akış sitometrisi ile en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).



Şekil 4.26. 48. Saat kapılama stratejileri ve unstained verileri. a. HeLa, b. MDA-MB-231, c. HepG2. Her bir hücre için akış sitometrisi ile en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).



Şekil 4.27. 24 ve 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası Cytophase Violet tahlili sonuçları. a. 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası kanser hücrelerinde G₀-G₁ fazındaki hücre yüzdeleri. Hela hücre hattında G₀-G₁ fazındaki hücre oranı kontrole kıyasla artarken MDA-MB-231 ve HepG2 hücre hatlarında azalmıştır. b. 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası kanser hücrelerinde G₀-G₁ fazındaki hücre yüzdeleri. Tüm hücre hatlarında G₀-G₁ fazındaki hücre yüzdeleri kontrole kıyasla artmıştır. c. 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası kanser hücrelerinde S fazındaki hücre yüzdeleri. MDA-MB-231 hücre hattında S fazındaki hücre oranı kontrole kıyasla artarken HeLa ve HepG2 hücre hatlarında azalmıştır. d. 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası kanser hücrelerinde S fazındaki hücre yüzdeleri. Tüm hücre hatlarında kontrole kıyasla S fazındaki hücre oranı azalmıştır. e. 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası kanser hücrelerinde G₂-M fazındaki hücre yüzdeleri. MDA-MB-231 ve HepG2 hücre hatlarında G₂-M fazındaki hücre oranları kontrole kıyasla artarken HeLa hücre hattında azalmıştır.

f. 48 saatlik bergaptol uygulaması sonrası kanser hücrelerinde G₂-M fazındaki hücre yüzdeleri. Tüm hücre hatlarında kontrole kıyasla G₂-M fazındaki hücre oranı azalmıştır.

Cytophase Violet sonuçları, hücrelerin özellikle 48 saatlik bergaptol uygulaması sonra G₀-G₁ fazında duraklamaya geçtiğini ve S fazındaki hücre sayılarında, dolayısıyla proliferen olan hücre sayılarında azalmalar olduğunu göstermiştir. Burada; HeLa hücre hattında, hem 24 hem 48 saatlik uygulama sonrasında, hücreler G₀-G₁ fazında birikmeye başlamıştır (**Şekil 4.22**). Bu durum hücrelerde meydana gelen DNA hasarının bir göstergesidir [126]. MDA-MB-231 (**Şekil 4.23**) ve HepG2 (**Şekil 4.24**) hücrelerinde 48 saat bergaptol uygulaması sonrası elde edilen veriler; HeLa'dan elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. Ancak, 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası G₂-M fazında biriken hücre sayısı artmıştır. Bu durumun, DNA replikasyonunda gerçekleşen bir hatadan veya genetik materyaldeki hasardan kaynaklandığı düşünülmektedir [127]. Bu sonuçlar, literatürde farklı furanokumarin bileşikleriyle yapılan benzer çalışmalarla paralellik göstermektedir [128-130]. Issa M. Y. ve ark., tarafından gerçekleştirilen çalışmada HepG2 hücrelerine ksantotoksin uygulaması sonrası G₀-G₁ ve G₂-M fazındaki artışla birlikte hücre döngüsünün durduğu rapor edilmiştir [100]. Tez çalışması kapsamında bergaptol uygulaması sonucu HepG2 hücrelerinden elde ettiğimiz sonuçlarda bu sonuçtan farklı olarak 24. saatte G₂-M fazındaki hücre sayısı artarken, 48. saatte G₀-G₁ fazındaki hücrelerde artış görülmüştür. Wang Y. ve ark., yayınladıkları çalışmada angelicin uygulaması sonrası HeLa hücrelerinde G₀-G₁ fazında artış, G₂-M fazında azalma olduğunu göstermişlerdir [80]. Bu sonuç, HeLa hücrelerine bergaptol uygulaması sonrası elde ettiğimiz sonuçla paralellik göstermektedir. Bir başka çalışmada Li G. ve ark., angelicinin hücre döngüsü üzerindeki etkisini A549 hücreleri üzerinde değerlendirmiş ve G₂-M fazında artış olduğunu rapor etmiştir [131]. Bu, çalışmamız kapsamında MDA-MB-231 ve HepG2 hücrelerine 24 saatlik bergaptol uygulaması sonrası elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Yukarıda sayılan tüm sonuçlar değerlendirildiğinde; furanokumarin bileşiklerinin hücre döngüsünün farklı aşamalarında duraklamaya neden olarak hücre proliferasyonunu baskıladığı sonucuna varılmaktadır. Bu etki uygulama süresine, uygulanan konsantrasyona ve kullanılan hücre hattına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Tez çalışması

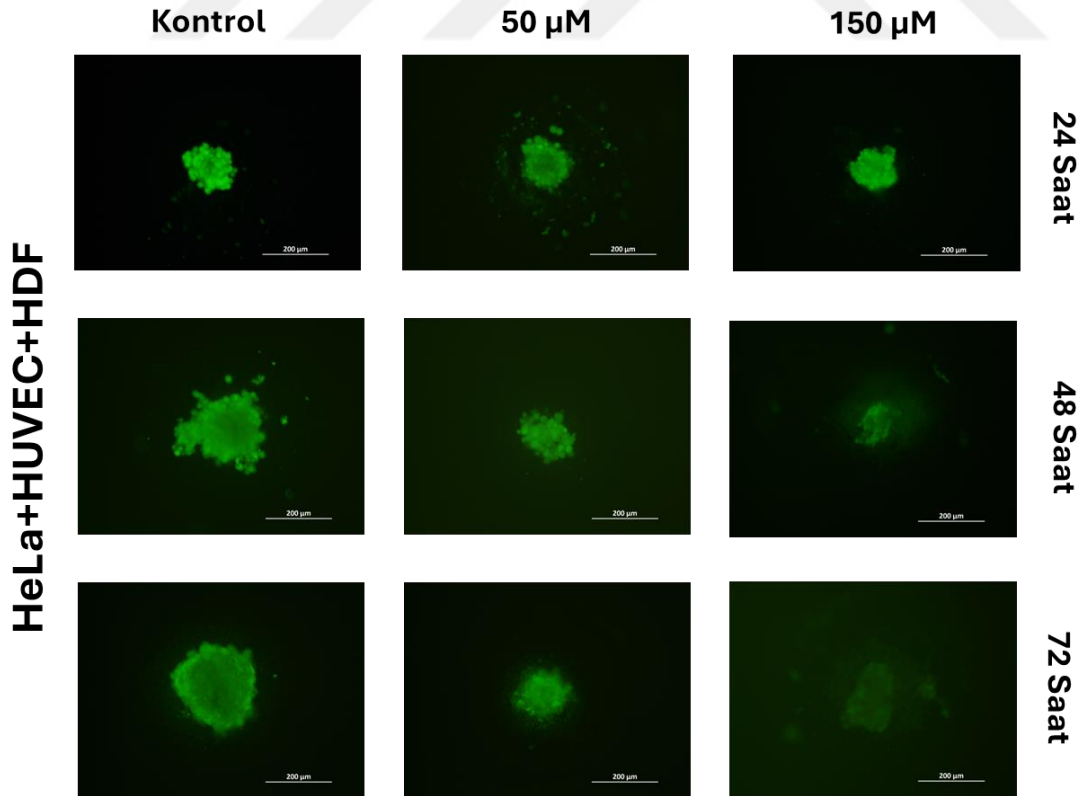
kapsamında bergaptolün de kanser hücre döngüsünü baskılamada önemli bir rol oynadığı gösterilmiş ve ileri çalışmalar için proliferasyonun hedeflenmesinde yüksek potansiyele sahip bir bileşik olduğu ortaya koyulmuştur.

