

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MCF-7 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KUERSETİN VE LİTYUM
KLORÜR UYGULAMALARININ MİDKİN EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İrem ENGÜLEÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş Danışman

Prof. Dr. Ayhan BİLİR

Aralık, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MCF-7 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KUERSETİN VE LİTYUM KlorÜR
UYGULAMALARININ MİDKİN EKSPRESYONU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

İrem ENGÜLEÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 22.12.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Ayhan BİLİR
Atlas Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Emel ORDU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Esin ÇETİN, Üye
İstanbul Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan MCF-7 Hücre Kültürlerinde Kuersetin ve Lityum Klorür Uygulamalarının Midkin Ekspresyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

İrem ENGÜLEÇ

İmza



Canim Anneanneme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tezimin tamamlanma süreci boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, pandemi koşullarına rağmen deneysel çalışmaların yürütülmesi için her türlü olanağı sağlayan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım derslerle bakış açımı genişleten, tecrübelerinden yararlandığım Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümündeki tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez dönemim süresince hem akademik hem de hayata dair bilgi ve tecrübelerini içtenlikle paylaşan, ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayhan BİLİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez dönemim boyunca bana olan inancını, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Vahit ÖZMEN başta olmak üzere Florence Nightingale Meme Çalışma Grubu'ndaki tüm hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda kullandığım MCF-7 hücre hattını kısa zamanda temin edebilmemi sağlayan Sayın Doç. Dr. Meryem ALAGÖZ hocama ve Biruni Üniversitesi Genom Merkezi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Apoptoz deney analizlerinin gerçekleştirilmesinde ilgi ve yardımlarını eksik etmeyen Sayın Prof. Dr. Esin AKTAŞ ÇETİN hocama ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince ve sonraki aşamalarda yaşanan aksiliklere rağmen beni motive eden, birikimlerini ve tavsiyelerini tüm samimiyetiyle paylaşan, tanımaktan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ekip arkadaşım Gülşah AKBAŞ başta olmak üzere, İrem METEOĞLU'na, Pınar ÖZTEKİN'e, Aysu SALBAŞ'a, Cansu TATAR'a, Kübra ATİK'e, Sabina NEZİRİ'ye, Furkan ÇALIŞ'a, Özge BAŞSARAÇ'a, sorularıma daima ilgiyle yanıt veren Arş. Gör. F. Şayan POYRAZ'a ve Arş. Gör. Emrah BERTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çocukluğumdan bu yana hayatımın her döneminde sevinçlerime de zor anlarıma da ortak olan, kan bağı olarak kardeşim olmasa da aramızda can bağı olduğunu bildiğim, desteklerini daima hissettiğim kıymetli Filiz ALTUNAY'a ve Nevcan ALTUĞ'a,

Bana her zaman moral veren, başarılarımı destekleyen, lise yıllarının bana kattığı kıymetli dostlarım Sevim Ezgi SOYMAN'a, Emirhan AKBULUT'a ve Ecem UZUN'a yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen, büyük özveri ve emeklerle beni bugünlere getiren, hayatın getirdiği tüm zorluklara karşı pes etmemeyi ve güçlü durmayı öğreten, dürüst, vicdanlı, iyi bir insan olabilmeyi ilke edinerek beni yetiştiren canım annem Esmâ ENGÜLEÇ'e ve babam Murat ENGÜLEÇ'e sonsuz teşekkür ederim.

Bana daima sevgiyle ve şefkatle yaklaşan, çocukluğumun en kıymetli anılarında yer alan, yokluğunu ve özlemini derinden hissettiğim, tezimi ithaf ettiğim canım pamuk anneannem Cemile AKGÜL'e sonsuz teşekkür ederim.

İrem ENGÜLEÇ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xvi
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	2
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Meme Kanseri	3
2.2 Flavonoidler	6
2.2.1 Kuersetin	7
2.3 Lityum Klorür.....	9
2.4 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....	10
2.5 Antioksidanların Sınıflandırılması	11
2.6 Hücre Döngüsü	12
2.7 Apoptoz.....	14
2.7.1 Midkin.....	16
3 MATERYAL VE METOD	19
3.1 Materyal.....	19
3.1.1 Kullanılan Cihazlar.....	19
3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler	20
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	20
3.2 Metod	22
3.2.1 MCF-7 ve CCD Hücre Kültürü	22
3.2.2 MCF-7 ve CCD Hücrelerinin Pasajlanması	22
3.2.3 MCF-7 ve CCD Hücrelerinin Dondurulması	23
3.2.4 Farklı Konsantrasyonlarda Kuersetin Hazırlanması	23
3.2.5 Farklı Konsantrasyonlarda Lityum Klorür Hazırlanması	23

3.2.6 MTT Analizi	24
3.2.7 MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Lizatlarının Hazırlanması	24
3.2.8 Protein Miktar Tayini (BCA Yöntemi)	25
3.2.9 Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi	25
3.2.10 Redükte Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	26
3.2.11 Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi	26
3.2.12 Flow Sitometri Analiziyle Apoptoz Tayini	27
3.2.13 ELISA Yöntemiyle Midkin Ekspresyonunun Belirlenmesi	28
3.2.14 İstatistiksel Analizler	29
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	31
4.1 Sonuçlar	31
4.1.1 Kuersetin Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerindeki Sitotoksik Etkileri	31
4.1.2 Kuersetin Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon Tedavisinin CCD Sağlıklı İnsan Kolon Hücrelerindeki Sitotoksik Etkileri	38
4.1.3 Protein Miktar Tayini	44
4.1.4 Kuersetin Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon Tedavisi Uygulanan MCF-7 Hücrelerindeki Malondialdehit Düzeyleri	44
4.1.5 Kuersetin Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerindeki Redükte Glutasyon Düzeyleri	45
4.1.6 Kuersetin Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerindeki Süperoksit Dismutaz Aktivite Düzeyleri	47
4.1.7 Kuersetin Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptoz Etkileri .	48
4.1.8 Kuersetin Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon Tedavisi Uygulanan MCF-7 ve CCD Hücrelerindeki Midkin Düzeyleri	56
4.2 Öneriler	60
KAYNAKÇA	67
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	81

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nM	Nanometre
pg	Pikogram
°C	Santigrat Derece
cm ²	Santimetrekare
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AKT	Protein Kinaz B
APAF1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
ATM	Ataksi Telenjipektazi Mutasyonu Geni
BAD	Bcl-2 Hücre Ölümünün Antagonisti
BAK	Hücre Ölüm İnhibitörü 1
BAX	Bcl-2 İle İlişkili X Proteini
BCL-2	B Hücreli Lenfoma 2
BCL-X	Bcl-2 Benzeri Protein 2
BH3	Bcl-2 Homoloji Alanı
BID	BH3 Etkileşimli Alan Ölüm Agonisti
BIK	Bcl-2 Değiştirici Faktör
BOK	Bcl-2 İle İlişkili Yumurtalık Öldürücü
BRCA 1	Meme Kanseri Yatkınlık Genleri 1
BRCA 2	Meme Kanseri Yatkınlık Genleri 2
CAD	Kaspaz Aktive Edici DNaz
CCD	Sağlıklı İnsan Kolon Fibroblast Hücre Hattı
CCND 1	Siklin D1'i Kodlayan Gen
CDH 1	Kaderin 1'i Kodlayan Gen
CHEK 2	Kontrol Noktası Kinaz 2
DISC	Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTNB	5,5 Ditiyobis-2-Nitrobenzoik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi
ERBB 2	Reseptör Tirozin Kinaz 2
ERK 1/2	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz 1/2
FADD	Fas İle İlişkili Ölüm Alanı
FAK	Fokal Adezyon Kinazı

FAS-L	Fas Ligandı
FBS	Fetal Bovine Serum
GSH	Redükte Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSK-3 α	Glikojen Sentaz Kinaz 3 Alfa
GSK-3 β	Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta
HRK	Apoptoz Aktivatörü Harakiri
IC ₅₀	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
LiCl	Lityum Klorür
MCF-7	Östrojen Reseptör Pozitif İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MCL-1	Miyeloid Hücreli Lösemi 1
MDA	Malondialdehit
MDK	Midkin
mTOR	Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5 Difeniltetrazolyum Bromid
MYC	Protoonkogen Ailesi
NaCl	Sodyum Klorür
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NOXA	Forbol-12-Miristat-13-Asetat Kaynaklı Protein 1
P53	Tümör Protein 53
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
pH	Hidrojen Gücü
PI3K	Fosfoinositid3-kinaz
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
Que	Kuersetin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
STAT1 α	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 1Alfa
STK11	Serin/Treonin Kinaz 11
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
TCA	Trikloroasetik Asit
TNF- α	Forbol-12-Miristat-13-Asetat Kaynaklı Protein 1

TNFR1	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü 1
TP53	Tümör Protein 53
TRADD	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü İle İlişkili Ölüm Alanı
TRAIL	TNF İle İlişkili Apoptozu İndükleyen Ligand
TRAILR1	TRAIL Reseptörü 1
TRAILR2	TRAIL Reseptörü 2



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Meme glandüler dokusunun yapısı.....	4
Şekil 2.2 Kuersetinin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.3 GSK3'ün karsinogenezi doğrudan veya dolaylı olarak yönettiği yollar	10
Şekil 2.4 Oksidatif denge	11
Şekil 2.5 Hücre döngüsünün evreleri ve kontrol noktaları	13
Şekil 2.6 Apoptozun içsel ve dışsal yolları.....	15
Şekil 2.7 Midkinin farklı plazma membran reseptörleri ile etkileşimleri	17
Şekil 4.1 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)...	31
Şekil 4.2 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (100 µM kuersetin) (5x).....	31
Şekil 4.3 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (500 µM kuersetin) (5x).....	32
Şekil 4.4 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)...	32
Şekil 4.5 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (100 µM kuersetin) (5x).....	32
Şekil 4.6 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (500 µM kuersetin) (5x).....	33
Şekil 4.7 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)...	33
Şekil 4.8 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (100 mM LiCl) (5x)	34
Şekil 4.9 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (500 mM LiCl) (5x)	34
Şekil 4.10 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x).	34
Şekil 4.11 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (100 milimolar LiCl) (5x)	35
Şekil 4.12 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (500 milimolar LiCl) (5x)	35
Şekil 4.13 Kuersetin tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (24 ve 48 saat).....	36
Şekil 4.14 Lityum klorür tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (24 ve 48 saat)	36

Şekil 4.15 MCF-7 hücrelerine uygulanan kuersetin + lityum klorür kombinasyonlarının doz etki grafiği (Que: Kuersetin).....	37
Şekil 4.16 Kuersetin ile lityum klorürün kombinasyon indeks eğrisi	38
Şekil 4.17 CCD hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x) ...	38
Şekil 4.18 CCD hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (100 µM kuersetin) (5x).....	39
Şekil 4.19 CCD hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (300 µM kuersetin) (5x).....	39
Şekil 4.20 CCD hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x) ...	39
Şekil 4.21 CCD hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (100 µM kuersetin) (5x).....	40
Şekil 4.22 CCD hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (300 µM kuersetin) (5x).....	40
Şekil 4.23 CCD hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x) ...	41
Şekil 4.24 CCD hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (100 mM LiCl) (5x)	41
Şekil 4.25 CCD hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x) ...	41
Şekil 4.26 CCD hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (100 mM LiCl) (5x)	42
Şekil 4.27 Kuersetin tedavisi uygulanan CCD hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (24 ve 48 saat).....	42
Şekil 4.28 Lityum klorür tedavisi uygulanan CCD hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (24 ve 48 saat)	43
Şekil 4.29 CCD hücrelerine uygulanan kuersetin + lityum klorür kombinasyonlarının doz etki grafiği (Que: Kuersetin).....	44
Şekil 4.30 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerindeki MDA seviyeleri (24 ve 48 saat)	45
Şekil 4.31 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerindeki GSH seviyeleri (24 ve 48 saat)	46
Şekil 4.32 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerindeki SOD seviyeleri (24 ve 48 saat)	48
Şekil 4.33 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin canlı hücre yüzdeleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (24 saat)	49
Şekil 4.34 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdeleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (24 saat)	49

Şekil 4.35 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin geç apoptotik hücre yüzdeleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (24 saat)	50
Şekil 4.36 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin ölü hücre yüzdeleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (24 saat)	51
Şekil 4.37 Kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (24 saat)	51
Şekil 4.38 Kuersetin (100,9 μ M) tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (24 saat)	51
Şekil 4.39 Lityum klorür (95,55 mM) tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (24 saat)	52
Şekil 4.40 Kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (24 saat)	52
Şekil 4.41 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin canlı hücre yüzdeleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (48 saat)	53
Şekil 4.42 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdeleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (48 saat)	53
Şekil 4.43 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin geç apoptotik hücre yüzdeleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (48 saat)	54
Şekil 4.44 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin ölü hücre yüzdeleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (48 saat)	55
Şekil 4.45 Kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (48 saat)	55
Şekil 4.46 Kuersetin (100,9 μ M) tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (48 saat)	55
Şekil 4.47 Lityum klorür (95,55 mM) tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (48 saat)	56
Şekil 4.48 Kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (48 saat)	56
Şekil 4.49 Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerindeki midkin düzeyleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (24 saat)	57
Şekil 4.50 Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerindeki midkin düzeyleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (48 saat)	58
Şekil 4.51 Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi uygulanan CCD hücrelerindeki midkin düzeyleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (24 saat)	59

Şekil 4.52 Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi uygulanan CCD hücrelerindeki midkin düzeyleri ($p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$) (48 saat)60



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin sınıflandırılması	5
Tablo 2.2 Flavonoid örnekleri ve başlıca gıda kaynakları.....	7



MCF-7 Hücre Kültürlerinde Kuersetin ve Lityum Klorür Uygulamalarının Midkin Ekspresyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

İrem ENGÜLEÇ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş-Danışman: Prof. Dr. Ayhan BİLİR

Meme kanseri dünyada en sık görülen kanser türüdür. Moleküler alt tipine göre değişiklik göstermekle birlikte çeşitli cerrahi yöntemler, ışın tedavisi, kemoterapötik ilaçlar meme kanserinde standart tedavi olarak uygulanmaktadır. Kemoterapötik ilaçların vücutta yarattığı yan etkilerin azaltılması için destekleyici tedavi yöntemlerine ihtiyaç son yıllarda artmıştır.

Kuersetin, bitkisel besinlerde bolca bulunduğu kanser araştırmalarında destekleyici ajan olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Lityumun; birçok kanser türünde antikanser özelliği kanıtlanmıştır. Bu tez çalışmasında; kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavileri MCF-7 hücrelerine uygulanarak MTT yöntemiyle sitotoksik etkileri belirlenmiştir. MDA ile oksidatif stres düzeyi, GSH ve SOD tayinleriyle etken maddelerin antioksidan aktiviteleri hesaplanmıştır. Flow sitometri yöntemiyle apoptoza etkilerinin ve ELISA yöntemiyle midkin ekspresyonu düzeyine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

24 saat LiCl ve Que + LiCl kombinasyonu uygulanan hücrelerin MDA düzeyinde anlamlı azalma görülmüştür. 48 saatte GSH düzeylerinde tüm gruplarda anlamlı azalma gözlenmiştir. 48 saatte MCF-7 hücrelerindeki SOD aktivitesinde anlamlı artış görülmüştür. 48 saatte MCF-7 hücrelerinin tüm tedavi gruplarında erken apoptotik hücre yüzdesinin arttığı belirlenmiştir. 24 ve 48 saat kuersetin ve LiCl tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinde midkin düzeyinin azaldığı sonucuna ulaşılmıştır. Tüm bulgular neticesinde; kuersetin ve lityum klorürün MCF-7 hücrelerinde antiproliferatif ve apoptozu indükleyici etkisi olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte kombinasyonlarının meme kanseri tedavisinde uygulanabilmesi için destekleyici *in vivo* ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, kuersetin, lityum klorür, apoptoz, midkin

Evaluation of the Effects of Quercetin and Lithium Chloride Medications on Midkine Expression in MCF-7 Cell Cultures

İrem ENGÜLEÇ

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Co-supervisor: Prof. Dr. Ayhan BİLİR

Breast cancer is the most common type of cancer in the world. Although it varies according to the molecular subtype, various surgical methods, radiation therapy, chemotherapeutic drugs are applied as standard treatment in breast cancer. The need for supportive treatment methods has increased in recent years to reduce the side effects of chemotherapeutic drugs in the body.

Since quercetin is abundant in plant foods, it is frequently used as a supporting agent in cancer research. Lithium; It has been proven to have anticancer properties in many types of cancer. In this thesis study; quercetin, lithium chloride and quercetin + lithium chloride combination treatments were applied to MCF-7 cells and their cytotoxic effects were determined by MTT method. Oxidative stress level with MDA, antioxidant activities of active ingredients were calculated with GSH and SOD assays. It was aimed to determine its effects on apoptosis by flow cytometry method and its effects on midkine expression level by ELISA method. A significant decrease was observed in the MDA level of cells treated with the combination of LiCl and Que + LiCl for 24 hours.

A significant decrease was observed in GSH levels in all groups at 48 hours. Significant increase in SOD activity was seen in MCF-7 cells at 48 hours. It was determined that the percentage of early apoptotic cells increased in all treatment groups of MCF-7 cells at 48 hours. It was concluded that midkine level decreased in MCF-7 cells treated with quercetin and LiCl for 24 and 48 hours. As a result of all the findings; quercetin and lithium chloride were found to have antiproliferative and apoptosis-inducing effects in MCF-7 cells. However, supportive *in vivo* and clinical studies are needed for the combinations to be applied in the treatment of breast cancer.