4.4. Sferoidlerin (mikro dokuların) oluşturulması

4.4.1. Mikro Dokularda Hücre Canlılığının Tespiti

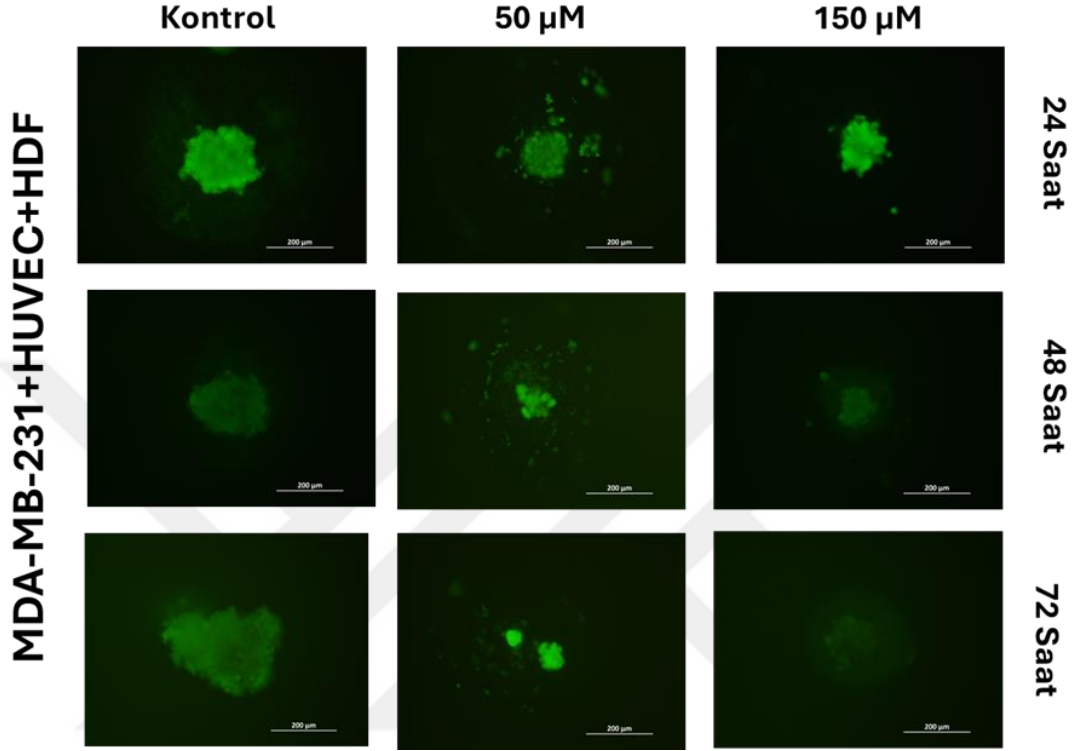
4.1.1.1. Kalsein AM-Propidyum İyodür Boyaması

Mikro dokulara 50 ve 150 μ M'lık bergaptol uygulaması sonrası, canlı ve ölü hücrelerin görüntülenmesi ve sferoid çapındaki değişimin tespiti için kalsein AM-propidyum iyodür boyaması yapılmış, ardından floresan mikroskobu altında hücreler fotoğraflanmıştır. Elde edilen veriler, bergaptol uygulamasının ardından sferoid çapında küçülmeler ve yeşil floresan ışımadaki azalmayla birlikte hücre canlılığında düşüş olduğunu göstermektedir. Özellikle bergaptol uygulamasını takip eden 72. saatte sferoidler parçalanmış, morfolojileri bozulmuş ve çapları küçülmüştür (Şekil 4.28, 4.29, 4.30).

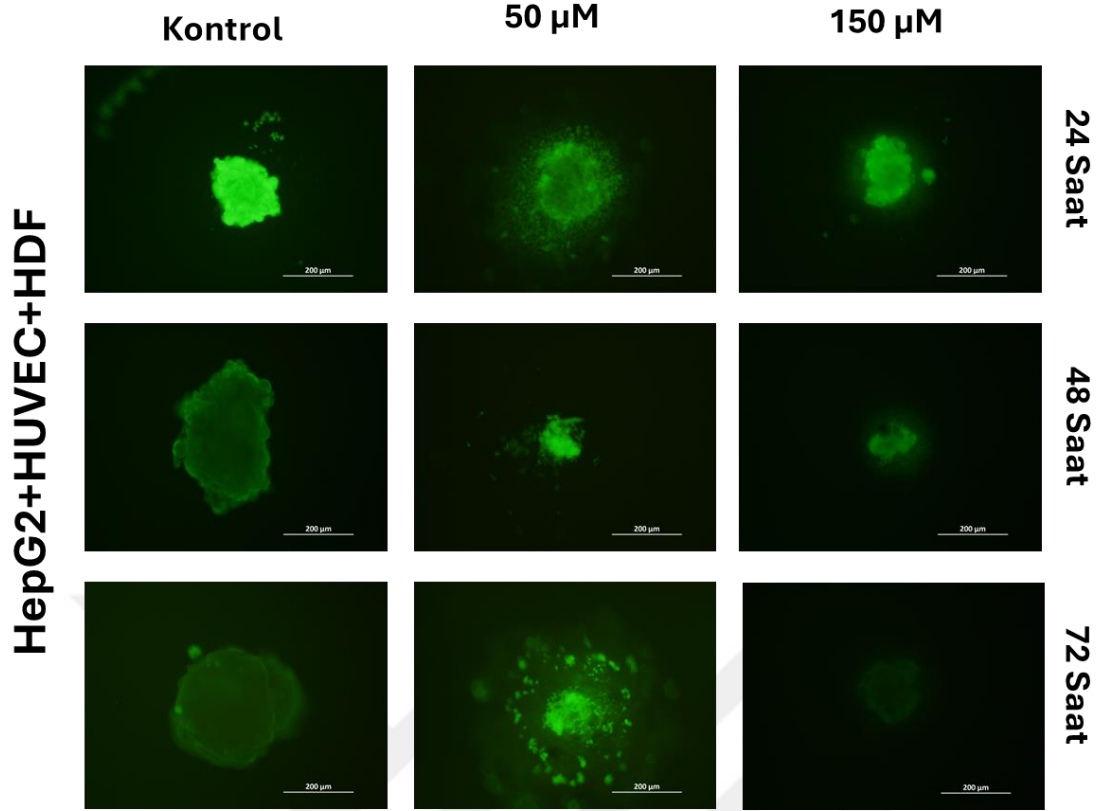


Şekil 4.28. HeLa+HUVEC+HDF hücreleri ile oluşturulan mikro dokuların bergaptol uygulaması öncesi ve sonrası fotoğrafları (OlympusIX70 Mikroskop,

10X, 460-490 nm). Yeşil floresan ışımaya hücre canlılığı ile doğru orantılı artış sergilemektedir. Bergaptol uygulamasının ardından mikro dokuların çapında ve canlılığında azalma görülmektedir. Bu etki özellikle 48 ve 72 saatlik bergaptol uygulamalarından sonra artmıştır.



Şekil 4.29. MDA-MB-231+HUVEC+HDF hücreleri ile oluşturulan mikro dokuların bergaptol uygulaması öncesi ve sonrası fotoğrafları (OlympusIX70 Mikroskop, 10X, 460-490 nm). Yeşil floresan ışımaya hücre canlılığı ile doğru orantılı artış sergilemektedir. Bergaptol uygulamasının ardından mikro dokuların çapında ve canlılığında azalma görülmektedir. Bu etki özellikle 150 µM'lık bergaptol uygulamasının 48. ve 72. saatinde artış göstermiştir.



Şekil 4.30. HepG2+HUVEC+HDF hücreleri ile oluşturulan mikro dokuların bergaptol uygulaması öncesi ve sonrası fotoğrafları (OlympusIX70 Mikroskop, 10X, 460-490 nm). Yeşil floresan ışıma hücre canlılığı ile doğru orantılı artış sergilemektedir. Bergaptol uygulamasının ardından mikro dokuların çapında ve canlılığında azalma tespit edilmiştir. Özellikle 48. saatten sonra ışımadaki ve çaptaki azalma net bir şekilde görülmektedir.

Bergaptol uygulaması sonrası sferoid yapılarındaki değişimler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir:

Hücre Hatları		Sferoid Çapı	Hücre Canlılığı	Sferoid Yapısı
HeLa+HUVEC+HDF	24. Saat	değişmedi	değişmedi	değişmedi
	48. Saat	azaldı	azaldı	dağıldı
	72. Saat	azaldı	azaldı	dağıldı
MDA-MB-231+HUVEC+HDF	24. Saat	azaldı	azaldı	dağıldı
	48. Saat	azaldı	azaldı	dağıldı
	72. Saat	azaldı	azaldı	dağıldı
HepG2+HUVEC+HDF	24. Saat	değişmedi	değişmedi	değişmedi
	48. Saat	azaldı	azaldı	dağıldı
	72. Saat	azaldı	azaldı	dağıldı

Tablo 1. Bergaptol uygulamasına bağlı çok hücreli heterojen kanser mikro dokularındaki değişimler.

Kemoterapi ve radyoterapi, kansere yönelik sıklıkla tercih edilen tedavi yöntemleri olmasına rağmen bu yöntemlerde çeşitli kısıtlamalar bulunmaktadır. Bunlar arasında; her ikisinin de sağlıklı hücrelere zarar vermesinin yanında, kemoterapiye karşı gelişen ilaç direnci yer almaktadır. Bu direnç mekanizmasının gelişmesinde kanser mikro çevresinin karmaşık yapısı büyük rol oynamaktadır [132, 133]. Bu nedenle, kanser tedavisine yönelik *in vitro* çalışmalarda, 2B hücre kültürü çalışmalarına ek, 3B çalışmalara da yer verilerek mikro çevrenin dahil olduğu ortamda analizlerin gerçekleştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Daha önce 3B kültür koşullarında bergaptolün etkinliğine dair bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, tez çalışması kapsamında bergaptolün anti-kanser ve anti-anjiyogenik etkileri, 3B çok hücreli heterojen kanser sferoidleri (mikro dokular) oluşturularak kanser mikro çevresinin dahil olduğu ortamda kalsein AM-PI floresan boyaması yapılarak incelenmiştir. Oluşturulan modelde HDF, HUVEC ve kanser hücrelerinin bir arada kullanılması tümör ortamındaki stromal hücre

yoğunluğunu temsil ederek kanserin ayırt edici özellikleri olan tümör anjiyogenezi ve kanser invazyonunu iyi bir şekilde yansıtmaktadır [134].