Keywords: Breast cancer, quercetin, lithium chloride, apoptosis, midkine



1.1 Literatür Özeti

Canlıların yaşam döngülerini sağlıklı devam ettirebilmeleri için hücre içi dengenin korunabilmesi gerekmektedir. Apoptoz hücre sayısındaki dengeyi çeşitli sinyal yollarıyla korunmasına olanak tanıyan mekanizmaları içermektedir [1]. Hücrelerdeki genetik materyal fiziksel veya kimyasal çeşitli ajanlarla karşılaştığında ayrıca genetik materyalin kendini eşlemesi esnasında meydana gelen hatalı eşleşmeler sebebiyle kanser meydana gelmektedir [2]. Meme kanseri ise süt kanallarından veya lobüllerden orijinlenerek ortaya çıkan, çeşitli moleküler alt gruplarını içermesinden dolayı heterojen bir rahatsızlık olarak tanımlanmaktadır [3], [4].

2020 yılının GLOBOCAN verilerine göre dünya genelinde toplam %11,7 oranında meme kanseri tanısı konulmuştur. Erkeklerde ilk kez en sık görülen kanser türü olduğu bildirilmiştir [5]. Meme kanserinin tedavisinde çeşitli cerrahi yöntemler, ışıın tedavileri ve moleküler alt grubuna göre çeşitli ilaç kombinasyonları ile kemoterapi yaygın olarak uygulanmaktadır [6]. Kemoterapide kullanılan bazı ilaçlar kanser hücrelerinde yanıt oluşturmamaktadır. İlaçlara yanıtın artırılması için vücutta toksik etkisi çok az olan flavonoidler, hücre kültürlerinde sıklıkla araştırılmaktadır [7].

Bitkiler hastalık yapıcı zararlılara karşı kendilerini savunabilmek için renkli sekonder metabolitler açığa çıkarmaktadır. Bu nedenle polifenoller, bitkisel besinlerde bol miktarda bulunmaktadır [8]. Polifenollerin alt sınıfında bulunan flavonoidler, bir piron ve iki benzen halkasından oluşmaktadır [9], [10]. Flavonoidlerin bir üyesi olan kuersetin antikanser özelliği nedeniyle hücre kültürlerinde ve *in vivo* araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [11]. Kuersetinin; magnezyum [12], kobalt [13] ve vanadyum [14] metalleri ile etkileşimleri incelendiğinde kuersetinin antioksidan özelliğinde artış olduğu fakat kurşunun [15] ise kuersetinin antioksidan özelliğinin azalmasına neden olduğu literatür

alışmalarıyla doğrulanmıştır. Periyodik cetvelde alkali metaller grubunda bulunan lityumun, lityum sülfat gibi tuz formları ile araştırmalarda çalışılmaktadır [16], [17]. Literatür taraması sonucunda birçok farklı kanser hücre hattında kuersetin tedavisi uygulanan çalışmanın bulunduğu fakat meme kanserinde kuersetin ile lityum klorür kombinasyon tedavisinin uygulandığı bir çalışmanın bulunmadığı grlmştır. Bu sonuçtan yola çıkılarak bu tez kapsamında kuersetin, lityum klorür ve kombinasyonlarının meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik, apoptotik ve midkin düzeylerine etkileri incelenmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı; bitkisel kaynaklı bir antioksidan olan kuersetin, farmakolojik özelliği olan lityum klorür ve kombinasyonlarının MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik, antiproliferatif, apoptotik ve antiapoptotik protein olan midkin ekspresyonuna etkilerinin belirlenmesidir.

1.3 Hipotez

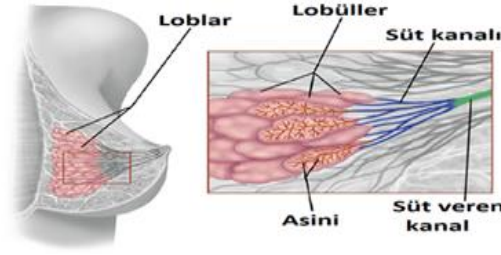
Kuersetinin; antioksidan, antimikrobiyal özellikleri literatür çalışmalarıyla ortaya koyulmuştur [18], [19]. Lityum klorürün ise kanserde, psikolojik ve nörolojik hastalıkların tedavisinde terapötik ajan olduğu literatür çalışmalarında yer almaktadır [20], [21], [22]. Literatürde; MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında kuersetin + lityum klorür kombinasyonlarının apoptoza ve midkin ekspresyonuna etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile; kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavilerinin MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin MTT analizi ile, oksidatif stres ve antioksidan aktivitelerinin MDA, GSH, SOD tayinleri ile, apoptotik etkilerinin flow sitometri analizi ile, midkin ekspresyonuna etkilerinin ELISA yöntemiyle tespit edilmesi hedeflenmektedir. Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisinin MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemesi ve antiapoptotik protein olan midkin ekspresyonunu azaltması beklenmektedir.

2.1 Meme Kanseri

Kanser vakalarının görülmesi Eski Mısırlılar dönemine dayanmaktadır. Tümör Ebers Papirusunda damarlarda şişkinlik oluşması şeklinde betimlenmiştir. Hipokrat Yunanca yengeç anlamındaki karkinos sözcüğünü kullanarak tümörün tanımını yapmıştır. Thomas Beatson ise 1800’lü yıllarda anti-hormonal teoriyi öne sürmüştür. Bu teoriye göre meme kanseri kadınlık hormonları ile ilişkili olduğunu belirtmiştir [23]. Ayrıca Hipokrat humoral teoriyi öne sürmüştür. Bu teoriye göre vücudun dört farklı vücut sıvısından oluştuğunu ve bu sıvılardan siyah safranın birikmesiyle de kanserin ortaya çıktığını savunmuştur [24].

2020 yılının GLOBOCAN verilerine göre meme kanserinin tüm cinsiyet ve yaş aralıklarında en yüksek insidansa sahip kanser türü olduğu bildirilmiştir [5]. Organizmalar yaşamlarını sürdürebilmeleri için hücre sayısını belirli bir dengede tutmaları gerekmektedir. Bu denge ise hücreler stres ile karşılaştıklarında apoptoz mekanizmasını başlatarak korunmaktadır [25]. Fakat hücre döngüsünde ya da apoptoz mekanizmasında değişiklik meydana gelirse kontrolsüz şekilde çok sayıda kanserli hücrenin bölünerek çoğalmasına yol açmaktadır [26], [25]. Meme kanseri ise süt kanallarındaki epitel hücrelerinden ya da alveol lobüllerinden orijinlenerek oluşmaktadır [3].

Meme anatomisi bağ doku, glandüler doku ve yağ dokusundan meydana gelmektedir [27]. Derinin altında yer alan yüzeysel bağ dokunun arasında destekleyici Cooper’ın bağları bulunmaktadır. Şekil 2.1’de görüldüğü gibi glandüler dokuda bulunan loblar daha sonra süt kanallarına bağlanan lobüllere ayrılmaktadır. Lobüllerde ise asini adı verilen kesecikler bulunmaktadır [28]. Meme kanserinde en sık görülen belirti düzensiz şekilli kitle oluşumudur.



Şekil 2.1 Meme glandüler dokusunun yapısı [28]

Memede ağrı, meme derisinde pullanma ve renk değişimi, meme ucunun içeriye doğru çökmesi, memeden akıntı gelmesi veya lenf bezlerinin şişmesi rastlanılan diğer belirtilerdir [29]. Meme kanseri toplam 4 evreden oluşmaktadır. İlk basamak olan evre 0 yerinde karsinom olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada lobüllerde veya kanallarda aşırı hücre birikimi söz konusudur. Evre 1’de kanserli hücrenin büyüklüğü 2 cm’den küçüktür. Lenf düğümlerine sıçrama yoktur. İkinci evrede ise kanserli hücrenin büyüklüğü 2-5 cm arasında değişiklik göstermektedir. Bazı durumlarda koltuk altındaki lenf düğümlerine de sıçradığı görülebilmektedir. Üçüncü evre ise kendi içinde Evre 3A, 3B ve 3C olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Son aşama olan evre 4’te ise başka organlara metastaz yaptığı görülmektedir [30].

Meme kanseri oluşumuna yol açan riskler arasında yaş, cinsiyet (kadın olmak), hormonlar, meme yoğunluğunun çok olması, ilk doğum yapılan yaş, emzirme süresinin kısa olması, sigara ve alkol tüketimi, hareketsizlik, radyasyon almak, mutasyonlar, aile geçmişinde meme kanseri görülmesi gibi pek çok unsur yer almaktadır [31], [32], [33].

Meme kanserinin kalıtsal kaynaklı oluşumunda etkili olan genler DNA hasarının tamirinde rol alan BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlardır [34]. Mutasyona uğrayarak meme kanserinin oluşumunda rol oynayan diğer tümör baskılayıcı genler ise TP53, PTEN, CDH1, STK11, ATM, PALB2 ve CHEK2 genleridir [34], [35]. Meme kanserinin oluşumu sıklıkla sporadik kaynaklıdır yani somatik genlerin mutasyonu neticesinde ortaya çıkmaktadır [35]. Sporadik kaynaklı meme kanseri oluşumunda görevli başlıca onkogenler MYC, ERBB2, CCND1’dir [36]. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması Tablo 2.1’de detaylı açıklanmıştır [37].

Tablo 2.1 Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin sınıflandırılması [37]

Moleküler Alt Tip	ER	PR	HER2
Luminal A	Pozitif	Pozitif	Negatif
Luminal B	Pozitif	Pozitif veya negatif	Negatif
Luminal B	Pozitif	Pozitif veya negatif	Pozitif
Her2	Negatif	Negatif	Pozitif
Üçlü negatif veya bazal benzeri	Negatif	Negatif	Negatif

Meme kanseri in situ karsinom ve invaziv karsinom olmak üzere iki histolojik alt tipe ayrılmaktadır. Kanserli hücrelerin proliferasyonu süt kanallarında meydana gelirse duktal karsinoma, lobüllerde meydana gelirse lobüler karsinoma adını almaktadır [38]. Meme kanserinin tanısında kullanılan metodlar arasında standart dijital mamografi, dijital meme tomosentezi, kontrastlı mamografi, ultrason, manyetik rezonans görüntüleme gibi yöntemler ve çeşitli biyopsiler yer almaktadır [39], [40], [41].

Meme kanserinin lokal tedavi yöntemleri arasında mastektomi, lumpektomi gibi cerrahi yöntemler ve ışın tedavisi bulunmaktadır. Hem meme kanserinin evresi hem de moleküler alt tipi dikkate alınarak verilen paklitaksel, dosetaksel gibi çeşitli kemoterapi ilaçları ve kombinasyonları ise sistemik tedavi olarak uygulanmaktadır [42].

Moleküler alt tipi hormon reseptörü pozitif olan hastalarda östrojen reseptörüne bağlanarak reseptörü düzenleyen tamoksifen ya da menopoza giren kadınlarda aromataz enzimini durduran anastrol, letrozol gibi ilaçlar hormon tedavisinde kullanılmaktadır [43]. Flavonoidler protein kinazları inhibe edici özelliği ve topoizomeraz enzimini inhibe edici özelliğinden dolayı kanserli hücrelerin proliferasyonunu engellemede önemli rol oynamaktadır [44].

LNCaP ve PC-3 insan prostat kanseri hücre hatlarında kuersetin, dosetaksel ve kombinasyonlarının apoptotik etkilerine bakılan bir çalışmada kombinasyon tedavisinin apoptoza giden hücre sayısında dikkate değer derecede artışa neden olduğu saptanmıştır [45]. 5-demetilnobiletin, paklitaksel ve kombinasyonlarının CL1-5 insan akciğer adenokarsinom hücre hattındaki sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir araştırmada kombinasyon tedavisi uygulandığında çok daha düşük komsantrasyonda IC₅₀ dozu elde edilmiştir [46].

2.2 Flavonoidler

Biyoaktif fitokimyasallar olan polifenoller genellikle bitkilerin yapısında yer almaktadır [47], [48]. Antioksidan özelliğe sahip olan polifenoller sebzelerde, meyvelerde, çay ve kahvede bulunmaktadır [9], [49]. Bu özelliği sayesinde polifenollerin çeşitli kanserlere, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruduğu literatür çalışmalarıyla doğrulanmıştır [50], [51], [52]. Polifenoller yapısındaki fenol bileşiklerinin miktarı ve bağlanma biçimleri temel alınarak fenolik asitler, fenolik alkoller, flavonoidler, stilbenler ve lignanlar olmak üzere beş sınıfa ayrılmaktadır [9]. Oksijen bulunan piron halkasına iki adet benzen halkası bağlanarak oluşan flavonoidler, Latince “flavus” sözcüğünden köken almaktadır [10], [53]. İskorbüt hastalığının tedavisini araştırırken Albert Szent Györgyi ve arkadaşları turuncgillerde bulunan flavonoidleri keşfetmiştir [54], [55].

Flavonoidlerin buluşunu çok eski dönemlere dayansa da kimyasal yapıları 20. yüzyılda belirlenmiştir ve günümüze kadar takriben 10.000 çeşit flavonoid bulunmuştur [55], [56]. Flavonoidlerin antioksidan [53], antimikrobiyal [57], antikanser [58] ve karaciğeri koruyucu özelliği [59] çalışmalarla tespit edilmiştir. 10 tane flavonoidin yumurtalık kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada en çok apigenin ve mirisetinin OVCAR-3 ve SKOR-3 yumurtalık kanseri hücrelerinin canlılığını azalttığı sonucuna varılmıştır [60]. LNCaP insan prostat kanseri hücre hattında genistein, apigenin, luteolin ve kuersetinin hücre döngüsüne etkilerinin incelendiği bir araştırmada genisteinin hücre döngüsünü durdurduğu, kuersetin, apigenin ve luteolinin ise hücre döngüsüne dikkate değer derecede etki etmediği görülmüştür [61].

Luteolin, mirisetin, galangin, naringenin ve hesperetin gibi farklı flavonoidlerin HCT-116 insan kolon kanseri hücre hattı ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattındaki apoptotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada mirisetin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattında maksimum sitotoksosite göstererek apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir [62]. Flavonoidler; izoflavonoidler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller ve antosiyanidinler olmak üzere 6 alt sınıfa ayrılmaktadır [58]. Flavonoid alt sınıflarının bulundukları besin kaynakları Tablo 2.2’de detaylı olarak açıklanmıştır [63], [64].

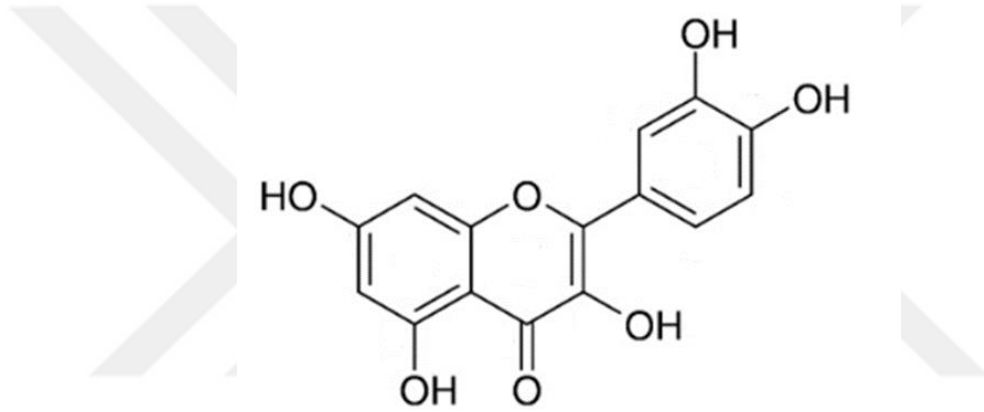
Tablo 2.2 Flavonoid örnekleri ve başlıca gıda kaynakları [63], [64]

Flavonoidlerin alt sınıfları	Örnekler	Başlıca gıda kaynakları
İzoflavonlar	Genistein, Daidzein, Glisitin	Soya fasulyesi, Baklagiller
Flavonoller	Kuersetin, Mirisetin, Kamferol	Soğan, Brokoli, Elma, Kiraz, Çilek, Çay
Flavonlar	Apigenin, Krisin, Luteolin	Elma kabuğu, Kereviz
Flavanonlar	Hesperetin, Naringenin	Turunçgiller
Flavanoller	Kateşin, Epikateşin	Elma, Kırmızı üzüm, Çay
Antosiyanidinler	Siyanidin	Çilek gibi meyveler

2.2.1 Kuersetin

Meşenin Latincesinden adını alan kuersetin, flavonoidlerin flavonol alt sınıfında yer almaktadır [65], [66]. Elma, üzüm gibi meyveler ve lahana, soğan gibi sebzelerde bulunmaktadır [67]. Sarı renklidir ve yapısında 5 adet hidroksil molekülü (Şekil 2.2) ihtiva etmektedir [68]. Suda çözünmezler ve alkolde ise çözünürlüklerinin zayıf olduğu bilinmektedir. Bu nedenle genellikle araştırmalarda kuersetin organik çözücülerde çözülerek kullanılmaktadır [69].