Lazzari G. ve ark., pankreas kanseri hücrelerini fibroblast ve endotel hücreleriyle kültürleyerek 3B kültür koşullarında oluşturulan heterojen sferoidlerin mikro çevreyi taklit etmedeki başarısını değerlendirmiş ve oluşturulan modelin ilaç direncini taklit etmede oldukça başarılı olduğunu göstermiştir [135]. Bergaptolün etkinliğinin 3B hücre kültürü koşullarında değerlendirilmemesine rağmen başka bir furanokumarin olan notopterolün etkinliği HepJ5 ve Mahlavu karaciğer kanseri hücre hatlarından oluşturulan sferoidler üzerinde değerlendirilmiş ve uygulamaya bağlı olarak sferoid sayısı ve çapında azalmalar olduğu rapor edilmiştir [136]. Tez çalışması kapsamında oluşturulan çok hücreli kanser mikro dokularında da benzer sonuçlar gözlemlenmiştir.

Kalsein asetometoksi (kalsein AM), hücre zarına geçirgen floresan olmayan bir boyadır. Bu boya hücre içine girdiğinde, esteraz aktivitesiyle yeşil floresan özellik kazanarak geçirgenliğini kaybeder. Ölü hücreler boyayı tutamadığı için yalnızca canlı hücrelerde yüksek yeşil floresan sinyal verir [137]. Tez kapsamında mikro dokulardaki canlılığı analiz edebilmek için bu yöntemden yararlanılmıştır. Kim S. M. ve ark tarafından 2015 yılında yayınlanan çalışmada simvastatin ve bergamottinin insan kronik miyeloid lösemisi üzerinde kombine tedavisinin kalsein ile boyanan canlı hücre sayısında azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir [113]. Shi G. Z. ve ark., tarafından bitkisel bir bileşik olan *psoralea corylifolia* L.'nin etkinliği HepaRG hücrelerinden oluşturulan sferoidler üzerinde değerlendirilmiş ve bileşik uygulanan grupta kalsein ışımalarının azaldığı görülmüştür [138]. Tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz sonuçlarda da bergaptol uygulamasına bağlı olarak kalsein ışımada ve sferoid çaplarında azalmalar gözlemlenmiştir. Aynı zamanda bergaptolün 8 saatlik yarılanma ömrüne rağmen 48 ve 72 saatlik bergaptol uygulamalarından sonra sferoid çapı ve canlılığı baskılanmıştır. Burada gözlemlenen etkin hücre ölümü bergaptolün etkin madde miktarı yarılsa da sferoid yapılarındaki hücrelerin canlılığını baskılamaya devam ettiğini göstermektedir. Buna göre; 2B kültür koşullarında toksik etki gösteren bergaptol bileşiğinin, özellikle yüksek konsantrasyonlarda 3B kültür koşullarında daha komplike ve heterojen hücre topluluğunun olduğu mikro dokularda da toksik etkiye neden olduğu ortaya konulmuştur. 3B kültür

koşullarında oluşturulan çok hücreli mikro dokuların, *in vivo* ortamı simüle etmede başarılı modeller olması nedeniyle; buradan elde ettiğimiz sonuçlar bergaptolün anti-kanser etkisi hakkında dikkate değer verilere sahip olmamızı sağlamaktadır. Bergaptol uygulaması sonrası sferoid çapında azalma ve yapısında bozulmalar gözlemlenmiştir. Bu durum yapılacak ileri çalışmalarda metastatik belirteçler (kadherinler, selektin, integrin, MMP-2/9 vb.) yönünden incelenebilir ve böylece burada meydana gelen sferoid parçalanmasının metastaza yol açıp açmayacağı araştırılabilir [139].

Mikro dokulardan elde edilen tüm sonuçlar yorumlandığında; bergaptol, kanser hücrelerinde toksik etkiye neden olduğu gibi kanser mikro çevresinin dahil olduğu ortamda da toksik etki gösterme yeteneğine sahiptir. Özellikle ilaç direncini yenmek adına, diğer kemoterapötikler ve bergaptolün kombine kullanımı; kanser mikro çevresinden kaynaklanan direncin önüne geçebilmek için yenilikçi bir tedavi yaklaşımı olarak nitelendirilebilir.

4.5. Endotel Hücrelerinin Takibi

CFSE işaretli HUVEC'ler, kanser hücreleri ve fibroblastlar ile oluşturulan mikro dokularda; bergaptolün HUVEC'ler üzerindeki etkinliği ile ilgili çalışmalar ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.5.1. Endotel hücrelerinin CFSE işaretlenmesi ve anjiyogenezin incelenmesi

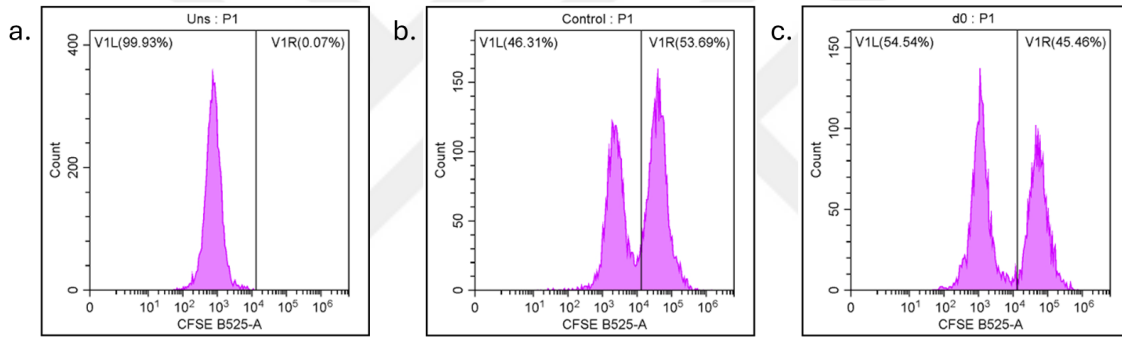
Tez kapsamında gerçekleştirilen daha önceki deneysel sürecin tümü analiz edildiğinde bergaptolün en etkin olduğu kanser hücresi HeLa olarak belirlenmiştir. Bu nedenle mikro dokularda kullanılacak kanser hücresi HeLa hücre hattı olarak belirlenmiş ve devam eden deneysel çalışmalarda kanser hücresi olarak HeLa hücreleri kullanılmıştır.

4.5.1.1. CFSE işaretli hücrelerin akış sitometrisi ile tespit edilmesi

Hela, HUVEC ve HDF hücrelerinin birlikte kültürlenerek çok hücreli mikro dokuların oluşturulma aşamasında HUVEC hücreleri daha sonra tespit edilebilmeleri için CFSE ile işaretlenmiş ve hücreler sferoid oluşturmaları için mikro doku oluşturma protokolünde belirtilen oranlarda karıştırılmıştır. Gruplar

HUVEC işaretlemesi yapılmamış grup, kontrol ve bergaptol uygulama grubu olarak 3'e ayrılmıştır.

Elde edilen veriler, normal koşullarda hiçbir uygulama yapılmayan bir kanser mikro dokusu içerisinde HUVEC miktarının %53,69 olduğunu göstermektedir (Şekil 4.30b.). Bu oran bergaptol uygulamasının ardından %45,46'ya düşmüştür (Şekil 4.30a.). Bu da CFSE işaretli hücre oranının %8,23 azaldığını göstermektedir (**Şekil 4.31**). Bu sonuca göre mikro dokulardaki hücre topluluklarının içerisinde bulunan endotel oranı kontrole kıyasla azalma göstermiştir. Buradaki azalma bundan önce endotel hücrelerinden elde edilen sonuçlarla tutarlılık göstermektedir fakat az da olsa 2B kültür koşullarından elde edilen sonuca göre bir direnç geliştiği görülmektedir.



Şekil. 4.31. CFSE işaretli hücrelerin akış sitometri sonuçları. Analizler akış sitometrisi ile totalde 10.000 hücre sayılarak gerçekleştirilmiştir (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer). a. Unstained; işaretlenmemiş HUVEC'lerin olduğu grubu ifade etmektedir. Bu grup boyanın çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için oluşturulmuştur. b. Kontrol; işaretli HUVEC'lerin normal koşullarda bir sferoid içerisindeki miktarını ifade etmektedir c. Bergaptol uygulama grubu; bergaptol uygulaması sonrası işaretli HUVEC'lerin miktarındaki değişimi ifade etmektedir. Her grupta en az 15.000 hücre sayılmıştır (Beckman Coulter Life Sciences, CytoFLEX LX Flow Cytometer).

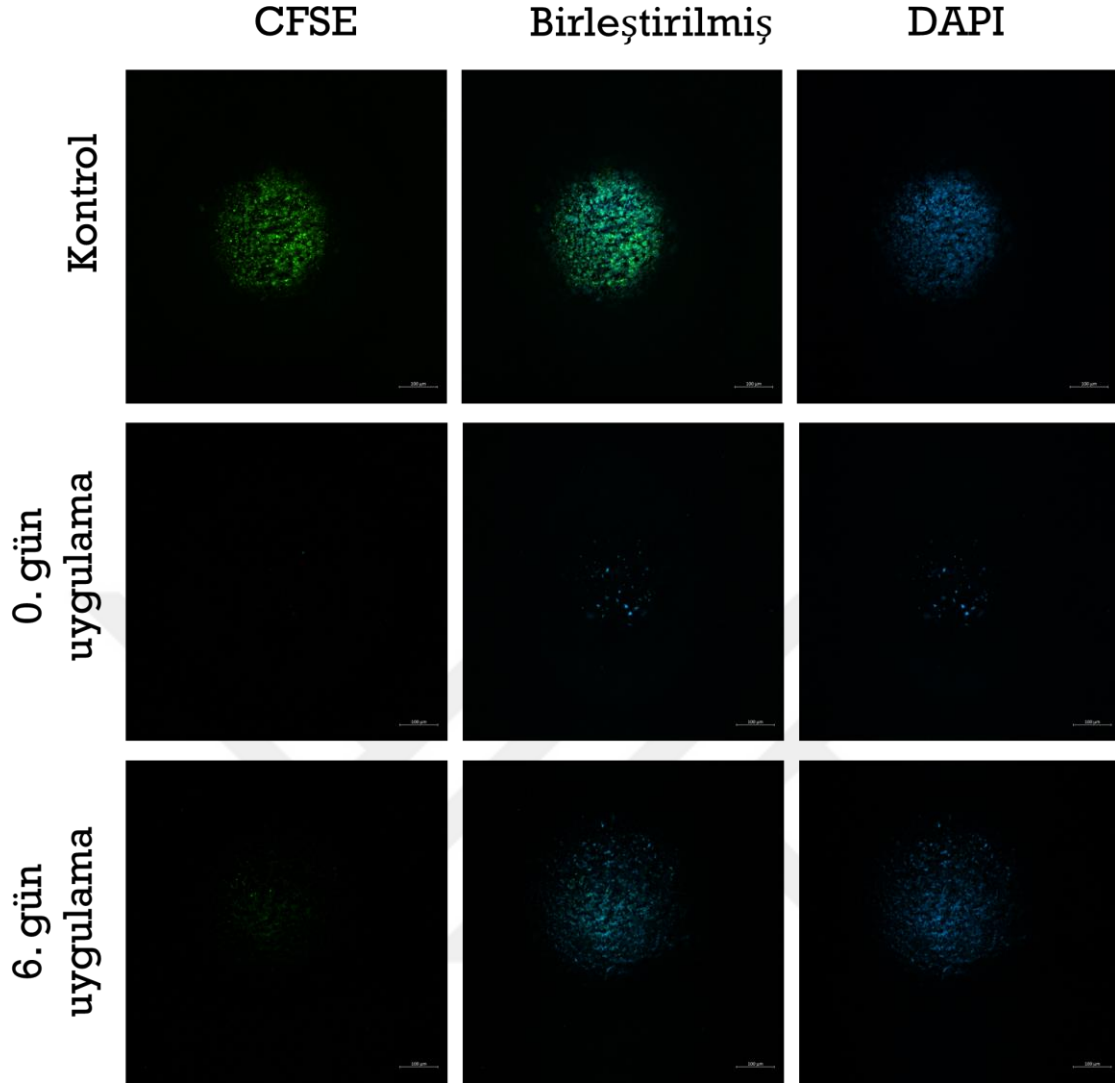
4.5.1.2. CFSE işaretli hücrelerin konfokal mikroskopi ile tespit edilmesi

Çalışmamız kapsamında bergaptolün anjiyogenez üzerindeki etkinliğini değerlendirmek amacıyla CFSE işaretli HUVEC hücrelerinin dahil olduğu çok

hücreli heterojen kanser mikro dokuları oluşturulmuş ve bergaptol uygulaması sonrası işaretli hücre oranındaki değişimler konfokal mikroskopi ile görüntülenmiştir. Deney grupları; 0. gün (hücre ekiminin gerçekleştirildiği gün) bergaptol uygulanan grup ve 6. gün (analizden 24 saat önce) bergaptol uygulanan grup olarak ikiye ayrılmıştır.

Konfokal mikroskopi ile hücreler görüntülenmeden hemen önce tüm sferoidler DAPI (mavi floresan) çekirdek boyasıyla boyanmış ve böylece tüm hücre popülasyonu içerisinde CFSE (yeşil floresan) işaretli endotel hücre popülasyonu görüntülenebilmiştir.

Analiz sonucu konfokal mikroskopiden elde edilen görüntüler incelendiğinde; kontrolde yüksek oranda var olan endotel popülasyonunun uygulama gruplarında oldukça azaldığı görülmektedir (**Şekil 4.32**). Özellikle hücre ekiminin gerçekleştirildiği 0. günde bergaptol uygulaması yapılan grupta sferoid yapısının düzgün şekilde oluşmadığı ve endotel hücrelerin tamamen öldüğü görülmektedir. Buna kıyasla; görüntülenmeden 24 saat önce bergaptol uygulanan 6. gün uygulama grubunda az da olsa endotel hücreleri varlığını korumakta ve diğer hücrelerin popülasyonu da 0. güne göre canlılığını korumaktadır. Burada yine önceki deneylerden elde edilen sonuçlarda olduğu gibi uygulama süresindeki artışın hücre canlılığında azalmaya neden olduğu görülmektedir.



şekil 4.32. Konfokal mikroskopisi görüntüleri (Zeiss LSM980, kofokal/multifoton mikroskop, 10X). Yeşil ile ifade edilen hücre topluluğu HUVEC'leri, mavi ile ifade edilen hücre topluluğuysa HUVEC+HDF+HeLa'yı kapsayan tüm hücreleri ifade etmektedir. Bergaptol uygulaması sonrası hem HUVEC oranında hem de total hücre popülasyonunda azalma olduğu gerçekleşmiştir.

Anjiyogenez, kanser hücrelerinin gelişimi ve metastatik bir profil kazanması için oldukça önemli bir parametredir [140, 141]. Bu nedenle, kansere karşı tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde anjiyogenezi baskılayanın hedeflenmesi de büyük önem taşımaktadır [142]. Amann A. ve ark., tarafından gerçekleştirilen çalışmada; kanser, fibroblast ve endotellerin birlikte kültüre edilmesiyle oluşturulan çok hücreli mikro dokuların, anjiyogenezin hedeflenmek istediği ilaç çalışmalarında iyi bir model sergilediği rapor edilmiş ve ayrıca bu 3 hücre hattının

birlikte kültürlenmesiyle oluşturulan mikro dokuda, kanser hücresinin çok daha agresif bir fenotip sergilediği ve fibroblastların düzensiz bir forma bürünerek kanserle ilişkili fibroblastlara dönüştüğü tespit edilmiştir [143]. Bu nedenle oluşturduğumuz model bergaptolün endoteller üzerindeki *in vivo* etkinliğini anlayabilmemiz için kıymetlidir. Literatürde, çeşitli furanokumarinlerin anjiyogenez üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur [101, 115]. Ancak, bergaptolün anjiyogenez üzerinde etkilerini rapor eden herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu alanda literatüre veri sağlayarak gelecek çalışmalara kaynak sağlamak adına, çalışmamız kapsamında çok hücreli heterojen kanser mikro dokuları oluşturarak, bergaptol uygulaması sonrası endotel hücre oranındaki azalma akış sitometrisi ve konfokal mikroskopi kullanılarak analiz edilmiştir. Sferoid oluşumunda kullanılan HeLa, MDA-MB-231, HepG2, HUVEC ve HDF hücrelerinin ikilenme zamanları HeLa hücrelerinde 18-24 saat, MDA-MB-231 hücrelerinde 24-30 saat, HepG2 hücrelerinde 24-48 saat, HUVEC hücrelerinde ise 24-36 saat aralığındadır [108-110]. Bu durum çok hücreli heterojen kanser mikro dokularında bergaptol uygulaması sonrası HeLa+HUVEC+HDF ile oluşturulan sferoid yapılarının daha önce etkilenmesine sebep olmuştur.