Antioksidan aktivitesi olan kuersetinin [18] ayrıca antikanser, kardiyoprotektif ve nöroprotektif özellikleri de belirlenmiştir [70]. HMC-1 insan mast hücrelerindeki gen ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada kuersetinin tümör nekroz faktörü 1- α ve interlökin-1 β sitokinlerini azalttığı dolayısıyla alerjik inflamatuvar hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiştir [71]. 30 gün boyunca kuersetin ile tedavi edilen diyabetik erkek sıçanların karaciğerlerindeki oksidatif stresi engelleyerek karaciğer hasarına karşı koruduğu saptanmıştır [72]. Kuersetinin bakteriyel hastalıklara karşı etkinliğinin ele alındığı başka bir çalışmada ise *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* bakterilerinin canlılığını gözle görülür derecede azalttığı belirlenmiştir [19].



Şekil 2.2 Kuersetinin kimyasal yapısı [73]

Kuersetinin mitokondriyal yolak ile apoptozu indüklediği ve hücre döngüsünün regülasyonunda rol oynadığı yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır [74]. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde kuersetinin antiproliferatif özelliğinin incelendiği bir araştırmada kuersetin konsantrasyonu arttıkça hücre proliferasyonunun azaldığı gözlemlenmiştir [75]. Ishikawa hücre hattında kuersetinin hücre döngüsüne etkisinin araştırıldığı bir çalışmada kuersetinin hücre döngüsünde rol oynayan siklin D1 düzeyinde azalmaya neden olduğu görülmüştür [76].

Temozolomid ile kuersetinin kombine tedavisinin insan glioblastoma hücrelerindeki etkilerine bakılan bir araştırmada temozolomid ile kuersetinin sinerjistik etki göstererek hücre proliferasyonunu dikkate değer derecede baskıladığı ve hücreleri apoptoza götürdüğü belirlenmiştir [77].

T47D insan meme kanseri hücrelerinde, fare meme kanseri hücrelerinde ve CEM, K562, Nalm6 lösemik hücre hatlarında kuersetinin sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise IC₅₀ dozları sırasıyla 160 µM, 50 µM, 55 µM, 40 µM ve 20 µM bulunmuştur [78].

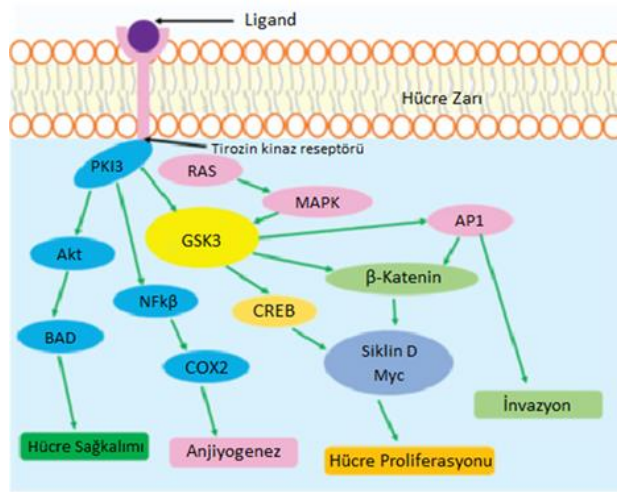
2.3 Lityum Klorür

Periyodik cetvelde IA grubunda yer alan lityum, Yunanca “lithos” sözcüğünden köken almaktadır [16], [79]. Toprak ve yüzey suyunda bulunan yumuşak yapıda bir alkali metaldir [16], [17]. Lityum klorürün suda çok iyi çözünebildiği bilinmektedir. Ayrıca pek çok organik çözücünde de iyi karışabildiği anlaşılmıştır [80]. İlaçlarda lityum karbonat gibi tuz formlarından yararlanılmaktadır. İçilen ilaç kandaki proteinlerle etkileşime girmemektedir ve böbreklerden geçerek büyük ölçüde dışarı atılmaktadır [17]. Lityumun keşfedilmesi 1800’lü yıllara dayansa da antimanik etkisini psikiyatrist John Cade 1940’lı yıllarda ispatlamıştır [81], [82]. 1974 senesinden itibaren bipolar hastalığına karşı kullanılmaktadır [22].

Lityum iyon yarıçap uzunluğu kendisine yakın olan magnezyum iyonu ile rekabet halindedir. Bu nedenle magnezyum bağımlı enzimlerin yapısını değiştirerek inaktif edebilmektedir [83]. İnozitol monofosfataz (IMPaz), inositol polifosfat-1-fosfataz (IPPaz), bifosfat nükleotidaz (BPNaz), fruktoz1,6-bifosfataz (FBPaz), fosfoglukomutaz (FGM) ve glikojen sentaz kinaz 3 (GSK-3) olmak üzere 6 enzimi bloklayarak birçok yolak üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir [84].

Memelilerin tüm dokularında gen ifadesi olabilen glikojen sentaz kinaz 3, GSK-3 α ve GSK-3 β olmak üzere iki izoforma ayrılmaktadır. GSK-3 α insanların 19. kromozomunda GSK3A geni ile kodlanırken, GSK-3 β ise insanların 3. kromozomunda GSK3B geni ile kodlanmaktadır [85], [86]. 100’den fazla substratı olan glikojen sentaz kinaz-3’ün glikojen sentaz enzimini baskılayarak glikojen metabolizmasında rol aldığı ilk kez 1980 yılında bulunmuştur [87], [88].

Yapılan çalışmalarla glikojen sentaz kinaz-3’ün kanser [86] (Şekil 2.3), tip 2 diyabet [89] ve amiotrofik lateral skleroz [90], Alzheimer [91], Parkinson [92] gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel bir hedef olduğu kanıtlanmıştır.



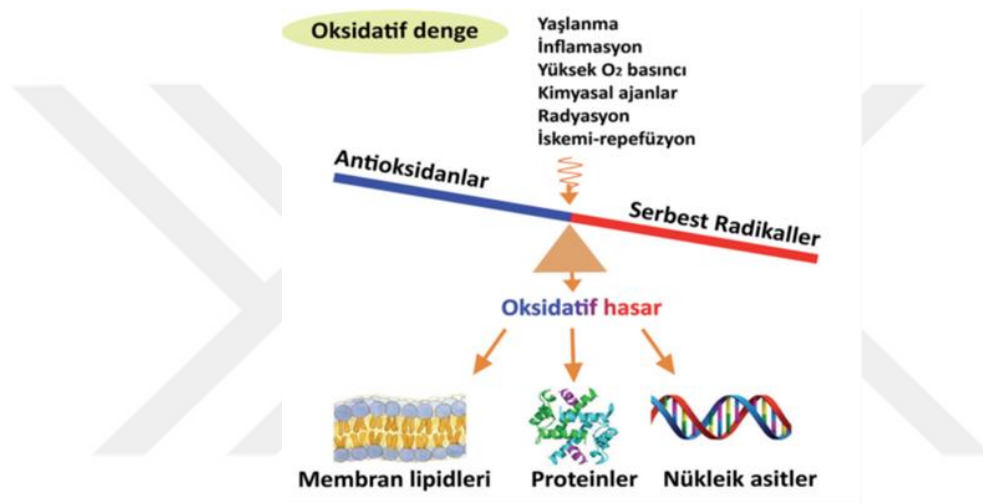
Şekil 2.3 GSK-3'ün karsinogenezi doğrudan veya dolaylı olarak yönettiği yollar [93]

T98G insan glioblastoma multiforme hücrelerinde sorafenib ve lityum klorürün sitotoksik etkilerinin ve midkin düzeylerinin incelendiği bir çalışmada, kombinasyon tedavisinin sinerjistik etki göstererek maksimum düzeyde sitotoksikite oluşturduğu ve sadece lityum klorür tedavisine kıyasla midkin düzeylerinde daha çok azalma olduğu bildirilmiştir [94]. Lityum klorürün hücre döngüsüne etkilerinin A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattında ele alındığı başka bir çalışmada ise lityum klorürün hücre döngüsünü G2/M fazında durdurarak hücre döngüsünde rol oynadığı görülmüştür [95].

2.4 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Dış yörüngelerinde bir ya da birden çok eşlenmemiş elektron ihtiva etmelerinden dolayı kararsız, kısa ömürlü ve çok reaktif olan serbest radikaller, kararlı hale dönüşebilmek için başka moleküllerin elektronlarına saldırma eğilimindedir [73], [96]. Serbest radikaller nükleik asit, lipid gibi birçok biyomolekülün yapısını değiştirerek hücrede hasar oluşmasına neden olmaktadır. Örneğin serbest radikaller hücre zarındaki lipidleri hedef alıp yapılarını bozduklarında lipid peroksidasyonu ile sonuçlanmaktadır [73]. Serbest radikallerin iki sınıfı olan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) eksojen ya da endojen kaynaklarla oluşabilmektedir [97]. Eksojen kaynaklara kimyasallar, UV gibi çeşitli ışınlar, endojen kaynaklara ise mitokondri ve peroksizomlar örnek olarak verilebilmektedir [97], [98].

Antioksidanlar, serbest radikallerin birikmesiyle meydana gelen zararlı etkileri durdurma özelliğine sahiptir [99]. Fakat antioksidanların savunma potansiyelleri yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif denge bozulmaktadır ve Şekil 2.4'te görüldüğü gibi oksidatif stres meydana gelmektedir [100]. Kanser, diyabet, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar oksidatif stres oluşumuyla ilişkili olduğundan bu hastalıkların belirlenmesinde oksidatif hasarın biyobelirteçleri önemli rol oynamaktadır [98], [101]. Oksidatif hasar sonucu gelişen lipid peroksidasyonunun ürünlerinden olan malondialdehit, oksidatif stresin biyobelirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır [102].



Şekil 2.4 Oksidatif denge [103]

2.5 Antioksidanların Sınıflandırılması

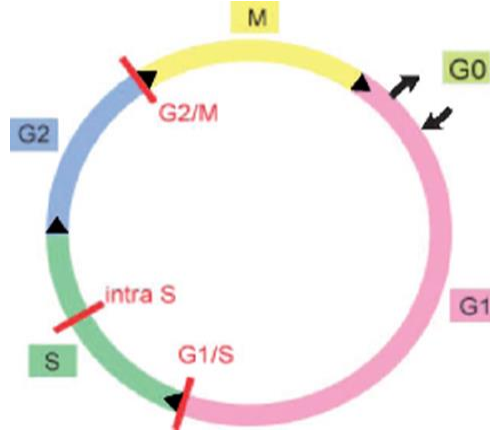
Antioksidanlar; hücrelerdeki organik moleküllere saldıran serbest radikallerin oksitleme özelliğini durdurabilen ya da oksitleme özelliğini azaltabilen bileşikler olarak adlandırılmaktadır [104]. Antioksidanların; yükseltgenme tepkimelerini durdurarak veya metalleri şelatlama ajanı olarak serbest radikalleri temizleyebildikleri bilinmektedir [105]. Antioksidanlar endojen antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar olmak üzere 2 sınıfa ayrılmaktadır [99]. Endojen antioksidanların enzimatik antioksidanlar alt sınıfında süperoksit radikalini hidrojen peroksit'e dönüştüren süperoksit dismutaz, hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan katalaz ve glutatyon aracılığıyla hidroperoksitleri etkisiz hale getiren glutatyon peroksidaz enzimleri bulunmaktadır [99], [106].

Enzimatik olmayanlar alt sınıfında ise bilirubin, ürik asit ve albumin bulunmaktadır [99], [104]. Eksojen antioksidanlar sınıfında flavonoidler, E vitamini ve C vitamini bulunmaktadır [99], [107]. Memelilerin 3 farklı süperoksit dismutaz izoformuna sahip olduğu belirlenmiştir. 1960'lı yılların sonlarına doğru ilk keşfedilen enzim izoformu Cu/Zn-SOD izoformu sitoplazma ve çekirdekte, Mn-SOD mitokondride ve EC-SOD hücre dışında (plazma gibi hücre dışındaki sıvılarda) yer almaktadır [108].

Sistein, glisin ve glutamik asit aminoasitlerinden meydana gelen glutatyon; serbest radikallerle savaşan önemli bir antioksidandır [109], [110]. Hücrelerde en çok görülen indirgenmiş glutatyon ve oksitlenmiş glutatyon olmak üzere 2 formu bulunmaktadır. Oksitlenmiş glutatyon formu serbest radikallerin artması durumunda ortaya çıkmaktadır [111]. Kofaktör olarak selenyumunu kullanan glutatyon peroksidaz, plazmada, sitoplazmanın sıvı kısmında, bağırsaklarda bulunmaktadır [112]. Glutatyon peroksidaz glutatyon aracılığıyla peroksitlerle tepkimeye girerek oksitlenmiş glutatyonun oluşumunda rol oynamaktadır. Glutatyon redüktaz ise oksitlenmiş glutatyonun nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ile birlikte reaksiyonu sonucunda redükte glutatyonun oluşmasından sorumludur [113].

2.6 Hücre Döngüsü

Hücreler bölünerek, bölünmeyi engelleyerek ya da hücre ölüm mekanizması ile hücre içinde dengenin korunmasını sağlamaktadır. Hücre döngüsü, hücrelerin bölünerek yeni hücreler meydana getirebildiği aynı zamanda genetik materyalde hasar oluşmaması için kontrol noktalarından geçmesi gereken süreci ifade etmektedir [114]. Örtü doku devamlı bölünebilirken, kas ve sinir hücreleri siklusun G0 safhasında durduğundan bölünemedikleri bilinmektedir [115]. İnterfaz; DNA'nın kendini eşleyebilmesi için hazırlanma safhası olan G1 evresini, DNA'nın kendini eşlediği S evresini ve mitoz için hazırlanma safhası olan G2 evresini kapsamaktadır. Hücre döngüsünün son basamağında ise mitoz (M) evresi (Şekil 2.5) bulunmaktadır [116], [117].



Şekil 2.5 Hücre döngüsünün evreleri ve kontrol noktaları [118]

Mitoz bölünmenin ilk safhası olan profazda hem kromozomlar yoğunlaşmaktadır hem de iğ iplikleri oluşmaktadır. Metafaz safhasında kromozomlar iğ ipliklerine bağlandıktan sonra eksenin ortasına dizilmektedir. Anafazda kromatidler zıt kutuplara ayrılmaktadır. Telofaz, sitoplazmanın bölündüğü mitozun son safhasıdır [116], [119].

Hücre siklusundaki işleyiş değiştiği takdirde hücre sayısında aşırı artış meydana gelmektedir. Hücrelerin aşırı çoğalması ve dokulara yayılması kanserleşmeye neden olmaktadır. Bu yüzden hücre döngüsündeki kontrol noktaları, kanserleşmenin önlenmesi için major rol oynamaktadır [120]. Genetik materyalin dizilerindeki bozulmaları durdurabilmek için hücre siklusunda G1/S, intra S ve G2/M olmak üzere 3 kontrol noktası bulunmaktadır [118]. Hücre döngüsü sürecinin devam edip etmeyeceği siklinler ve siklinlere bağımlı kinazlar aracılığıyla düzenlenmektedir [121].

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine kuersetin uygulanıp hücre döngüsü analizi yapıldığında hücre döngüsünü düzenleyen siklin A, siklin E proteinlerinin azaldığı ve böylelikle hücreleri S fazında durdurduğu bulunmuştur [122]. MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde yapılan başka bir araştırmada ise kuersetinin hücre döngüsünün kontrolünde rol alan p21^{CIP1/WAF1} protein miktarında arttırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir [123].

2.7 Apoptoz

Tüm organizmalar doğumdan ölüme doğru giden bir yaşam döngüsüne sahiptir [124]. Bu yaşam döngüsünün sağlıklı ilerleyebilmesi için hücrelerin çoğalması kadar hücre hasarı meydana geldiğinde hücre ölümünün gerçekleşmesi de önemlidir [125]. Paraptosis, entozis gibi birçok ölüm mekanizması var olsa da hayvanlarda temel olarak apoptoz görülmektedir [124], [125].

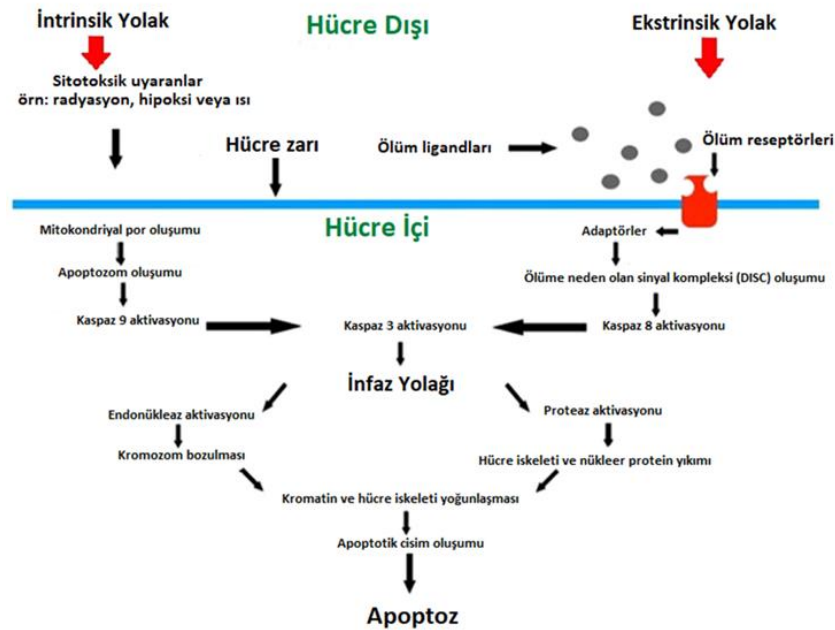
1972 senesinde kullanılmaya başlanan apoptoz kavramı Yunanca *apoptosis* sözcüğünden köken almaktadır ve ağaçtan yaprak dökülmesi anlamına gelmektedir [126], [127]. Apoptoz; embriyogenez, meme bezlerinin evrilmesi, metamorfoz ve menstrual siklus devam ederken uterus endometriumundaki hücre sayısının dengelenmesi gibi durumlarda rol alarak organizmalarda homeostazı sağlamaktadır [128], [129], [130].