Konfokal mikroskopi, özellikle karmaşık yapıları örneklerden 3 boyutlu yüksek çözünürlüklü görüntüler elde etmek amacıyla kullanılan bir ışık mikroskopisi tekniğidir [144]. Ghosh ve ark. 2007 yılında yayınladıkları çalışmada, endotel ve kanser hücresiyle oluşturdukları sferoidleri konfokal mikroskopi yardımıyla görüntülemiş ve endotel/kanser hücresi dağılımını bu şekilde gözlemleyebilmiştir [145]. Baru A. ve ark., ise oluşturdukları çok hücreli sferoidlerde kanser hücrelerini mavi, endotel hücrelerini yeşil, fibroblastları ise kırmızı floresan ile işaretleyerek lokalizasyonlarını konfokal mikroskopide görüntülemişlerdir [146]. Bu ve bunun gibi çalışmalardan anlaşılacağı üzere; bir hücrenin floresan işaretlenip diğer hücrelerle ortak kültürlenerek oluşturdukları sferoid yapılarında, hücreleri ayrı ayrı görüntüleyebilmek için konfokal mikroskopi avantajlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda, HUVEC hücrelerini floresan işaretleyerek oluşturduğumuz çok hücreli kanser mikro dokularında, bergaptol uygulaması sonrası floresan işaretli hücre sayılarındaki azalmalar konfokal mikroskopi yardımıyla gözlemlenebilmiştir (**Şekil 4.32**). Hücre ekiminin

gerçekleştirildiği ilk gün bergaptol uygulanan grupta görüntüleme yapıldığında, HUVEC oluşumunun tamamen baskılandığı ve hiç işaretli hücre kalmadığı görülürken; görüntülemeden 24 saat önce bergaptol uygulanan grupta, işaretli hücre oranı kontrole kıyasla ciddi oranda azalmıştır. Bu sonuç, bergaptolün hem yeni HUVEC oluşumunu engellediğini hem de var olan HUVEC'lerin ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz veriler akış sitometrisi sonuçlarından elde edilen bulgulardaki işaretli hücre oranındaki azalmayla da desteklenmiştir (**Şekil 4.31**). Kanseri mikro çevresinin dahil olduğu ve *in vivo* ortama en yakın sonuçları alabileceğimiz *in vitro* platform olan 3B hücre kültürü koşullarından elde ettiğimiz bu sonuçlar; kanser anjiyogenezinin hedeflenmesi için bergaptolün yüksek potansiyelli bir ajan olduğunu göstermektedir.



5. YORUM

1. Bergaptolün; kanser hücreleri, endotel hücresi ve fibroblast hücresi üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analizi ile değerlendirilmiş ve ardından görsel olarak canlı/ölü hücre oranının tespiti için AO/PI floresan boyaması yapılmıştır. Sonuçlar, bergaptolün kanser hücrelerinde ve endotel hücresinde artan konsantrasyon ve uygulama süresine bağlı olarak toksik etkiye neden olduğunu göstermektedir. Bunun yanında, fibroblast hücrelerinde herhangi bir toksik etkiye rastlanmamıştır. Bu sonuçlara göre; bergaptolün hem kanser hücresinde hem de kanser mikro çevresinin önemli bir elemanı olan endotel hücresinde toksik etkiye neden olmasına rağmen sağlıklı hücrelerde toksik etki göstermemesi kansere yönelik ilaç geliştirme çalışmaları açısından yüksek potansiyele sahip bir bileşik olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçların, bergaptolün kanser araştırmalarında kullanımının potansiyel etkinliği ile ilgili literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.
2. MTT ve AO/PI analizleri sonucu etkinliği belirlenen bileşiğin, mekanizmasını daha iyi anlamak için hücre apoptozu ve hücre döngüsü inhibisyonunu değerlendiren çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan ilki, kanser hücreleri ve endotel hücresinde, farklı konsantrasyon ve saatlerde bergaptol uygulaması sonrası; hücrelerde meydana gelen apoptoz miktarındaki değişimlerin analiz edildiği Annexin V/PI deneyleridir. Bu deneyin sonuçları, çalışmamızda kullanılan tüm kanser hücre hatlarında ve endotel hücrelerinde bergaptolün apoptotik etkiye neden olduğunu göstermiştir. Bir diğer çalışma, bergaptol uygulaması sonrası S fazına geçen hücre miktarının analiz edildiği BrdU immünohistokimyasal boyamasıdır. Bu deneyden elde edilen veriler, bergaptol uygulaması sonrası S fazına geçen, yani proliferasyon yapan hücre sayısının önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. Yine, bergaptolün hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir diğer çalışma da cytophase violet kullanılarak hücre döngüsünün çeşitli aşamalarındaki değişimlerin analiz edildiği çalışmadır. Bu çalışmanın sonucunda, bergaptol uygulaması

sonrasında kanser hücrelerinin, uygulama süresine bağlı olarak; G₀-G₁ fazında birikmeye başladığı ve hücre döngüsünün bloke olduğu görülmüştür. Bu da bergaptolün kanser hücrelerinde DNA hasarına yol açtığını göstermektedir. Tüm bu sonuçlara göre, bergaptolün kanser hücreleri üzerinde hem apoptotik hem de anti-proliferatif etkiye neden olduğu doğrulanmıştır. Bu sonuçların; bergaptol bileşiğinin kanser hücreleri ve endotel hücresi üzerinde gösterdiği toksik etkinin mekanizmasının aydınlatılması adına literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

3. Çalışmamızın önceki adımlarında 2B hücre kültürü koşullarında etkinliği gösterilen bergaptol bileşiğinin, kanser mikro çevresinin de dahil olduğu ve *in vivo* ortama yakın sonuçlar alabileceğimiz, komplike bir kanser mikro dokuları üzerindeki etkilerini analiz edebilmek için; ileri çalışmalarda, çok hücreli heterojen kanser mikro dokuları oluşturulmuştur. Mikro dokuların oluşturulmasında, kanser hücrelerinin yanı sıra; kanser mikro çevresine dahil olan hücrelerden, fibroblastlar ve endotel hücreleri de kullanılmıştır. Oluşturulan mikro dokulara bergaptol uygulaması sonrası, Kalsein AM-PI boyaması yapılmış ve sferoid çaplarında küçülmeler gözlemlenmiştir. Bu da bergaptolün, tek bir kanser hücresi üzerindeki etkinliğinin yanı sıra daha komplike bir sferoid yapısında da toksik etkiye neden olarak, hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir. Bergaptolün etkinliğinin, daha önce 3B kültür koşullarında değerlendirilmemesi nedeniyle; çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların bu alanda gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalar için literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

4. Çalışmamızın bir sonraki adımında; kanserde anjiyogenezin önemini göz önünde bulundurarak, oluşturduğumuz mikro dokulardaki endotel hücreleri işaretlenmiş ve bergaptol uygulaması sonrası bu endotel hücre oranlarındaki değişimler hem akış sitometrisi hem de konfokal mikroskopi yardımıyla değerlendirilmiştir. Sonuçlar, bergaptol uygulaması sonrası, endotel hücre oranında azalmalar olduğunu göstermektedir. Daha önce

hem 2B hem de 3B hücre kültürü koşullarında, bergaptolün anjiyogenez üzerine etkilerinin değerlendirilmemiş olması nedeniyle, bulgularımızın hem kanser anjiyogenezi üzerine gerçekleştirilecek çalışmalara, hem de diğer anjiyogenez çalışmalarına kaynak sağlayarak literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