Apoptoz veya nekroz ile hücre ölümü sırasında hücrelerin yapısında birçok farklılık görülmektedir. Apoptoz mekanizması devreye girdiğinde öncelikle hücreler büzüşmektedir. Çekirdek zarı ve çekirdekteki kromatin de parçalandıktan sonra sağlıklı hücrelere zarar vermeden fagositoz ile yok edilmektedir. Fakat nekroz, hücrelerin hacmini genişleterek patlamasına neden olmaktadır. Daha sonra hücre zarını parçalamaktadır ve hücre içeriğini hücre dışına dağıtarak enflamasyon oluşturmaktadır [125], [131]. Hücreyi uyaran sinyal çeşidine göre apoptoz iki farklı yolla oluşmaktadır [132]. DNA hasarı, büyüme faktörü kaybı gibi hücre içi sinyaller mitokondriyal yolağın (içsel yolak) çalışmasını tetiklerken, ölüm ligandlarının taşıdığı sinyallerin ölüm reseptörlerine iletilmesiyle ekstrinsik yolak aktif hale getirilmektedir [132], [133]. Apoptoz sürecini farklı sinyallerle başlatan bu yollar daha sonra efektör kaspazlarda bir araya gelmektedir [132]. Apoptoz mekanizmasının işleyişini esas olarak kaspazlar, Bcl-2 ailesi ve p53 belirlemektedir [134].

Memelilerde mevcut olan kaspazlar fonksiyonlarına göre; başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazlar ve sitokin aktivatörleri olarak üç gruba ayrılmaktadır. Kaspaz-2, -8, -9 ve -10 başlatıcı kaspazlardır. Kaspaz-3, -6, -7 ve -14 hedef (efektör) kaspaz üyeleridir. Kaspaz-1, -4, -5, -11, -12 ve -13 ise sitokin aktivatörleri olarak rol almaktadır [135], [136].

Bcl-2 ailesi hem proapoptotik hem de antiapoptotik proteinleri içermektedir. Antiapoptotik proteinler arasında Bcl-2, Bcl-w ve Mcl-1 yer almaktadır. Proapoptotik proteinler de yapısındaki domaine göre çoklu alan proteinleri ve sadece BH3 proteinleri olmak üzere 2 sınıfta değerlendirilmektedir [134]. Sadece BH3 proteinleri sınıfında; Puma, Bad, Bid, Bik, Noxa ve Hrk bulunmaktadır. Çoklu alan proteinleri sınıfında ise Bax, Bok ve Bak yer almaktadır [137], [138]. Hücrenin yaşam döngüsünün dengelenebilmesi için p53, DNA tamir mekanizmasında regülatör protein olarak vazife görmektedir. Fakat DNA hasarını tamir edemediği durumda ise apoptoz sürecini başlattığı bilinmektedir [139].

Ekstrinsik yolak; TNF- α , Fas-L veya TRAIL ligandının sırasıyla TNFR-1, Fas, TRAILR1/TRAILR2 ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla indüklenmektedir. Bu etkileşim sonucu ölüm reseptörleri konformasyonel değişiklik geçirmektedir. FADD / TRADD adaptör proteinleri ilk basamakta oluşan protein kompleksine bağlanarak prokaspaz-8 veya prokaspaz-10 enzimleri ile etkileşime girmektedir. Böylece Şekil 2.6'da görüldüğü gibi DISC meydana gelmektedir. Aktif hale geçen kaspaz-8 ve kaspaz-10 bazı hücrelerde efektör kaspazları aktive ederek apoptoz sürecinin tamamlanmasını sağlamaktadır [140]. Bazı durumlarda ise aktif kaspaz-8, proapoptotik protein olan Bid'i kesip içsel yolağın da katılmasını sağlayarak apoptoz sürecini ilerletmektedir [135].



Şekil 2.6 Apoptozun içsel ve dışsal yolları [141]

İçsel yolak; serbest radikaller, hipoksi gibi eksojenler aracılığıyla veya sitokin yokluğu gibi endojenler aracılığıyla başlamaktadır. Hem eksojen hem de endojen uyarıcılar mitokondrinin dış zarında por oluşumuna neden olmaktadır [142]. Sitokrom c, mitokondrinin dış zarında oluşan porlarından sitozole doğru ilerlemektedir. Daha sonra sitokrom c, sitozolde Apaf1'e bağlanarak apoptozomu oluşturmaktadır. Apoptozom da kaspaz 9'u aktif hale getirmektedir ve bu oluşan kompleks yapı kaspaz 3 enzimini çalıştırmaktadır [143]. Aktif durumdaki kaspaz-3 ise CAD'ı serbest bırakmaktadır. Daha sonra CAD, nukleustaki kromatini kompakt hale getirmektedir ve DNA'nın alt birimlere bölünmesiyle apoptoz sürecini sonlandırmaktadır [124].

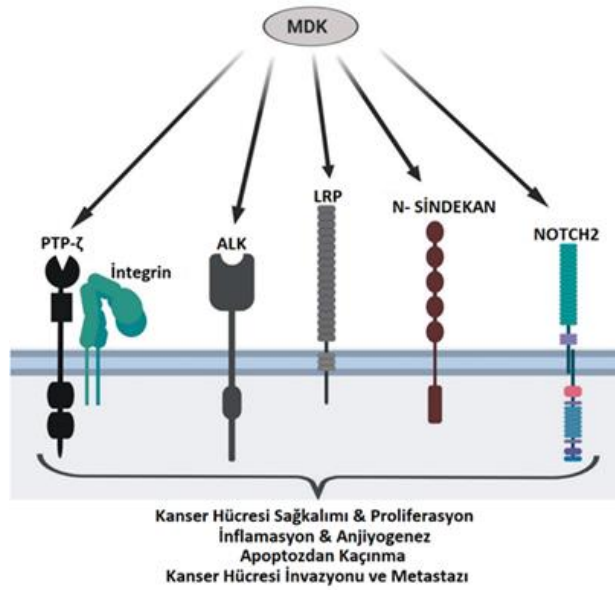
Apoptoz mekanizmasının işleyişinde bozukluk olduğu takdirde hücre homeostazı korunamaz hale gelmektedir. Dolayısıyla normalden çok daha fazla hücre yığılmaktadır ve kanser sürecini indüklemektedir. Nörodejeneratif rahatsızlıkların oluşumunda ise hücrelerin yoksunluğu söz konusudur [128].

Apoptozun gözlemlenebilmesi adına morfolojik görüntüleme yöntemleri, Anneksin V gibi immunohistokimyasal yöntemler, akış sitometri analizi gibi biyokimyasal yöntemler, ELISA gibi immünolojik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır [144], [145].

2.7.1 Midkin

Midkin, sistein aminoasidi bakımından zengin bir sitokindir. Heparine bağlanan büyüme faktörü olarak da tanımlanmış olan midkin proteini 13 kDa moleküler ağırlığına sahiptir. Bu protein, N-bölgesi ve heparin bağlama yeteneğine sahip C-bölgesi olmak üzere 2 bölgeden meydana gelmektedir [146], [147]. İnsanlarda midkin, MDK geni tarafından kodlanmaktadır [148].

Şekil 2.7'de görüldüğü gibi midkinin Notch2, LRP1, protein tirozin fosfataz-zeta, ALK, proteoglikanların üyesi olan sindekan 3 ve integrinler olmak üzere 6 reseptöre bağlanabildiği belirlenmiştir [149], [150].



Şekil 2.7 Midkinin farklı plazma membran reseptörleri ile etkileşimleri [151]

Midkin, protein tirozin fosfataz-zeta reseptöründe bulunan kondroitin sülfat bölgesiyle önemli derecede birleşme eğilimi göstermektedir [148], [152]. Midkinin embriyogenez döneminde yüksek düzeyde eksprese edildiği fakat yetişkinlik döneminde ise sağlıklı dokularda gen anlatımı düzeyinin çok daha az olduğu bilinmektedir [152], [153].

Yetişkinlerde midkin ekspresyonunun görülmesi hipertansiyon, romatizmal eklem iltihabı gibi hastalıklarla ilişkilidir veya kanser hücrelerinde mitojenik etki göstererek artmalarına işaretir [154], [155]. HepG2 insan hepatom hücre hattında midkinin antiapoptotik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, kaspaz-3 enzimini inaktive ederek aktinomisin D ilacı ve TRAIL ligandının başlattığı apoptozu engellediği görülmüştür [156].

LTEP-a2 ve A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hatlarında östradiolün midkin ekspresyonuna etkilerinin incelendiği bir araştırmada östradiolün epital - mezenkimal geçişi hızlandırarak midkin ekspresyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir [157].

Meningiyom hücrelerinde midkinin antiapoptotik özelliğinin incelendiği bir çalışmada midkinin kaspaz-3 enzimini inaktive ederek kamptotesinin başlattığı apoptozu engellediği gözlenmiştir [158].

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC) hücrelerinde midkinin hücre göçüne etkisinin ele alındığı bir araştırmada tetraspanin 1'in integrin $\alpha 6\beta 1$ 'e bağlanmasını teşvik ettiği ve FAK-Stat1 α yolunu etkinleştirerek hücre göçünü artırıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir [159].

İmatinib mesilat ile noskapin kombinasyon tedavisinin T98G insan glioblastoma hücre hattındaki etkilerine bakılan bir çalışmada imatinib mesilat ile noskapinin antagonistik etki göstererek 72. saatte midkin düzeyinde artışa neden olduğu belirlenmiştir [160].

SGC7901 ve BGC823 insan mide kanseri hücrelerinde midkinin Akt ve ERK1/2 sinyal yolları aracılığıyla kanserli hücre sayısında artışa neden olduğu görülmüştür [161].

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Bilgisayar - Philips
- Bozdolabı - Bosch
- CO₂ İnkübatör - N- Biotek Nb-203 XL
- Distile Su Cihazı - Sartorius Arium Pro
- -80°C Dondurucu - Thermo Scientific
- ELISA Okuyucu - BioTek PowerWave XS2
- Flow Sitometri - BD FACS Calibur
- Hassas Terazi - Shimadzu
- Karıştırıcılı Isıtıcı - Isolab
- Laminar Flow Kabin - Hedlab X-Bio Class II
- Mini Santrifüj Cihazı – Hermle Z 206 A
- Otoklav - Hermle
- pH Metre - Hanna
- Pipet 0,2 - 2 µl - Thermo Lab
- Pipet 100 - 1000 µl - Thermo Lab
- Pipet 2 - 20 µl - Rainin
- Pipet 10 - 100 µl - Rainin

- Pipet 20 - 200 µl - Rainin
- Santrifüj Cihazı - Beckman Coulter Allegra X-30 R
- Sıvı Azot Tankı - International Cryogenics, Inc. 20R
- Ters Floresan Mikroskop - ZEISS AxioVert01
- Vorteks - Velp Scientifica

3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

- 6, 24 ve 96 Kuyucuklu Mikroplakalar - NEST
- Beher - ISOLAB
- 25 ve 75 cc'lık Flasklar - NEST
- Kriyotüp - ISOLAB
- Lamel - ISOLAB
- Parafilm - Bemis
- Serolojik Pipetler - CAPP
- Steril Falkonlar - CAPP
- Steril Plastik Pipet Uçları - ISOLAB
- Şişeler - Schott DURAN
- Thoma Lamı - ISOLAB

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

- Amonyum Sülfat - Sigma Aldrich
- Bakır (II) Klorür - Sigma Aldrich
- Bovin Serum Albümin
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) - ChemCruz
- Disodyum Fosfat - Sigma Aldrich
- 5-5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoik asit) - Sigma Aldrich

- Dulbecco's Modified Eagle Medium / F12 Nutrient Mix (Ham) - Sigma Aldrich
- EDTA Disodyum - Sigma Aldrich
- Esansiyel Olmayan Aminoasitler - Gibco
- Fetal Bovin Serum - PAN BIOTECH
- Hidroklorik Asit - Sigma Aldrich
- İnsan Midkin ELISA Kiti - BOSTER
- Ksantin - Sigma Aldrich
- Ksantin Oksidaz - Sigma Aldrich
- Kuersetin - Sigma Aldrich
- L-Glutamin 200 mM - Gibco
- Lityum Klorür - Merck
- Metafosforik asit - Sigma Aldrich
- Nitroblue Tetrazolium - Sigma Aldrich
- Penisilin - Streptomisin (PEST) - Sigma Aldrich
- Potasyum Sitrat - Sigma Aldrich
- Propidyum İyodür İle FITC Anneksin V Apoptoz Kiti - BioLegend
- SMART™ BCA Protein Assay Kiti
- Sodyum Hidroksit - Sigma Aldrich
- Sodyum Karbonat - Sigma Aldrich
- Sodyum Klorür - Sigma Aldrich
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - Sigma Aldrich
- Tiyobarbitürik Asit - Sigma Aldrich
- Trikloroasetik Asit - Sigma Aldrich

- Tripan Mavisi - Sigma Aldrich
- Tripsin EDTA - Sigma Aldrich
- Tris - Sigma Aldrich
- Triton X-100 - Sigma Aldrich

3.2 Metod

3.2.1 MCF-7 ve CCD Hücrelerinin Kültürü

MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı, adenokarsinomu olan bir kadın hastanın plörezisinden ayrıştırılarak elde edilmiştir. Bu ayrıştırma Michigan Kanser Vakfı'nda gerçekleştirildiğinden dolayı hücre hattına kuruluşun adı verilmiştir [162]. Kriyotüp içerisindeki MCF-7 ve CCD hücre hatları sıvı azot tankından çıkarılıp, behere koyulan oda sıcaklığındaki steril suda çözülmüştür. MCF-7 ve CCD hatlarının büyümesi için 50 ml'lik falkon tüpüne 1:1 oranında DMEM/F12, %10 FBS, %1 penisilin - streptomisin ve 500 mikrolitre esansiyel olmayan amino asitler eklenerek tamamlanmış besiyeri hazırlanmıştır. Daha sonra kriyotüpteki hücreler tamamlanmış besiyerinden bir miktar alınarak 15 m'lik falkona aktarılmıştır. Falkon tüpündeki hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra oluşan süpernatant (üst faz) atılmıştır.

Falkon tüpünün dibinde kalan hücre pelletine tamamlanmış besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Hücreler yoğunluklarına göre 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklara ekilmiştir. Hücreler çoğaltılmak üzere 37°C'de %5 CO₂ ihtiva eden ortamda inkübe edilmiştir.

3.2.2 MCF-7 ve CCD Hücrelerinin Pasajlanması

Flasktaki hücreler inkübatörden çıkarılıp mikroskopta incelenmiştir. Flask yüzeyine tutunarak büyüyen hücreler, yaklaşık %80 konfluent olduğunda pasajlanmıştır. Pasajlama işleminin ilk aşamasında flask, besiyerinin uzaklaştırılması için pH: 7.4'teki PBS ile yıkanıp yavaşça çekilmiştir. Daha sonra peptit bağlarını kırarak hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlayan tripsin - EDTA ile flask yüzeyi yıkanmıştır. Flask 2-3 dakika inkübatörde bekletilmiştir.

Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı mikroskopta kontrol edildikten sonra tamamlanmış besiyeri hazırlanmıştır. Sonra flastaki kalkan hücreler, tamamlanmış besiyerinden bir miktar alınarak 15 ml'lik falkona aktarılmıştır. Falkon tüpündeki hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra süpernatant atılmıştır. Dibe çöken pelletin üzerine tamamlanmış besiyeri eklenerek birkaç kez pipetaj yapıp homojen hale getirildikten sonra yeni flastlara eşit miktarda aktarılmıştır. %5 CO₂ içeren 37°C inkübatöre koyulmuştur.

3.2.3 MCF-7 ve CCD Hücrelerinin Dondurulması

%90 FBS, %10 DMSO eklenerek dondurma solüsyonu hazırlanmıştır. Flastan hücrelerin tamamlanmış besiyeri çekilip, PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra flask çeperleri yıkanarak tripsin enzimi eklenmiştir. Flask 2 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Mikroskopta incelenen flastaki hücreler, flask yüzeyinden kalkınca yan yüzeyler yıkanarak tamamlanmış besiyeri eklenmiştir.

Yıkanarak alınan hücreler, 15 ml'lik falkona aktarılmıştır. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmıştır. Dibe çöken pelletin üzerine 1 ml dondurma solüsyonu eklenip hızlı bir şekilde pipetaj yapılmıştır. Kriyotüpe aktarılan hücreler bir gece -80°C'de bekletilmiştir. Ertesi gün sıvı azot tankına (-196°C) kaldırılmıştır.

3.2.4 Farklı Konsantrasyonlarda Kuersetin Hazırlanması

500 mikromolar birinci (ana) stok için 1,209 mg kuersetin tartılmıştır. 8 mikrolitre DMSO ve 7992 mikrolitre tamamlanmış besiyerinde çözdürülmüştür. Hazırlanan birinci stoktan 400, 300, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 mikromolar olacak şekilde seyreltilmiştir. Hazırlanan stoklar sırasıyla pipetaj yapılarak kuyucuklara eklenmiştir.

3.2.5 Farklı Konsantrasyonlarda Lityum Klorür Hazırlanması

500 milimolar birinci (ana) stok için 0,381 mg lityum klorür tartılmıştır ve tamamlanmış besiyerine eklenmiştir. Hazırlanan birinci stoktan 400, 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 75 ve 50 milimolar olacak şekilde seyreltilmiştir. Hazırlanan stoklar sırasıyla pipetaj yapılarak kuyucuklara eklenmiştir.

3.2.6 MTT Analizi

Hücre canlılığının belirlenebilmesi için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir [163]. Bu yöntem canlı hücrelerdeki dehidrogenazın sarı renkteki MTT tuzundan suda çözünemeyen mor renk formazan oluşturmaya dayanmaktadır [164]. Formazanın çözünabilir hale gelebilmesi için DMF ya da DMSO eklendikten sonra ELISA okuyucuda 570 nm'de okuması yapılmaktadır [165], [166].

MCF-7 insan meme kanseri hücreleri ve CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücreleri için aynı prosedür uygulanmıştır. Thoma lamına eklenen tripan mavisi boyası ile mikroskopta hücre sayımı yapılmıştır. 96 kuyucuklu mikrolakaların her bir kuyucuğuna 10^4 hücre/ml'de olacak şekilde ekilen hücreler 24 saat %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki hücrelere kuersetinin 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mikromolar konsantrasyonları, lityum klorürün 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400 ve 500 milimolar konsantrasyonlarının her biri 4 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Mikrolakalar 24 ve 48 saat için inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından mikrolakalardaki hücreler mikroskopta incelenip görüntüleri çekilmiştir. Sonra kuyucuklardaki hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 50 mikrolitre MTT çözeltisi eklenmiştir ve 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saat inkübasyonun ardından oluşan mor renk formazan kristalini çözmek için 100 mikrolitre DMSO eklenmiştir. Formazan kristallerinin çözünmesinin ardından 570 nm'de ELISA okuyucuda okunmuştur.

3.2.7 MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Lizatlarının Hazırlanması

MCF- insan meme kanseri hücrelerine 24 ve 48 saat kuersetinin belirlenen IC₅₀ dozu (100,9 mikromolar), lityum klorürün belirlenen IC₅₀ dozu (95,55 milimolar) ve kombinasyonları uygulanmıştır. Kontrol grubu için hücreler de ayrıca flasklarda kültüre edilmiştir. 24 ve 48 inkübasyonun ardından hücrelerin besiyerleri çekilmiştir ve flasklara tripsin - EDTA eklenip hücrelerin flask yüzeyinden kalkması sağlanmıştır.

Kalkan hücreler 15 ml'lik falkonlara alınmıştır ve 5 ml PBS eklenmiştir. Hücreler 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra süpernatant atılmıştır. Pelletlere 1 ml PBS eklenmiştir. Lizatlar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.8 Protein Miktar Tayini (BCA Yöntemi)

Bikinkoninik asit tayini, bakır iyonuna duyarlı olan bikinkoninik asit kullanılarak, proteinlerin alkali ortamda Cu^{2+} 'yi Cu^{1+} 'e indirgemesi sonucu mor renk oluşumu esasına dayanmaktadır. Mor renk oluşumunun ardından 562 nm'deki absorbans değerleri ölçülmektedir [167], [168]. SMART™ BCA Protein Assay Kiti (iNtRON Biotechnology, Cat. No. 21071) ile MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde protein miktar tayini yapılmıştır. İlk aşamada kitte yer alan BSA çözeltisi ile protein standart eğrisi oluşturulmuştur. Kontrol grubu, 100.9 mikromolar kuersetin çözeltisi, 95.55 mM lityum klorür çözeltisi ve kombinasyonlarını içeren her bir örnekten 25 mikrolitre çekilip 96 kuyucuklu mikrolakaya ekilmiştir. Kitte bulunan A çözeltisinden 1000 mikrolitre, B çözeltisinden 20 mikrolitre çekilip karıştırılarak hazırlanan çözeltiden 200 mikrolitre çekilip örneklerle eklenmiştir. Örneklerin çözeltilerle iyice karışması için pipetaj yapılmıştır. Mikrolaka 30 dakika 37°C'de inkübatörde bekletilmiştir.

İnkübasyonun ardından mikrolaka oda sıcaklığında soğutulmuştur ve ELISA okuyucuda 562 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. Örneklerdeki total protein miktarları, BSA çözeltisiyle hazırlanıp çizilen standart eğri kullanılarak mg/ml cinsinden bulunmuştur.

3.2.9 Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu hücre zarlarında bulunan lipidlerin serbest radikaller tarafından yapısının bozularak çeşitli peroksitler ve aldehitler meydana getirmesi olarak adlandırılmaktadır. Malondialdehitin ise oksidatif stresin artmasıyla meydana gelen bu sürecin son ürünlerinden biri olduğu bilinmektedir [169]. Lipid peroksidasyonu tiyobarbitürik asitin (TBA) malondialdehit gibi tiyobarbitürik asit reaktif maddelerle (TBARS) reaksiyona girmesini esas alarak spektrofotometrik ölçümü ile belirlenmiştir [170], [171].

0,25 molarlık hidroklorik asit, %15'lik trikloroasetik asit, %3,75'lik tiyobarbitürik asit beherde karıştırılarak TBA reaktifi hazırlanmıştır. Akabinde TBA reaktifinin çözünmesi için hafifçe ısıtılmıştır. 100 mikrolitre örnek üzerine 200 mikrolitre TBA reaktifi eklenmiştir ve tüplerdeki örnekler 15 dakika boyunca 100°C suda kaynatılmıştır.

Örneklerin oda sıcaklığında soğumasının ardından 5 dakika boyunca 3000g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilmesinin ardından elde edilen süpernatantlar alınmıştır ve 535 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. Örneklerdeki MDA miktarları standart eğri grafiği kullanılarak MDA/mg protein cinsinden bulunmuştur.

3.2.10 Redükte Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

5,5-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB - Ellman Reaktifi) glutasyonla tepkimeye girerek oksitlenmiş glutasyon ve 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) açığa çıkarmaktadır [172]. Yöntem; açığa çıkan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin (TNB), bazik ortamda 412 nm'de spektrofotometrik ölçümünü temel almaktadır [173]. 0,32 gram metafosforik asit, 0,02 gram EDTA disodyum tuzu, 5,8 gram NaCl tartılıp 20 ml distile suda çözülerek proteinsizleştirme çözeltisi hazırlanmıştır. 1,067 gram disodyum fosfat tartılıp 20 ml distile suda çözülerek fosfat çözeltisi hazırlanmıştır. 0,2 gram potasyum sitrat tartılıp 20 ml distile suda çözülmüştür ve 7,92 gram DTNB tartılıp potasyum sitrat çözeltisine eklenerek Ellman Reaktifi elde edilmiştir.

Örneklerden 200 µl alınıp üzerine 300 µl proteinsizleştirme çözeltisi eklenmiştir. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. 10 dakika 2000g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlardan 50'şer mikrolitre kuyucuklara koyulmuştur. Daha sonra 0,2 ml fosfat çözeltisi, 25 µl Ellman Reaktifi eklenip spektrofotometrede 412 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Örneklerdeki redükte glutasyon miktarları standart eğri grafiği kullanılarak µg glutasyon cinsinden bulunmuştur.

3.2.11 Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz enziminin görevi süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucunda hücrelere daha az zarar veren hidrojen peroksit oluşmasını sağlamaktadır [174]. Süperoksit dismutaz aktivitesi, süperoksit radikalinin belirteci olan +2 değerlikli nitroblue tetrazolyumun (NBT⁺²) redüksiyonundan oluşan formazanın 560 nm'de spektrofotometrik ölçümü temel alınarak hesaplanmıştır [175].

1,836 mg ksantin tartılmıştır. Üzerine 1 molarlık NaOH'dan 2 damla damlatılıp çözüldükten sonra son hacim 40 ml'ye tamamlanarak ksantin çözeltisi hazırlanmıştır. 4,46 mg EDTA disodyum tartılıp 20 ml distile suda çözülerek 0,6 milimolarlık EDTA disodyum çözeltisi hazırlanmıştır. 20 ml distile suya 2,46 mg NBT eklenerek NBT çözeltisi hazırlanmıştır. 0,84 gram Na₂CO₃ tartılıp distile suda çözülerek hacim 20 ml'ye tamamlanmıştır.

25 mg BSA tartılıp 25 ml distile suya BSA eklenerek hazırlanmıştır. Bu şekilde 0,3 mg ksantin, 0,6 mM EDTA disodyum, 150 µg/ml NBT, 400 mM Na₂CO₃ ve 1mg/ml BSA çözeltileri eklenerek reaktif çözelti elde edilmiştir. Reaktif çözeltinin pH değeri: 10,2'ye ayarlanmıştır. Ayrıca inkübasyon sonrası durdurma solüsyonu olarak kullanılmak üzere 1,074 mg CuCl₂ 10 ml distile suda çözülmüştür.

Tüplerdeki her bir 100 mikrolitre örneğe 245 mikrolitre reaktif çözelti ve ardından 10 mikrolitre ksantin oksidaz eklenmiştir. Tüplerdeki örnekler 25°C 20 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası her bir 100 mikrolitre CuCl₂ eklenmiştir. Örnekler, kördeki distile suya karşı 560 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Örneklerdeki SOD aktivitesi standart eğri grafiği kullanılarak U/mg protein cinsinden bulunmuştur.

3.2.12 Flow Sitometri Analiziyle Apoptoz Tayini

Flow sitometride lazer ışığı, örneklerin lazer ışığa taşınmasında rol alan akış sistemi, hücre süspansiyonunu floresan boyalarla seçebilen optik sistem ve bilgisayar yazılım sistemi bulunmaktadır [176], [177]. Flow sitometri analizi akış sisteminde yer alan bakterilerin, virüslerin ya da hücrelerin lazerden geçirilmesinin ardından floresan boyalar aracılığıyla boyutlarının ve iç yapılarının tespit edilebilmesi prensibine dayanmaktadır [178]. Stimülasyonsuz lityum klorür (95,55 mM), kuersetin (100,9 µM) ve her iki kombinasyon varlığında MCF-7 insan meme kanseri hücreleri 24 ve 48 saat boyunca inkübatörde kültüre alınmıştır. Apoptotik indeksin flow sitometrik ölçümünde apoptoz deteksiyon kiti (BioLegend, Cat. No. 640914) kullanılmıştır. Fosfatidilserin apoptoza girmeyen hücrelerde hücre zarının içeriye bakan yüzeyinde yer alırken, apoptoza giden hücrelerde hücre zarının dış yüzeyine doğru geçiş yapmaktadır. Anneksin V proteini ise fosfatidilserine bağlanabilme özelliğine sahiptir [179].

Floresan izotiyosiyanat (FITC) ile konjuge Anneksin V antikoruyla birlikte kullanıldığında apoptoza giden hücreler gözlemlenebilmektedir. Nekroza uğrayan hücre zarları da Anneksin V ile etkileşime girebildiğinden dolayı, ölü hücrelerin tayininde propidyum iyodür kullanılmaktadır [144].

Hücreler kültür plaklarından toplanıp iki defa yıkandıktan sonra üst sıvı dökülmüştür ve tüplere 100 µl Anneksin V Bağlama Tamponu eklenmiştir. $0,25 - 1 \times 10^7$ hücre/ml konsantrasyonunda tüplere 5 µl Anneksin V - FITC ve ortamdaki ölü hücrelerin belirlenebilmesi amacıyla 5 µl propidium iyodür (PI) pipetlenerek 15 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından her tüpe 400 µl Anneksin V Bağlama Tamponu eklenmiştir. Örnekler BD FACS Calibur cihazında analiz edilmiştir.

3.2.13 ELISA Yöntemiyle Midkin Ekspresyonunun Belirlenmesi

Lityum klorür (95,55 mM), kuersetin (100,9 µM) ve her iki kombinasyon varlığında MCF-7 insan meme kanseri hücreleri ve CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücreleri 24 ve 48 saat boyunca inkübatörde kültüre alınmıştır. İnkübasyonun ardından tükenen besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklar PBS ile yıkanıp her kuyucuğa 300 µl tripsin eklenmiştir. Tripsin ile kalkan hücreler 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilip süpernatantları atılmıştır. Sonra pH: 7.4'e ayarlanan soğuk PBS eklenmiştir ve 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjin ardından 150 mM NaCl, %1 Triton X-100 ve pH'ı 8 olan 50 mM Tris ile hazırlanan NP40 lizis tamponundan her bir kuyucuğa 500 µl eklenmiştir. Elde edilen 500 µl'lik hücre lizatları 20 dakika buz üzerinde inkübe edilirken 5 dakika aralıklarla vortekslenmiştir. Buz üzerindeki inkübasyonun ardından hücre lizatları 10.000 rpm'de 4°C 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlarda midkin ekspresyonu midkin deteksiyon kiti (Boster, Cat. No. EK1235) protokolüne göre belirlenmiştir. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında kontrol, kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavi grupları 5 tekrarlı, CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerinde ise 4 tekrarlı uygulanmıştır. Öncelikle tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilip standartlar hazırlanmıştır. Kuyucuk başına 100 mikrolitre standart, örnek ve kontrol grupları eklenmiştir.

Kontrol grubundaki hücelere 100 mikrolitre örnek seyreltici eklenmiştir. Daha sonra hüceler mikrolakanın üzeri plaka kapatıcı ile kapatılarak 37 °C inkübatörde 90 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvılar çekilip atık kabına atılmıştır. Akabinde her kuyucuğa hazırlanmış 1x biyotinlenmiş anti-insan MDK antikorundan 100 mikrolitre eklenmiştir. Sonra hüceler mikrolakanın üzeri plaka kapatıcı ile kapatılarak 37 °C inkübatörde 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından mikrolaka 1x yıkama tamponu ile 3 defa yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa hazırlanmış 1x avidin-biyotin-peroksidaz kompleksinden 100 mikrolitre eklenmiştir ve plaka kapatıcı ile kapatılarak 37 °C inkübatörde 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından mikrolaka 1x yıkama tampon ile her yıkamada 300 mikrolitre eklenmek üzere 5 defa yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa 90 mikrolitre renk geliştirme reaktifinden eklenmiştir.

Akabinde hüceler mikrolakanın üzeri plaka kapatıcı ile kapatılarak 37 °C inkübatörde 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 100 mikrolitre durdurma solüsyonu eklenmiştir. Her bir kuyucuğun sarı renge döndüğü görülmüştür. Reaksiyonun durmasının ardından 450 nm’de ELISA okuyucuda absorbans değerleri okunmuştur.

3.2.14 İstatistiksel Analizler

GraphPad Prism 8.0.2 programında; MTT analizi ile, MDA, GSH, SOD tayinlerinin sonuçları Two Way ANOVA testi ile hesaplanmıştır. İstatistiksel açıdan $p < 0,005$ ve $p < 0,001$ olan değerler anlamlı sayılmıştır. Kuersetin ile lityum klorür kombinasyonunun MCF-7 hücrelerindeki antagonistik etkisi CompuSyn yazılımında belirlenmiştir. Flow sitometri veri analizleri için FlowJoTM10.2 (Tree Star Inc., USA) analiz programı kullanılmıştır. Flow sitometri ve midkin düzeylerinin sonuçları SPSS programında hesaplanmıştır. Sayısal değişkenlerde normal dağılım sergileyenler aritmetik ortalama ve standart sapma olarak hesaplanmıştır. Ancak normal dağılım göstermeyen sayısal değişkenlerin medyan, minimum ve maksimum değerleri hesaplanmıştır.

Verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi, histogram grafikleri değerlendirmeleri sonucu belirlenmiştir. Normal dağılım sergilemeyen ikili grupların karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılarak normal dağılım sergileyen ikili grupların karşılaştırılmasında Paired Sample T testi kullanılarak hesaplanmıştır. Apoptoz ve midkin deneylerinde anlamlılık düzeyleri $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ değerleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

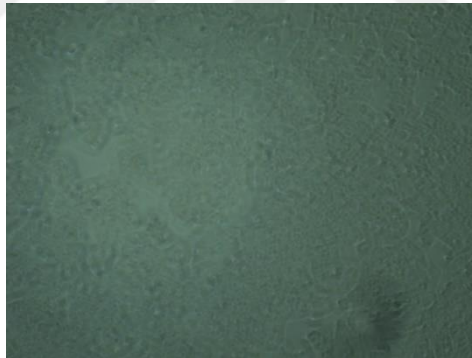


4.1 Sonuçlar

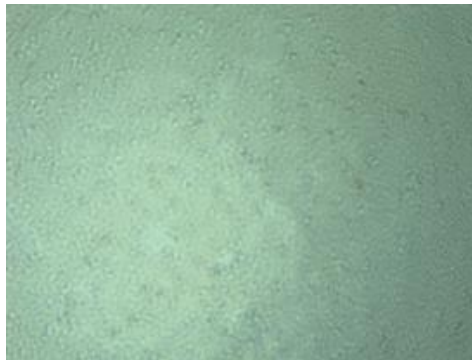
4.1.1 Kuersetin, Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon

Tedavisinin MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerindeki Sitotoksik Etkileri

Kuersetinin 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mikromolar konsantrasyonları MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra inverted mikroskopta görüntüleri alınmıştır. Daha sonra MTT ile sitotoksik etkisi belirlenmiştir. 24 saatte kuersetin eklenen kuyucukların düşük konsantrasyonlarında kontrol grubundaki hücelere göre morfolojik olarak farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2). 500 μ M kuersetinin ise Şekil 4.3'te görüldüğü gibi hücrelerin %65'ini inhibe ettiği görülmüştür.