5. **Tüm bu sonuçlar**, bergaptol bileşiğinin; kanser hücrelerinde apoptozu indüklemeye ve hücre proliferasyonunu inhibe edebilme yeteneğinde olduğunu ve böylece kanser karşıtı bir profil sergilediğini göstermektedir. Aynı zamanda, endotel hücreleri üzerinde gösterdiği toksik etki de göz önünde bulundurulduğunda; kansere karşı anjiyogenezi hedefleme çalışmalarında da kullanılabilecek bir bileşik olduğu açıkça görülmektedir. Bu tez çalışmasından elde edilen verilerin, bergaptol bileşiği kullanılarak kansere karşı geliştirilebilecek kombine tedavi stratejileri ve ilaç geliştirme çalışmalarına ışık tutarak literatüre katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sumorek-Wiadro, J., et al., *Furanocoumarins in anticancer therapy–For and against*. Fitoterapia, 2020. **142**: p. 104492.
2. Rodrigues, J.L. and L.R. Rodrigues, *Biosynthesis and heterologous production of furanocoumarins: perspectives and current challenges*. Natural Product Reports, 2021. **38**(5): p. 869-879.
3. Ahmed, S., et al., *Anticancer potential of furanocoumarins: mechanistic and therapeutic aspects*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(16): p. 5622.
4. Ge, Z.-C., et al., *Antitumor and apoptotic effects of bergaptol are mediated via mitochondrial death pathway and cell cycle arrest in human breast carcinoma cells*. ||| Bangladesh Journal of Pharmacology, 2016. **11**(2): p. 489-494.
5. Deo, S., J. Sharma, and S. Kumar, *GLOBOCAN 2020 report on global cancer burden: challenges and opportunities for surgical oncologists*. Annals of surgical oncology, 2022. **29**(11): p. 6497-6500.
6. Dabo-Trubelja, A. and V. Gottumukkala, *Review of cancer therapies for the perioperative physician*. Perioperative Medicine, 2023. **12**(1): p. 1-12.
7. Ahn, J., et al., *3D microengineered vascularized tumor spheroids for drug delivery and efficacy testing*. Acta Biomaterialia, 2023. **165**: p. 153-167.
8. Li, H., X. Fan, and J. Houghton, *Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer*. Journal of cellular biochemistry, 2007. **101**(4): p. 805-815.
9. Atat, O.E., et al., *3D modeling in cancer studies*. Human Cell, 2022: p. 1-14.
10. Albini, A., et al., *Cancer prevention by targeting angiogenesis*. Nature reviews Clinical oncology, 2012. **9**(9): p. 498-509.
11. Hung, W.-L., J.H. Suh, and Y. Wang, *Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit*. Journal of food and drug analysis, 2017. **25**(1): p. 71-83.
12. Chen, C., Z.-B. Tang, and Z. Liu, *Recent advances in the synthesis and applications of furocoumarin derivatives*. Chinese Chemical Letters, 2023. **34**(9): p. 108396.

13. Kotaka, Y., M. Nakajima, and T. Nemoto, *Collective Synthesis of Furanocoumarin Natural Products Through a Radical-mediated Construction of Furanocoumarin Skeletons*. Asian Journal of Organic Chemistry, 2024: p. e202400277.
14. Ebrahimi, A., et al., *Furanocoumarins from Heracleum persicum L.: Unveiling their biosynthesis and gene expression*. Industrial Crops and Products, 2023. **203**: p. 117160.
15. Del Río, J.A., et al., *Furanocoumarins: Biomolecules of therapeutic interest*. Studies in Natural Products Chemistry, 2014. **43**: p. 145-195.
16. Kreidl, M., et al., *Determination of phototoxic furanocoumarins in natural cosmetics using SPE with LC-MS*. Analytica chimica acta, 2020. **1101**: p. 211-221.
17. Shtratnikova, V.Y., *Furanocoumarins: History of Research, Diversity, Synthesis, Physiological Role in the Plant, and Medical Application*. Russian Journal of Plant Physiology, 2023. **70**(7): p. 169.
18. Wu, J., et al., *Bergaptol alleviates LPS-induced neuroinflammation, neurological damage and cognitive impairment via regulating the JAK2/STAT3/p65 pathway*. Journal of Inflammation Research, 2022: p. 6199-6211.
19. Ren, Y., et al., *A review of the pharmacological properties of psoralen*. Frontiers in Pharmacology, 2020. **11**: p. 571535.
20. Liang, Y., et al., *Bergapten: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity*. Phytotherapy Research, 2021. **35**(11): p. 6131-6147.
21. Deng, M., et al., *Imperatorin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics*. European journal of pharmacology, 2020. **879**: p. 173124.
22. Jiang, T., et al., *Bergaptol, a mechanism-based inactivator of CYP2C9*. Medicinal Chemistry Research, 2020. **29**: p. 1230-1237.
23. Yang, Y.-F., et al., *Simultaneous assessment of absorption characteristics of coumarins from Angelicae Pubescentis Radix: In vitro transport across Caco-2 cell and in vivo pharmacokinetics in rats after oral administration*. Journal of Chromatography B, 2017. **1060**: p. 308-315.

24. Abegaz, B.M., et al., *Prenylated flavonoids, monoterpenoid furanocoumarins and other constituents from the twigs of Dorstenia elliptica (Moraceae)*. *Phytochemistry*, 2004. **65**(2): p. 221-226.
25. Phucharoenrak, P. and D. Trachootham, *Bergaptol, a Major Furocoumarin in Citrus: Pharmacological Properties and Toxicity*. *Molecules*, 2024. **29**(3): p. 713.
26. Shen, C.-Y., et al., *Bergaptol from blossoms of Citrus aurantium L. var. amara Engl inhibits LPS-induced inflammatory responses and ox-LDL-induced lipid deposition*. *Food & function*, 2020. **11**(6): p. 4915-4926.
27. Myung, K., J.A. Manthey, and J.A. Narciso, *Aspergillus niger metabolism of citrus furanocoumarin inhibitors of human cytochrome P450 3A4*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2008. **78**(2): p. 343-349.
28. Messer, A., et al., *Major furocoumarins in grapefruit juice II: phototoxicity, photogenotoxicity, and inhibitory potency vs. cytochrome P450 3A4 activity*. *Food and chemical toxicology*, 2012. **50**(3-4): p. 756-760.
29. Bitterling, H., et al., *Photo-protective effects of selected furocoumarins on β -pinene, R-(+)-limonene and γ -terpinene upon UV-A irradiation*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2022. **424**: p. 113623.
30. Sung, H., et al., *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2021. **71**(3): p. 209-249.
31. Sarkar, S., et al., *Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview*. *International journal of molecular sciences*, 2013. **14**(10): p. 21087-21113.
32. Bold, R.J., P.M. Termuhlen, and D.J. McConkey, *Apoptosis, cancer and cancer therapy*. *Surgical oncology*, 1997. **6**(3): p. 133-142.
33. Reed, J.C., *Mechanisms of apoptosis*. *The American journal of pathology*, 2000. **157**(5): p. 1415-1430.
34. Letai, A., *Apoptosis and cancer*. *Annual Review of Cancer Biology*, 2017. **1**(1): p. 275-294.
35. Wong, R.S., *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 2011. **30**: p. 1-14.

36. Jan, R., *Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics*. Advanced pharmaceutical bulletin, 2019. **9**(2): p. 205.
37. Foster, I., *Cancer: A cell cycle defect*. Radiography, 2008. **14**(2): p. 144-149.
38. Park, M., et al., *Breast cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications*. International journal of molecular sciences, 2022. **23**(12): p. 6806.
39. Nolan, E., G.J. Lindeman, and J.E. Visvader, *Deciphering breast cancer: from biology to the clinic*. Cell, 2023. **186**(8): p. 1708-1728.
40. Giaquinto, A.N., et al., *Breast cancer statistics, 2022*. CA: a cancer journal for clinicians, 2022. **72**(6): p. 524-541.
41. AlGhalban, F.M., A.A. Khan, and M.N.K. Khattak, *Comparative anticancer activities of Ficus carica and Ficus salicifolia latex in MDA-MB-231 cells*. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021. **28**(6): p. 3225-3234.
42. Parisi, S., et al., *Locally advanced squamous cervical carcinoma (M0): management and emerging therapeutic options in the precision radiotherapy era*. Japanese Journal of Radiology, 2024. **42**(4): p. 354-366.
43. Zhang, S., et al., *Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening*. Chinese Journal of Cancer Research, 2020. **32**(6): p. 720.
44. Vu, M., et al., *Cervical cancer worldwide*. Current problems in cancer, 2018. **42**(5): p. 457-465.
45. Guo, F., et al., *The correlation between tumor-associated macrophage infiltration and progression in cervical carcinoma*. Bioscience Reports, 2021. **41**(5): p. BSR20203145.
46. Chhabra, R., *Cervical cancer stem cells: opportunities and challenges*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2015. **141**: p. 1889-1897.
47. Arzumanyan, V.A., O.I. Kiseleva, and E.V. Poverennaya, *The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise*. International journal of molecular sciences, 2021. **22**(23): p. 13135.

48. Onuma, A.E., et al., *Immune checkpoint inhibitors in hepatocellular cancer: current understanding on mechanisms of resistance and biomarkers of response to treatment*. Gene expression, 2020. **20**(1): p. 53.
49. Wang, C., et al., *Exploring liver cancer biology through functional genetic screens*. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 2021. **18**(10): p. 690-704.
50. Paul, B., M. Lewinska, and J.B. Andersen, *Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer*. JHEP reports, 2022. **4**(6): p. 100479.
51. Krutsenko, Y., A.D. Singhi, and S.P. Monga, *β -catenin activation in hepatocellular cancer: implications in biology and therapy*. Cancers, 2021. **13**(8): p. 1830.
52. Li, X., et al., *The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer*. Nature Reviews Cancer, 2021. **21**(9): p. 541-557.
53. Anderson, N.M. and M.C. Simon, *The tumor microenvironment*. Current Biology, 2020. **30**(16): p. R921-R925.
54. De Visser, K.E. and J.A. Joyce, *The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth*. Cancer cell, 2023. **41**(3): p. 374-403.
55. Franchi-Mendes, T., et al., *3D cancer models: Depicting cellular crosstalk within the tumour microenvironment*. Cancers, 2021. **13**(18): p. 4610.
56. Quail, D.F. and J.A. Joyce, *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis*. Nature medicine, 2013. **19**(11): p. 1423-1437.
57. Imodoye, S.O., K.A. Adedokun, and I.O. Bello, *From complexity to clarity: unravelling tumor heterogeneity through the lens of tumor microenvironment for innovative cancer therapy*. Histochemistry and Cell Biology, 2024. **161**(4): p. 299-323.
58. Eelen, G., et al., *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis updated*. Circulation research, 2020. **127**(2): p. 310-329.
59. Costa, C., R. Soares, and F. Schmitt, *Angiogenesis: now and then*. Apmis, 2004. **112**(7-8): p. 402-412.
60. Kretschmer, M., D. Rüdiger, and S. Zahler, *Mechanical aspects of angiogenesis*. Cancers, 2021. **13**(19): p. 4987.