Şekil 4.1 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)

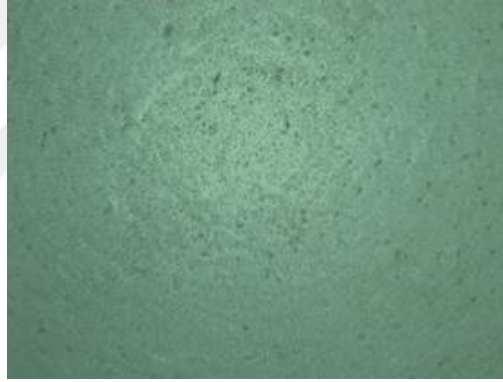


Şekil 4.2 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (100 μ M kuersetin) (5x)

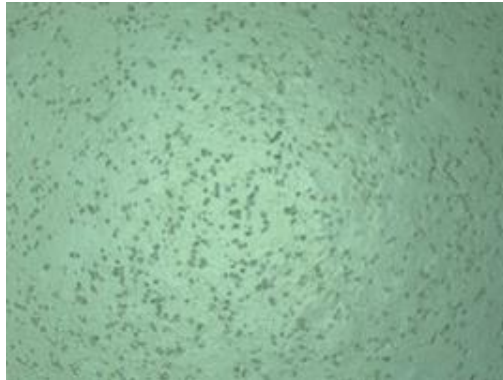


Şekil 4.3 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (500 µM kuersetin) (5x)

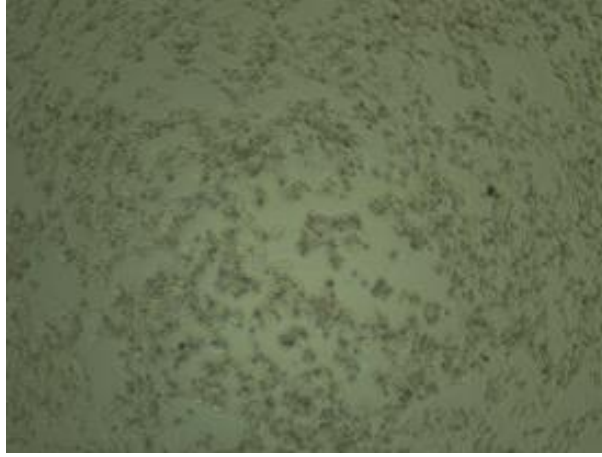
48 saatte MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine uygulanan kuersetin konsantrasyonu arttıkça ölü hücre sayısında kontrol grubuna kıyasla artış olduğu inverted mikroskopta gözlemlenmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5). 500 µM kuersetinin ise hücrelerin %67'sini inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.4 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)



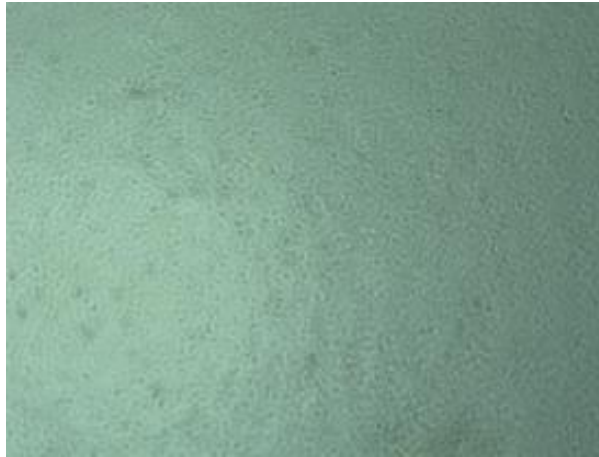
Şekil 4.5 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (100 µM kuersetin) (5x)



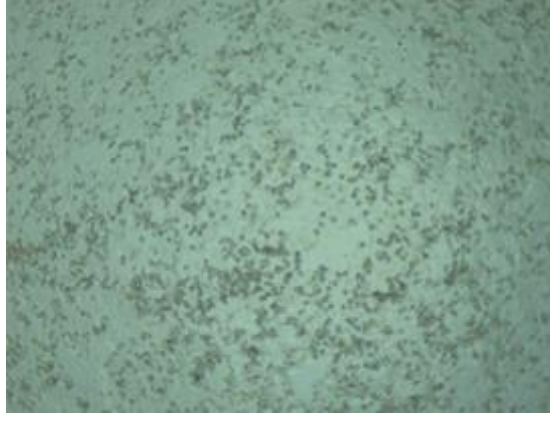
Şekil 4.6 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (500 μ M kuersetin) (5x)

Lityum klorürün 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400 ve 500 milimolar konsantrasyonları MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra inverted mikroskopta görüntüleri alınmıştır. Daha sonra MTT ile sitotoksik etkisi belirlenmiştir.

24 saatte kontrol grubundaki hücrelerin sağlıklı oldukları (Şekil 4.7), lityum klorür eklenen kuyucukların düşük konsantrasyonlarında kontrol grubundaki hücrelere göre morfolojik olarak belirgin farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. 100-500 mM lityum klorür konsantrasyon aralığında ise konsantrasyon arttıkça ölü hücre sayısında artış olduğu inverted mikroskopta gözlenmiştir (Şekil 4.8, 4.9).



Şekil 4.7 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)

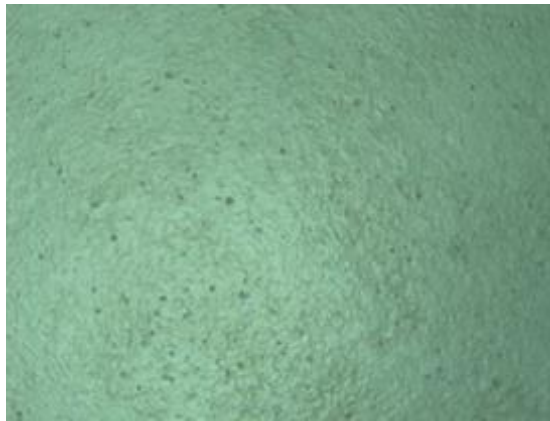


Şekil 4.8 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (100 mM LiCl) (5x)

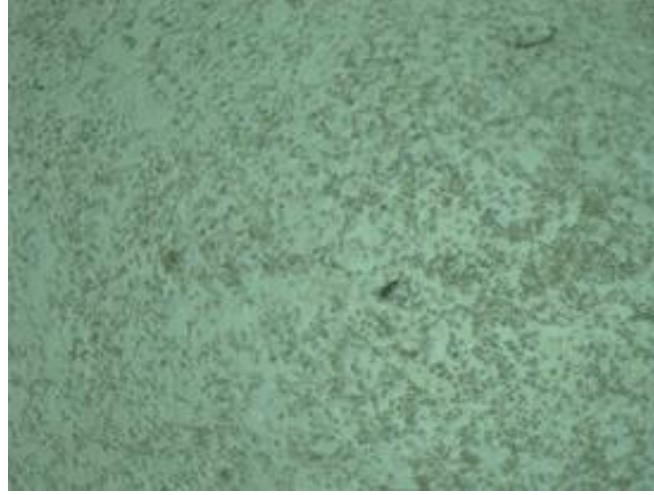


Şekil 4.9 MCF-7 hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (500 mM LiCl) (5x)

48 saatte kontrol grubundaki hücrelerin morfolojilerinin düzgün olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10). 48 saatte MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine uygulanan lityum klorür konsantrasyonu arttıkça hücre canlılık oranının azaldığı inverted mikroskopta belirgin bir şekilde görülmüştür (Şekil 4.11, Şekil 4.12).



Şekil 4.10 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)

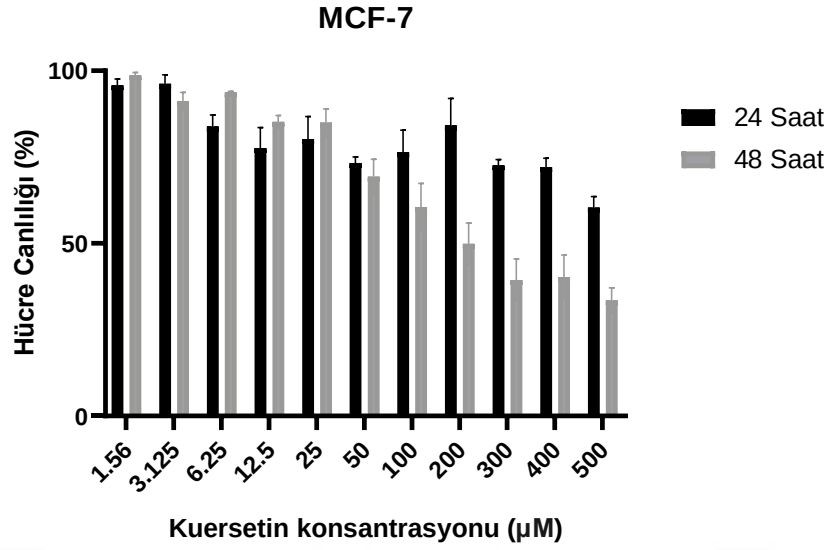


Şekil 4.11 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (100 milimolar LiCl) (5x)



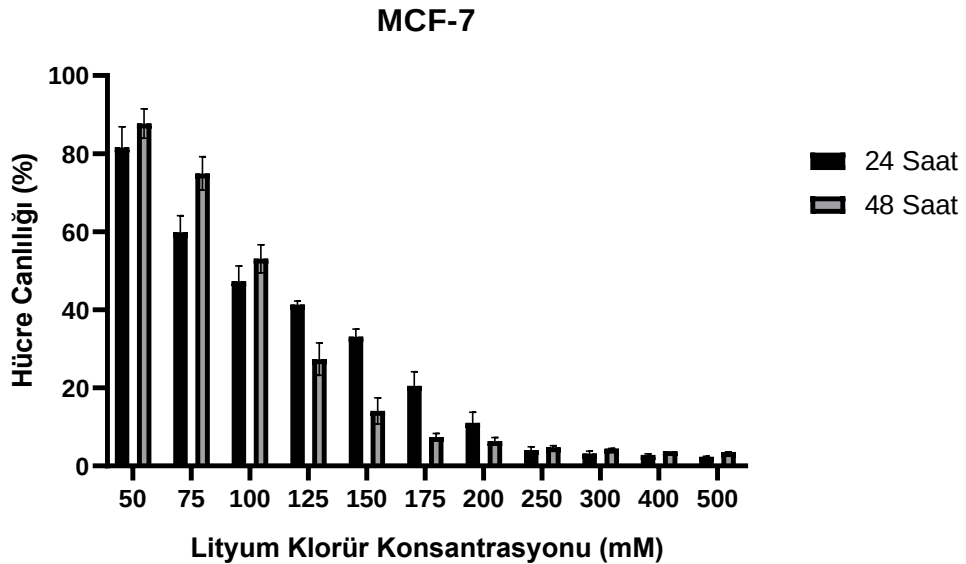
Şekil 4.12 MCF-7 hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (500 milimolar LiCl) (5x)

Şekil 4.13’de farklı konsantrasyonlarda kuersetin tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri gösterilmiştir. Kuersetinin düşük dozlarının 24 ve 48 saatte hücre proliferasyonuna bir etkisi olmadığı görülmüştür. 500 μ M kuersetin (en yüksek doz) tedavisi 48 saat uygulandığında hücre canlılığının %33’e düştüğü tespit edilmiştir. Kuersetinin 48 saatteki IC_{50} dozu 100,9 μ M olarak belirlenmiştir.



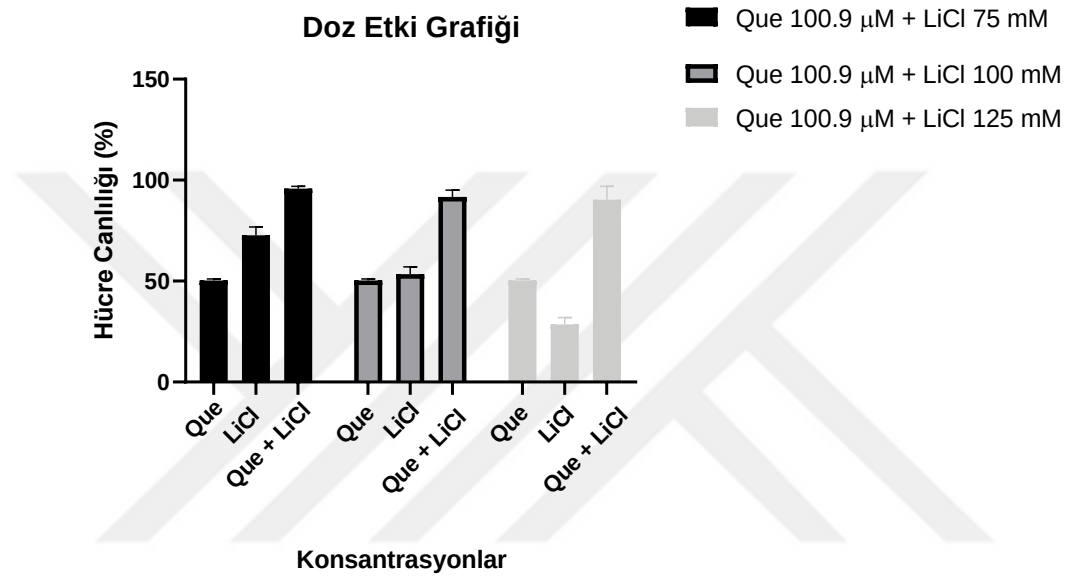
Şekil 4.13 Kuersetin tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (24 ve 48 saat)

Şekil 4.14’de farklı konsantrasyonlarda lityum klorür tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdeleri gösterilmiştir. 24 ve 48 saat farklı konsantrasyonlarda lityum klorür tedavisi uygulandığında doza bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. Lityum klorürün 48 saatteki IC₅₀ dozu 95,55 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.14 Lityum klorür tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (24 ve 48 saat)

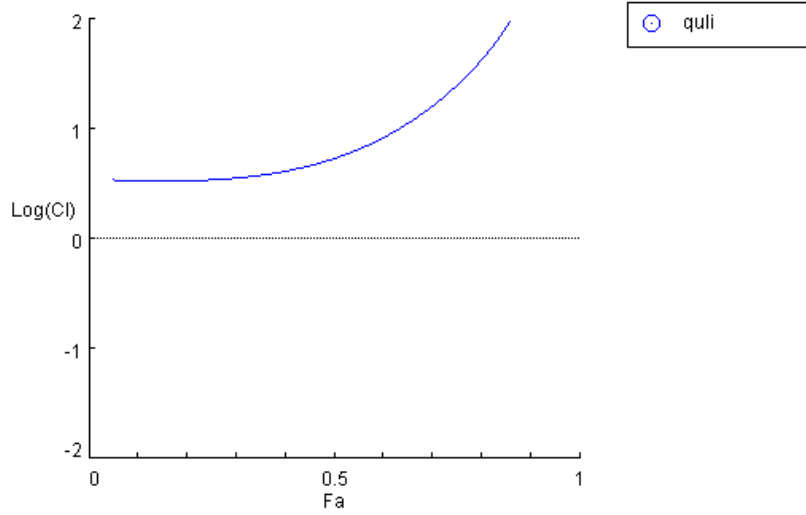
Kuersetin ve lityum klorürün tek başlarına en iyi etki ettiği doz aralığı (75 mM, 100 mM ve 125 mM) seçilerek kombinasyon çalışması yapılmıştır. Şekil 4.15’de görüldüğü gibi kuersetinin IC₅₀ dozu sabit tutularak lityum klorürün en iyi etki ettiği doz aralıkları uygulanmıştır. Etken maddeler tek başlarına uygulandığında MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin canlılığını doza ve zamana bağlı azaltarak pozitif etki gösterirken, kombinasyonlarında ise hücrelerin canlılığını arttırıcı etki (antagonistik etki) gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.15 MCF-7 hücrelerine uygulanan kuersetin + lityum klorür kombinasyonlarının doz etki grafiği (Que: Kuersetin)

Kuersetin ile lityum klorür kombinasyonunun antagonistik etkisi CompuSyn yazılımında kombinasyon indeks yöntemi kullanılarak bulunmuştur. Bu yöntemle göre kombinasyon indeks değeri (CI) <1 ise etken maddeler arasında sinerjistik etki olduğu, CI=1 ise aditif etki gösterdiği ve CI > 1 antagonistik etki oluştuğunu ifade etmektedir [180].

Kuersetin ile lityum klorür etken maddelerinin MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki kombinasyon indeks değeri (CI) 5,41 olarak bulunmuştur ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisinin CI değerine ait logaritmik eğrisi aşağıda verilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Kuersetin ile lityum klorürün kombinasyon indeks eğrisi

4.1.2 Kuersetin, Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon Tedavisinin CCD Sağlıklı Kolon Hücrelerindeki Sitotoksik Etkileri

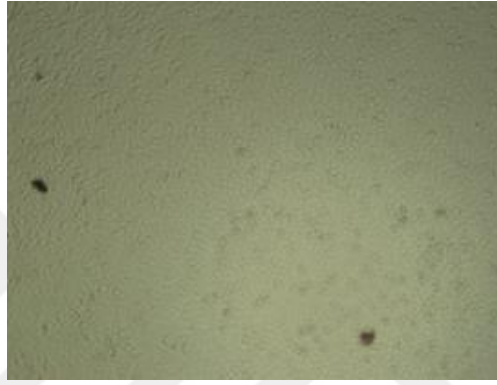
Kuersetinin 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mikromolar konsantrasyonları CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerine uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra inverted mikroskopta görüntüleri alınmıştır. Daha sonra MTT ile sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Kontrol grubundaki CCD hücrelerinin 24 saatte sağlıklı şekilde çoğaldıkları görülmüştür (Şekil 4.17). 24 saatte 100 μ M kuersetin tedavisi uygulandığında CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerinde toksik etki göstermediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.18). Fakat 300 μ M kuersetin ile tedavi edildiğinde Şekil 4.19’da görüldüğü gibi toksik etki göstermeye başladığı saptanmıştır.



Şekil 4.17 CCD hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)

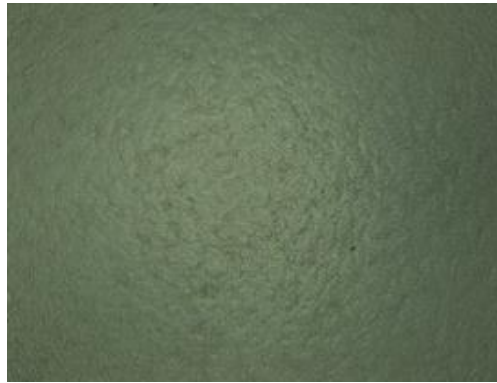


Şekil 4.18 CCD hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (100 µM kuersetin) (5x)



Şekil 4.19 CCD hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (300 µM kuersetin) (5x)

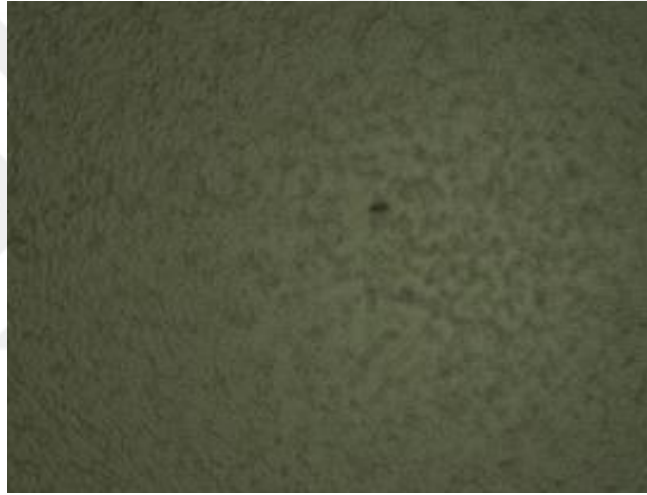
48 saatte kontrol grubundaki CCD sağlıklı fibroblast hücrelerinin morfolojilerinin düzgün olduğu görülmüştür (Şekil 4.20). 48 saatte 100 µM kuersetin tedavisinin CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerinde toksik etki göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.21). Ancak CCD hücrelerine 48 saat 300 µM kuersetin tedavisi uygulandığında kontrol grubuna kıyasla ölü hücre sayısında belirgin artış olduğu ve toksik etki oluşturduğu inverted mikroskopta gözlemlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.20 CCD hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)



Şekil 4.21 CCD hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (100 µM kuersetin) (5x)

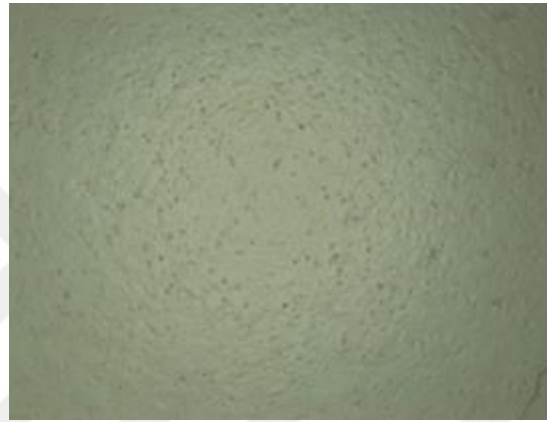


Şekil 4.22 CCD hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (300 µM kuersetin) (5x)

Lityum klorürün 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400 ve 500 milimolar konsantrasyonları CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerine uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra inverted mikroskopta görüntüleri alınmıştır. Daha sonra MTT ile sitotoksik etkisi belirlenmiştir. 24 saatte kontrol grubundaki hücrelerin sağlıklı oldukları görülmüştür (Şekil 4.23). 50 mM ve 75 mM lityum klorür ile tedavi edilen CCD hücrelerinde farklılık gözlemlenmemiştir. Fakat 100 mM lityum klorür ile tedavi edildiğinde Şekil 4.24'te görüldüğü gibi toksik etki göstermeye başladığı saptanmıştır.

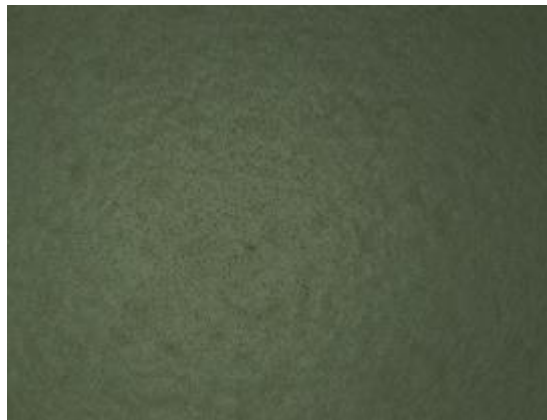


Şekil 4.23 CCD hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)



Şekil 4.24 CCD hücrelerinin 24 saatteki mikroskop görüntüsü (100 mM LiCl) (5x)

48 saatte kontrol grubundaki CCD sağlıklı fibroblast hücrelerinin sağlıklı şekilde çoğaldıkları görülmüştür (Şekil 4.25). CCD sağlıklı fibroblast hücrelerine 48 saat 100 mM lityum klorür tedavisi uygulandığında ise kontrol grubuyla kıyaslandığında toksik etki sınırının başladığı inverted mikroskopta gözlemlenmiştir (Şekil 4.26).

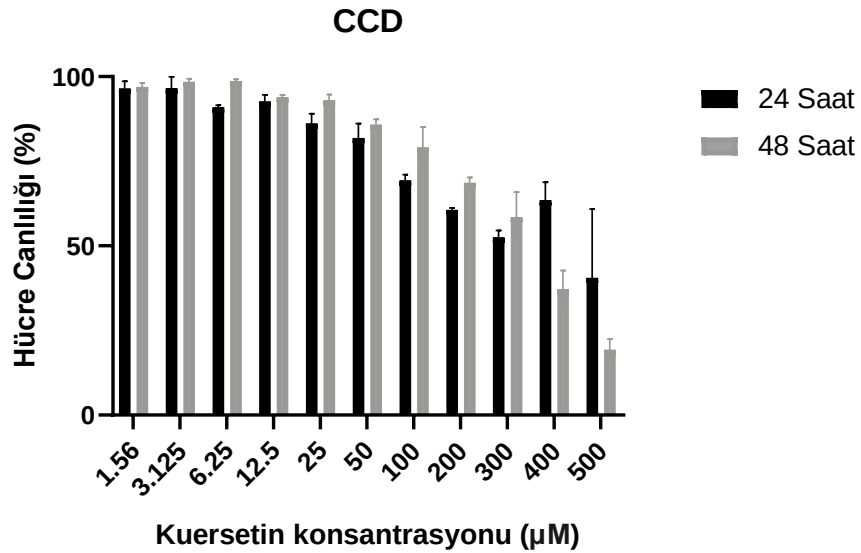


Şekil 4.25 CCD hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (Kontrol) (5x)



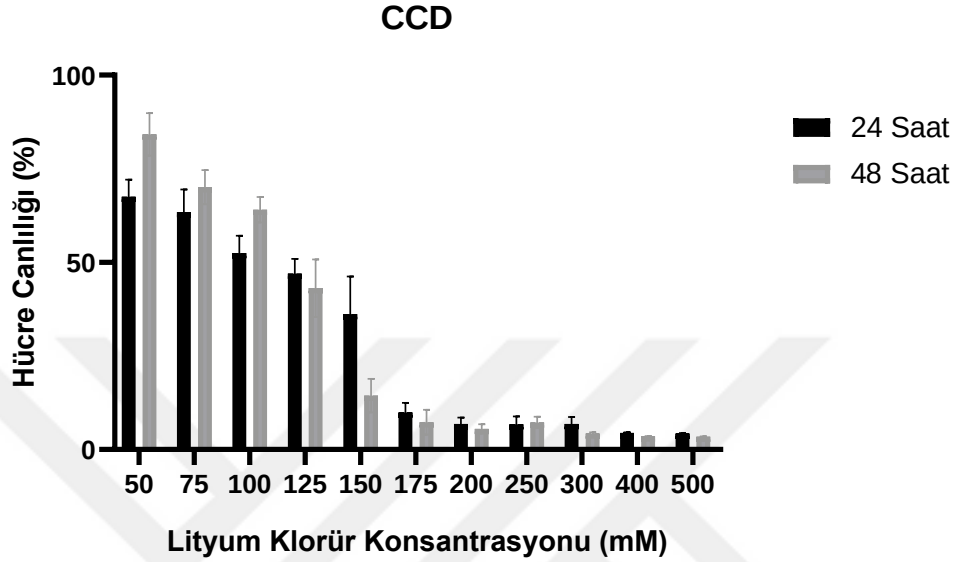
Şekil 4.26 CCD hücrelerinin 48 saatteki mikroskop görüntüsü (100 mM LiCl)
(5x)

Şekil 4.27’de farklı konsantrasyonlarda kuersetin tedavisi uygulanan CCD hücrelerinin canlılık yüzdeleri verilmiştir. CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücreleri 24 ve 48 saat kuersetinin düşük dozlarıyla tedavi edildiğinde hücre canlılığında genel olarak azalma gözlenmemiştir. 24 saatte 300 mikromolar kuersetin tedavisi uygulandığında toksik etki gösterdiği ve hücre canlılık yüzdesinin yaklaşık %50’ye düştüğü belirlenmiştir. 48 saatte kuersetinin 200 mikromolar ve daha yüksek dozlarında tedavi uygulandığında toksik etki göstererek hücre canlılık yüzdesinde azalma olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.27 Kuersetin tedavisi uygulanan CCD hücrelerinin yüzde canlılık grafiği
(24 ve 48 saat)

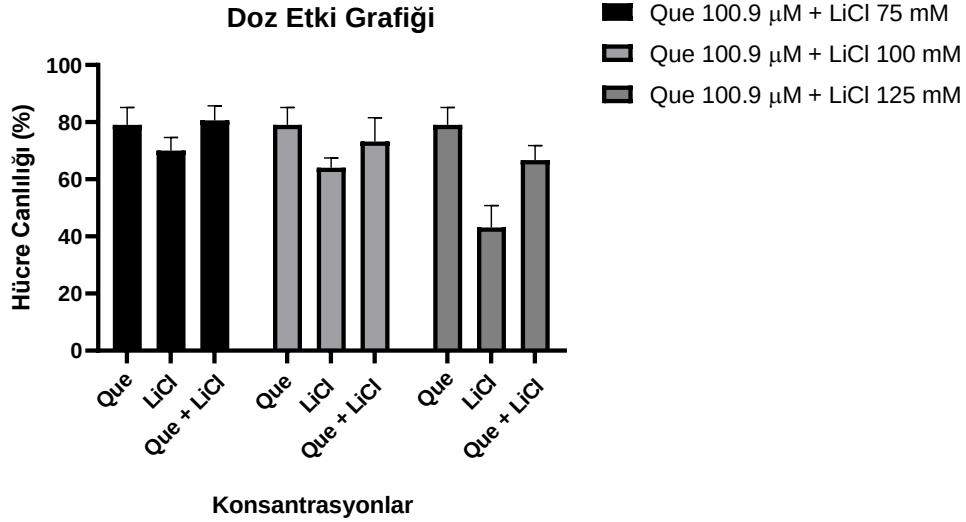
Şekil 4.28’de farklı konsantrasyonlarda lityum klorür tedavisi uygulanan CCD hücrelerinin canlılık yüzdeleri gösterilmiştir. 24 ve 48 saat farklı konsantrasyonlarda lityum klorür tedavisi uygulandığında yüksek doza ve zamana bağımlı olarak toksik etki gösterdiği, hücre canlılığını azalttığı saptanmıştır.



Şekil 4.28 Lityum klorür tedavisi uygulanan CCD hücrelerinin yüzde canlılık grafiği (24 ve 48 saat)

MCF-7 hücrelerine uygulanan kuersetin + lityum klorür kombinasyon çalışmasındaki aynı dozlar kıyaslamak amacıyla CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerine de uygulanmıştır. Şekil 4.29’da görüldüğü gibi kuersetinin MCF-7 hücrelerindeki IC_{50} dozu sabit tutularak lityum klorürün en iyi etki ettiği doz aralıkları uygulanmıştır. Tek başına 100,9 μ M kuersetin tedavisi uygulandığında CCD sağlıklı kolon hücrelerinin canlılık yüzdesinde yaklaşık %20 azalma olduğu görülmüştür.

Lityum klorür tek başına uygulandığında CCD sağlıklı kolon hücrelerinin canlılık yüzdesinde doza bağlı olarak azalma tespit edilmiştir. Kombinasyonlarında ise lityum klorürün dozu arttıkça CCD sağlıklı insan kolon hücrelerindeki toksik etkisinde de artış olduğu gözlemlenmiştir. Mekanizmayı çözmek adına antioksidan çalışmalarına devam edilmiştir.



Şekil 4.29 CCD hücrelerine uygulanan kuersetin + lityum klorür kombinasyonlarının doz etki grafiği (Que: Kuersetin)

4.1.3 Protein Miktar Tayini

24 saat inkübe edildikten sonra kontrol grubundaki hücrelerde ortalama 4,55 mg protein, 100,9 µM kuersetin uygulandığında 4,5 mg protein, 95,55 mM lityum klorür çözeltisi uygulandığında 3,54 mg protein ve 100,9 µM kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında 5,34 mg protein bulunmuştur. 48 inkübasyonun ardından ise kontrol grubundaki hücrelerde ortalama 4,25 mg protein, 100,9 µM kuersetin uygulandığında 2,85 mg protein, 95,55 mM lityum klorür çözeltisi uygulandığında 2,22 mg protein ve 100,9 µM kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında 1,82 mg protein bulunmuştur.

4.1.4 Kuersetin, Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon

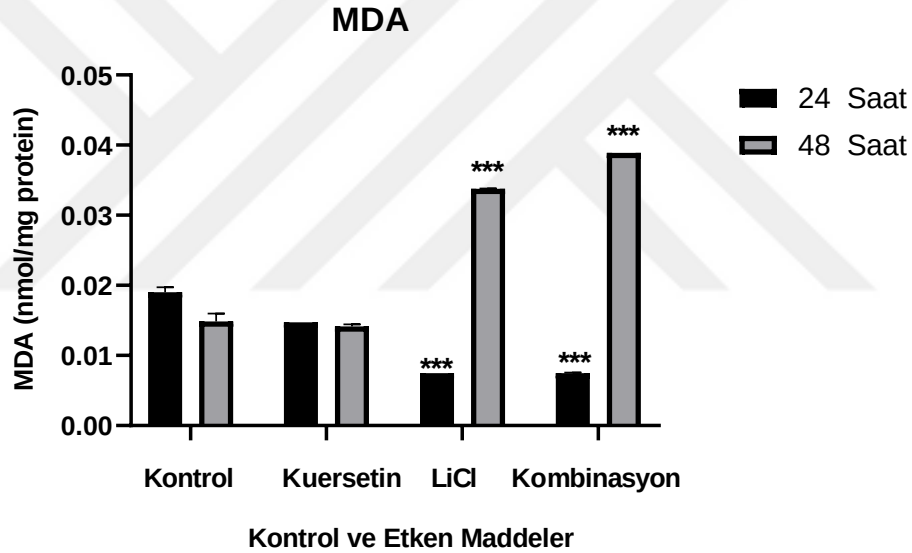
Tedavisi Uygulanan MCF-7 Hücrelerindeki Malondialdehit Düzeyleri

Oksidatif stres seviyesini belirlemek amacıyla MCF-7 insan meme kanseri hücre lizatlarına 100,9 µM kuersetin, 95,55 mM lityum klorür ve 100,9 µM kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulanarak MDA düzeyleri ölçülmüştür.

Kontrol grubundaki hücrelerin 24 saatteki MDA düzeyi 0,018 MDA/mg protein bulunmuştur. 100,9 µM kuersetin uygulandığında MDA düzeyi 0,014 MDA/mg protein, 95,55 mM lityum klorür uygulandığında MDA düzeyi 0,007 MDA/mg protein ve 100,9 µM kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında MDA düzeyi 0,007 MDA/mg protein olarak hesaplanmıştır.