61. Ansari, M.J., et al., *Cancer combination therapies by angiogenesis inhibitors; a comprehensive review*. Cell Communication and Signaling, 2022. **20**(1): p. 49.
62. Al-Ostoot, F.H., et al., *Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities*. Cancer Treatment and Research Communications, 2021. **28**: p. 100422.
63. Saman, H., et al., *Inducing angiogenesis, a key step in cancer vascularization, and treatment approaches*. Cancers (Basel) 12 (5): 1172. 2020.
64. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
65. Jiang, X., et al., *The role of microenvironment in tumor angiogenesis*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2020. **39**: p. 1-19.
66. Medina-Leyte, D.J., et al., *Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: A review*. Applied Sciences, 2020. **10**(3): p. 938.
67. Jenča, A., et al., *Herbal Therapies for Cancer Treatment: A Review of Phytotherapeutic Efficacy*. Biologics: Targets and Therapy, 2024: p. 229-255.
68. Bukowski, K., M. Kciuk, and R. Kontek, *Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(9): p. 3233.
69. Liu, B., et al., *Exploring treatment options in cancer: tumor treatment strategies*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024. **9**(1): p. 175.
70. Kaur, R., A. Bhardwaj, and S. Gupta, *Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers*. Molecular biology reports, 2023. **50**(11): p. 9663-9676.
71. Lin, S.R., et al., *Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence*. British journal of pharmacology, 2020. **177**(6): p. 1409-1423.
72. Huang, M., J.-J. Lu, and J. Ding, *Natural products in cancer therapy: Past, present and future*. Natural products and bioprospecting, 2021. **11**(1): p. 5-13.

73. Noel, B., et al., *Role of natural compounds in preventing and treating breast cancer*. Frontiers in bioscience (Scholar edition), 2020. **12**: p. 137.
74. Panno, M.L., et al., *Bergapten induces ER depletion in breast cancer cells through SMAD4-mediated ubiquitination*. Breast cancer research and treatment, 2012. **136**: p. 443-455.
75. Wang, X., et al., *Exosomes play an important role in the process of psoralen reverse multidrug resistance of breast cancer*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2016. **35**: p. 1-10.
76. Acharya, R., et al., *Structure based multitargeted molecular docking analysis of selected furanocoumarins against breast cancer*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 15743.
77. Park, S.-H., et al., *Therapeutic potential of natural products in treatment of cervical cancer: A review*. Nutrients, 2021. **13**(1): p. 154.
78. He, M., L. Xia, and J. Li, *Potential mechanisms of plant-derived natural products in the treatment of cervical cancer*. Biomolecules, 2021. **11**(10): p. 1539.
79. Jakubowicz-Gil, J., et al., *Cell death in HeLa cells upon imperatorin and cisplatin treatment*. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2012. **50**(3): p. 381-391.
80. Wang, Y., et al., *Angelicin inhibits the malignant behaviours of human cervical cancer potentially via inhibiting autophagy*. Experimental and therapeutic medicine, 2019. **18**(5): p. 3365-3374.
81. Alnajjar, A.M. and H.A. Elsiey, *Natural products and hepatocellular carcinoma: a review*. Hepatoma Research, 2015. **1**: p. 119-124.
82. Hu, J., et al., *Imperatorin acts as a cisplatin sensitizer via downregulating Mcl-1 expression in HCC chemotherapy*. Tumor Biology, 2016. **37**: p. 331-339.
83. Yang, H., et al., *8-Methoxypsoralen induces intrinsic apoptosis in HepG2 cells: Involvement of reactive oxygen species generation and ERK1/2 pathway inhibition*. Cellular physiology and biochemistry, 2015. **37**(1): p. 361-374.
84. Han, S.J., S. Kwon, and K.S. Kim, *Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase*. Cancer cell international, 2021. **21**: p. 1-19.

85. Mitrakas, A.G., et al., *Applications and advances of multicellular tumor spheroids: challenges in their development and analysis*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**(8): p. 6949.
86. Gunti, S., et al., *Organoid and spheroid tumor models: techniques and applications*. Cancers, 2021. **13**(4): p. 874.
87. Pinto, B., et al., *Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research*. Pharmaceutics, 2020. **12**(12): p. 1186.
88. Habanjar, O., et al., *3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages*. International journal of molecular sciences, 2021. **22**(22): p. 12200.
89. Vakhshiteh, F., et al., *Heterotypic tumor spheroids: a platform for nanomedicine evaluation*. Journal of nanobiotechnology, 2023. **21**(1): p. 249.
90. Fontoura, J.C., et al., *Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance*. Materials Science and Engineering: C, 2020. **107**: p. 110264.
91. Kamatar, A., G. Gunay, and H. Acar, *Natural and synthetic biomaterials for engineering multicellular tumor spheroids*. Polymers, 2020. **12**(11): p. 2506.
92. Lu, H. and M.H. Stenzel, *Multicellular tumor spheroids (MCTS) as a 3D in vitro evaluation tool of nanoparticles*. Small, 2018. **14**(13): p. 1702858.
93. Liu, Y., et al., *Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction*. Journal of neurochemistry, 1997. **69**(2): p. 581-593.
94. Foglieni, C., C. Meoni, and A.M. Davalli, *Fluorescent dyes for cell viability: an application on prefixed conditions*. Histochemistry and cell biology, 2001. **115**: p. 223-229.
95. Jabbari, H., S. Khosravi, and S. Azimi, *Synthesis and Evaluation of New Derivatives of Busulfan as an Anti-carcinogenic Drug against k562 Cancer Cells Using the AO/PI Method*. The Open Medicinal Chemistry Journal, 2022. **16**(1).
96. Juan, W.S., et al., *Optimal Percoll concentration facilitates flow cytometric analysis for annexin V/propidium iodine-stained ischemic brain tissues*. Cytometry Part A, 2012. **81**(5): p. 400-408.

97. Dimitri, M., et al., *Biophysical and Biomechanical Effect of Low Intensity US Treatments on Pancreatic Adenocarcinoma 3D Cultures*. Applied Sciences, 2022. **12**(2): p. 666.
98. Lyons, A.B., *Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution*. Journal of immunological methods, 2000. **243**(1-2): p. 147-154.
99. Zsidó, B.Z., et al., *Synthesis of spin-labelled bergamottin: A potent CYP3A4 inhibitor with antiproliferative activity*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(2): p. 508.
100. Issa, M.Y., et al., *Potential anticancer activity of the furanocoumarin derivative xanthotoxin isolated from Ammi majus L. fruits: In vitro and in silico studies*. Molecules, 2022. **27**(3): p. 943.
101. Xu, Y., et al., *Isoimperatorin Inhibits Angiogenesis by Suppressing VEGFR2 Signaling Pathway*. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2024: p. 1-12.
102. Moon, L., et al., *Isoimperatorin, cimicide E and 23-O-acetylshengmanol-3-xyloside from Cimicifugae rhizome inhibit TNF- α -induced VCAM-1 expression in human endothelial cells: involvement of PPAR- γ upregulation and PI3K, ERK1/2, and PKC signal pathways*. Journal of Ethnopharmacology, 2011. **133**(2): p. 336-344.
103. Barthomeuf, C., et al., *Umbelliprenin from Ferula szowitsiana inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented malignant melanoma cells through cell-cycle arrest in G1 and induction of caspase-dependent apoptosis*. Phytomedicine, 2008. **15**(1-2): p. 103-111.
104. Oh, J.H., et al., *Isopimpinellin inhibits UVA-induced overproduction of MMPs via suppression of MAPK/AP-1 signaling in human dermal fibroblasts*. Food Science and Biotechnology, 2024: p. 1-11.
105. Tao, L., et al., *Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment*. Oncology letters, 2017. **14**(3): p. 2611-2620.
106. Liu, J., et al., *Hyperactivated FRS2 α -mediated signaling in prostate cancer cells promotes tumor angiogenesis and predicts poor clinical outcome of patients*. Oncogene, 2016. **35**(14): p. 1750-1759.

107. Huang, H., et al., *Bergaptol inhibits glioma cell proliferation and induces apoptosis via STAT3/Bcl-2 pathway*. *Anti-Cancer Drugs*, 2024. **35**(6): p. 535-541.
108. Peyri, N., et al., *Breast tumor cells transendothelial migration induces endothelial cell anoikis through extracellular matrix degradation*. *Anticancer research*, 2009. **29**(6): p. 2347-2355.
109. Prasad, A., et al., *Effect of differential deprivation of nutrients on cellular proliferation, oxidative stress, mitochondrial function, and cell migration in MDA-MB-231, HepG2, and HeLa cells*. *3 Biotech*, 2023. **13**(10): p. 339.
110. Van Petten de Vasconcelos Azevedo, F., et al., *A new approach to inhibiting triple-negative breast cancer: in vitro, ex vivo and in vivo antiangiogenic effect of BthTx-II, a PLA2-Asp-49 from Bothrops jararacussu venom*. *Biomolecules*, 2022. **12**(2): p. 258.
111. Chan, L.L.-Y., et al., *A high-throughput AO/PI-based cell concentration and viability detection method using the Celigo image cytometry*. *Cytotechnology*, 2016. **68**(5): p. 2015-2025.
112. Sundar, P., et al., *Secondary Metabolites from Ficus religiosa (Linn.) Bark Methanol Extract Bestow Cell Cytotoxicity to Human Breast Cancer Cells MDA-MB-231 by Apoptosis*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 2024: p. 1-18.
113. Kim, S.-M., et al., *Simvastatin in combination with bergamottin potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of NF- κ B signalling pathway in human chronic myelogenous leukaemia*. *Pharmaceutical biology*, 2016. **54**(10): p. 2050-2060.
114. Dong, L., et al., *In vitro and in vivo anticancer effects of marmesin in U937 human leukemia cells are mediated via mitochondrial-mediated apoptosis, cell cycle arrest, and inhibition of cancer cell migration*. *Retraction in/10.3892/or. 2021.8065*. *Oncology reports*, 2018. **39**(2): p. 597-602.
115. Mi, C., et al., *Imperatorin suppresses proliferation and angiogenesis of human colon cancer cell by targeting HIF-1 α via the mTOR/p70S6K/4E-BP1 and MAPK pathways*. *Journal of ethnopharmacology*, 2017. **203**: p. 27-38.

116. Wang, Y., et al., *Antiproliferative activity of an angular furanocoumarin-oroselol in human oral cancer cells is mediated via autophagy induction, inhibition of cell migration, invasion, and downregulation of PI3K/AKT signalling pathway*. Acta Biochimica Polonica, 2022. **69**(1): p. 85-89.
117. Yu, J., Z. Wang, and Y. Wang, *BrdU incorporation assay to analyze the entry into S phase*, in *Cell-Cycle Synchronization: Methods and Protocols*. 2022, Springer. p. 209-226.
118. Magavi, S.S. and J.D. Macklis, *Identification of newborn cells by BrdU labeling and immunocytochemistry in vivo*. Neural Stem Cells: Methods and Protocols, 2008: p. 335-343.
119. Bai, Y., et al., *Coumarins from the roots of Angelica dahurica with antioxidant and antiproliferative activities*. Journal of Functional Foods, 2016. **20**: p. 453-462.
120. Bartnik, M., et al., *8-methoxypsoralen reduces AKT phosphorylation, induces intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, and suppresses cell growth of SK-N-AS neuroblastoma and SW620 metastatic colon cancer cells*. Journal of ethnopharmacology, 2017. **207**: p. 19-29.
121. Bartnik, M., et al., *Quantitative Analysis of Isopimpinellin from Ammi majus L. Fruits and Evaluation of Its Biological Effect on Selected Human Tumor Cells*. Molecules, 2024. **29**(12): p. 2874.
122. Crowley, L.C., et al., *Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry*. Cold Spring Harbor Protocols, 2016. **2016**(11): p. pdb. prot087288.
123. Kumar, R., A. Saneja, and A.K. Panda, *An annexin V-FITC—propidium iodide-based method for detecting apoptosis in a non-small cell lung cancer cell line*. Lung Cancer: Methods and Protocols, 2021: p. 213-223.
124. Cao, L.-H., et al., *Vascular protective effects of xanthotoxin and its action mechanism in rat aorta and human vascular endothelial cells*. Journal of vascular research, 2020. **57**(6): p. 313-324.
125. Bhagavatheeswaran, S., et al., *Isopimpinellin extends antiangiogenic effect through overexpression of miR-15b-5p and downregulating angiogenic stimulators*. Molecular Biology Reports, 2022: p. 1-13.
126. Laiho, M. and L. Latonen, *Cell cycle control, DNA damage checkpoints and cancer*. Annals of medicine, 2003. **35**(6): p. 391-397.

127. Wu, X., et al., *Cell cycle checkpoints, DNA damage/repair, and lung cancer risk*. Cancer research, 2005. **65**(1): p. 349-357.
128. Kubrak, T., et al., *The Effect of furanocoumarin derivatives on induction of apoptosis and multidrug resistance in human leukemic cells*. Molecules, 2019. **24**(9): p. 1824.
129. Kim, S.-M., et al., *Bergamottin, a natural furanocoumarin obtained from grapefruit juice induces chemosensitization and apoptosis through the inhibition of STAT3 signaling pathway in tumor cells*. Cancer letters, 2014. **354**(1): p. 153-163.
130. Wang, X., et al., *Psoralen inhibits malignant proliferation and induces apoptosis through triggering endoplasmic reticulum stress in human SMMC7721 hepatoma cells*. Biological Research, 2019. **52**: p. 1-13.
131. Li, G., et al., *Angelicin inhibits human lung carcinoma A549 cell growth and migration through regulating JNK and ERK pathways*. Oncology reports, 2016. **36**(6): p. 3504-3512.
132. Nikolaou, M., et al., *The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview*. Clinical & Experimental Metastasis, 2018. **35**: p. 309-318.
133. Sun, Y., *Tumor microenvironment and cancer therapy resistance*. Cancer letters, 2016. **380**(1): p. 205-215.
134. Dey, M., et al., *Studying tumor angiogenesis and cancer invasion in a three-dimensional vascularized breast cancer micro-environment*. Advanced biology, 2021. **5**(7): p. 2100090.
135. Lazzari, G., et al., *Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity*. Acta biomaterialia, 2018. **78**: p. 296-307.
136. Huang, T.-Y., et al., *Furanocoumarin notopteronol: inhibition of hepatocellular carcinogenesis through suppression of cancer stemness signaling and induction of oxidative stress-associated cell death*. Nutrients, 2023. **15**(11): p. 2447.
137. Khalef, L., et al., *Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments*. Cell Biochemistry and Function, 2024. **42**(3): p. e4007.

138. Shi, G.z., et al., *Screening of hepatotoxic compounds in Psoralea corylifolia L., a traditional Chinese herbal and dietary supplement, using high-resolution mass spectrometry and high-content imaging*. Biomedical Chromatography, 2021. **35**(9): p. e5140.
139. Pouliquen, D.L. and C. Núñez González, *Biomarkers of Tumor Metastasis and Invasiveness*. 2023, MDPI. p. 5000.
140. Nishida, N., et al., *Angiogenesis in cancer*. Vascular health and risk management, 2006. **2**(3): p. 213-219.
141. Rajabi, M. and S.A. Mousa, *The role of angiogenesis in cancer treatment*. Biomedicines, 2017. **5**(2): p. 34.
142. Ranieri, G. and G. Gasparini, *Angiogenesis and angiogenesis inhibitors: a new potential anticancer therapeutic strategy*. Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders, 2001. **1**(3): p. 241-253.
143. Amann, A., et al., *Development of a 3D angiogenesis model to study tumour–endothelial cell interactions and the effects of anti-angiogenic drugs*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-13.
144. PATIL-TAKBHATE, B., S.P. TRIPATHY, and S. HARSHAVARDHAN, *A Narrative Review on Confocal Laser Scanning Microscopy: Principle, Applications, Advancements and Challenges*. Journal of Clinical & Diagnostic Research, 2024. **18**(11).
145. Ghosh, S., et al., *Use of multicellular tumor spheroids to dissect endothelial cell–tumor cell interactions: A role for T-cadherin in tumor angiogenesis*. FEBS letters, 2007. **581**(23): p. 4523-4528.
146. Baru, A., et al., *Establishment of a three-dimensional triculture model on the novel AXTEX-4D™ platform*. Oncology Reports, 2022. **49**(1): p. 2.

EKLER

Assessment of Anticancer Potential of Bergaptol, A Furanocoumarin Derivate,
28th International Biomedical Science and Technology Symposium (Biomed
2024) 1-3 November, 2024.-Poster Sunumu