Kontrol grubundaki hücrelerin 48 saatteki MDA düzeyi 0,014 MDA/mg protein olarak belirlenmiştir. 100,9 μ M kuersetin uygulandığında MDA düzeyi 0,013 MDA/mg protein, 95,55 mM lityum klorür uygulandığında MDA düzeyi 0,033 MDA/mg protein ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında MDA düzeyi 0,038 MDA/mg protein olarak hesaplanmıştır.

24 saatte etken maddeler hem tek başlarına hem de kombinasyonları (IC₅₀ dozları) uygulandığında serbest radikalleri temizleyerek MDA düzeyini azalttığı ve lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkisi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.30). 48 saatte ise etken maddeler serbest radikalleri temizlemeye yetmediği için oksidatif stres markerı olan MDA düzeyinin arttığı ve lipid peroksidasyonunda artış olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.30 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerindeki MDA seviyeleri (24 ve 48 saat)

4.1.5 Kuersetin, Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon

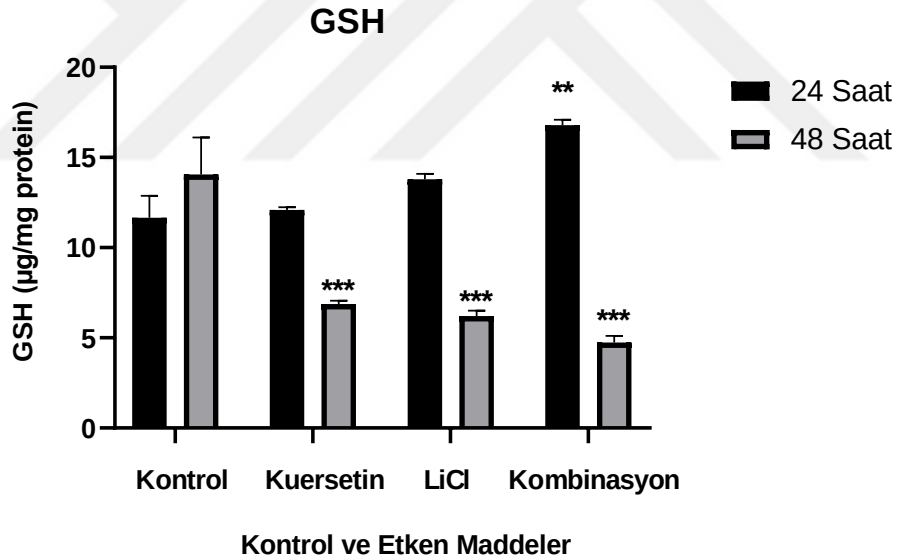
Tedavisi Uygulanan MCF-7 Hücrelerindeki Redükte Glutasyon Düzeyleri

MCF-7 insan meme kanseri hücre lizatlarına 100,9 μ M kuersetin, 95,55 mM lityum klorür ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulanarak GSH seviyeleri ölçülmüştür. Kontrol grubundaki hücrelerin 24 saatteki GSH düzeyi 10,81 μ g saptanmıştır.

100,9 μM kuersetin uygulandığında GSH düzeyi 12,19 μg , 95,55mM LiCl uygulandığında GSH düzeyi 13,57 μg ve 100,9 μM kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında GSH düzeyi 16,58 μg olarak bulunmuştur.

Kontrol grubundaki hücrelerin 48 saatteki GSH düzeyi 11,62 μg ölçülmüştür. 100,9 μM kuersetin uygulandığında GSH düzeyi 6,74 μg , 95,55 milimolar lityum klorür uygulandığında GSH düzeyi 6,42 μg ve 100,9 μM kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında GSH düzeyi 4,47 μg olarak hesaplanmıştır.

24 saatte etken maddelerin kombinasyonları (IC_{50} dozları) uygulandığında glutasyon düzeyinde artış olduğu belirlenmiştir. 48 saatte ise etken maddeler hem tek başlarına hem de kombinasyonları (IC_{50} dozları) uygulandığında serbest radikallerle savaşıp elektronunu vererek güç kaybettiği için glutasyon düzeyinde azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerindeki GSH seviyeleri (24 ve 48 saat)

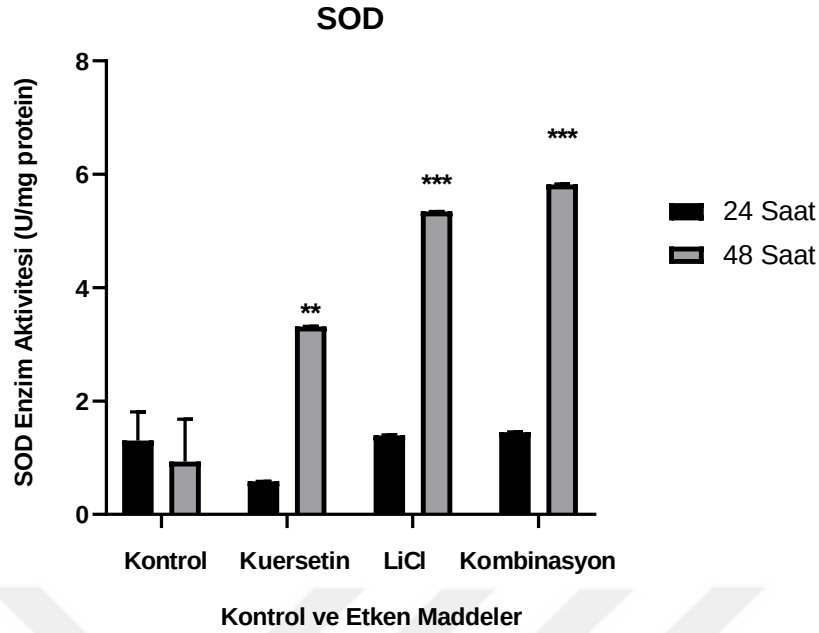
4.1.6 Kuersetin, Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon Tedavisi Uygulanan MCF-7 Hücrelerindeki Süperoksit Dismutaz Aktivite Düzeyleri

SOD enziminin aktivitesini belirlemek amacıyla MCF-7 insan meme kanseri hücre lizatlarına 100,9 μ M kuersetin, 95,55 mM lityum klorür ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulanarak SOD düzeyleri ölçülmüştür. Kontrol grubundaki hücrelerin 24 saatteki SOD düzeyi 1,65 U/mg protein bulunmuştur.

100,9 μ M kuersetin uygulandığında SOD düzeyi 0,58 U/mg protein, 95,55 milimolar lityum klorür uygulandığında SOD düzeyi 1,39 U/mg protein ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında SOD düzeyi 1,45 U/mg protein saptanmıştır.

Kontrol grubundaki hücrelerin 48 saatteki SOD düzeyi 1,46 U/mg protein bulunmuştur. 100,9 μ M kuersetin uygulandığında SOD düzeyi 3,31 U/mg protein, 95,55 milimolar lityum klorür uygulandığında SOD düzeyi 5,33 U/mg protein ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında SOD düzeyi 5,81 U/mg protein ölçülmüştür.

24 saatte tek başına kuersetin tedavisi uygulandığında SOD düzeyinde azalma olduğu belirlenmiştir. 24 saatte tek başına lityum klorür tedavisi ve etken maddelerin kombinasyon tedavisi (IC_{50} dozları) uygulandığında ise kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 4.32’de görüldüğü gibi 48 saatte etken maddeler hem tek başlarına hem de kombinasyonları (IC_{50} dozları) uygulandığında antioksidan mekanizması tetiklendiği için SOD düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir.



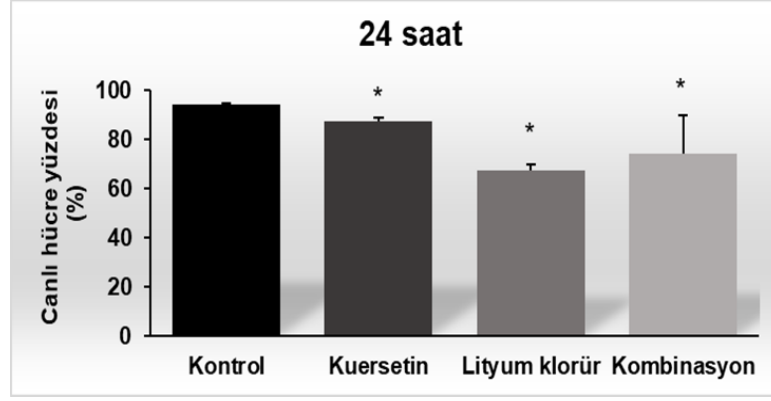
Şekil 4.32 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerindeki SOD seviyeleri (24 ve 48 saat)

4.1.7 Kuersetin, Lityum Klorür ve Kuersetin - Lityum Klorür Kombinasyon

Tedavisinin MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptoza Etkisi

Kuersetin (100,9 μ M), lityum klorür (95,55 mM) ve kombinasyonları (IC_{50} dozları) MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanmış olup apoptoza etkisi apoptoz deteksiyon kiti (BioLegend Cat. No. 640914) kullanılarak flow sitometri analizi ile belirlenmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin 24 saatteki canlı hücre yüzdesi %94,4 bulunmuştur.

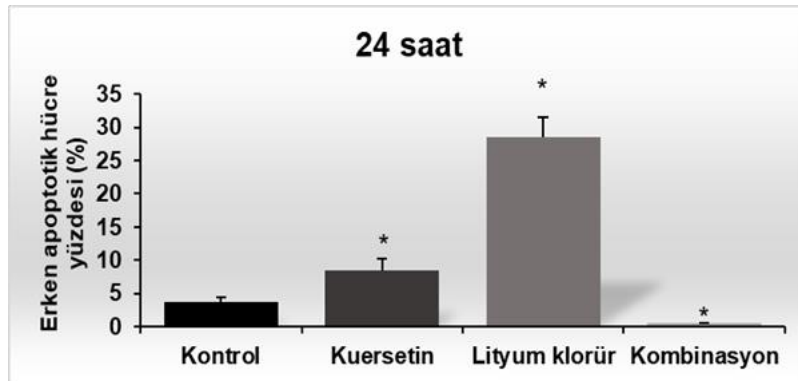
Kuersetin (100,9 μ M) uygulandığında canlı hücre yüzdesi %87,3, lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında canlı hücre yüzdesi %67,3 ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında canlı hücre yüzdesi %74,3 hesaplanmıştır. Kuersetin (100,9 μ M), lityum klorür (95,55 mM) ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki canlılık yüzdesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0.05^*$) (Şekil 4.33).



Şekil 4.33 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin canlı hücre yüzdeleri ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) (24 saat)

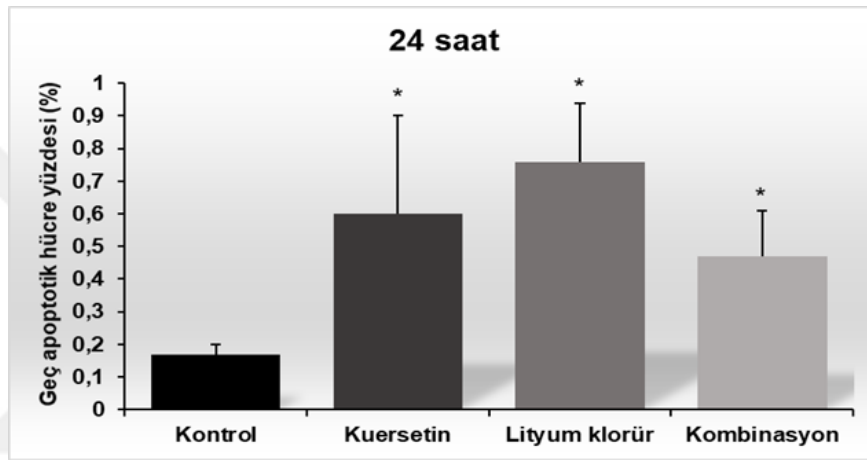
Kontrol grubundaki hücrelerin 24 saatteki erken apoptotik hücre yüzdesi %3,7 belirlenmiştir. Kuersetin ($100,9 \mu\text{M}$) uygulandığında erken apoptotik hücre yüzdesi %8,5 lityum klorür ($95,55 \text{ mM}$) uygulandığında erken apoptotik hücre yüzdesi %28,6 ve $100,9 \mu\text{M}$ kuersetin + $95,55 \text{ mM}$ lityum klorür kombinasyonu uygulandığında erken apoptotik hücre yüzdesi %0,46 saptanmıştır (Şekil 4.34).

Kuersetin ($100,9 \mu\text{M}$) ve lityum klorür ($95,55 \text{ mM}$) tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derece artmıştır ($p < 0.05^*$). Fakat $100,9 \mu\text{M}$ kuersetin + $95,55 \text{ mM}$ lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdesinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gözlenmiştir ($p < 0.05^*$).



Şekil 4.34 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdeleri ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) (24 saat)

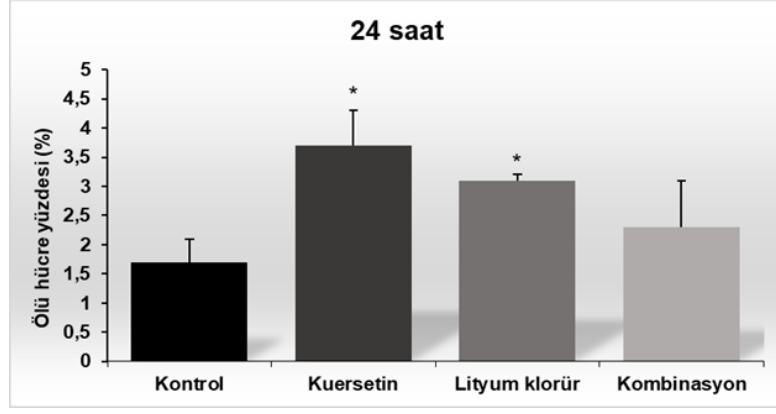
Kontrol grubundaki hücrelerin 24 saatteki geç apoptotik hücre yüzdesi %0,17 bulunmuştur. Kuersetin (100,9 μ M) uygulandığında geç apoptotik hücre yüzdesi %0,6 lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında geç apoptotik hücre yüzdesi %0,76 ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında geç apoptotik hücre yüzdesi %0,47 belirlenmiştir. Kuersetin (100,9 μ M), lityum klorür (95,55 mM) ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin geç apoptotik hücre yüzdesi kontrol grubuna kıyasla Şekil 4.35'te görüldüğü gibi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05^*$).



Şekil 4.35 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin geç apoptotik hücre yüzdeleri ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$) (24 saat)

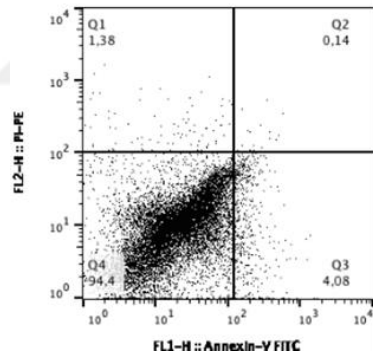
Kontrol grubundaki hücrelerin 24 saatteki ölü hücre yüzdesi %1,7 bulunmuştur. Kuersetin (100,9 μ M) uygulandığında ölü hücre yüzdesi %3,7, lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında ölü hücre yüzdesi %3,1 ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında ölü hücre yüzdesi %2,3 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.36).

Kuersetin (100,9 μ M) ve lityum klorür (95,55 mM) tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin ölü hücre yüzdesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derece artmıştır ($p<0.05^*$). Fakat 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin ölü hücre yüzdesinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

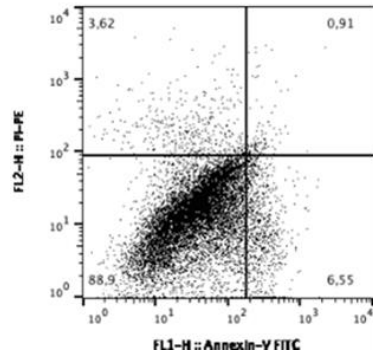


Şekil 4.36 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin ölü hücre yüzdeleri ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) (24 saat)

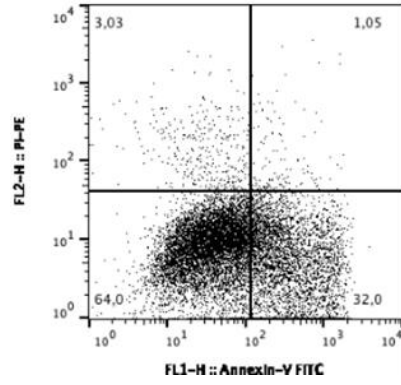
Kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı Şekil 4.37’de gösterilmiştir. 24 saat kuersetin tedavisi uygulanan gruba ait histogram dağılımı Şekil 4.38’de ve 24 saat lityum klorür tedavisi uygulanan gruba ait histogram dağılımı Şekil 4.39’da verilmiştir. 24 saat kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan gruba ait histogram dağılımı ise Şekil 4.40’ta belirtilmiştir.



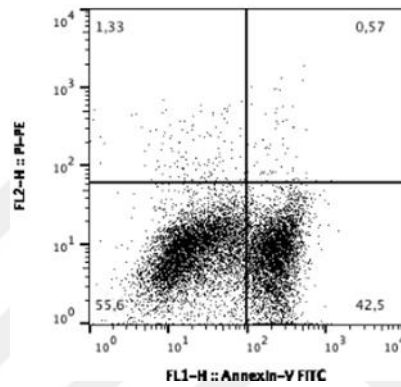
Şekil 4.37 Kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (24 saat)



Şekil 4.38 Kuersetin (100,9 µM) tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (24 saat)



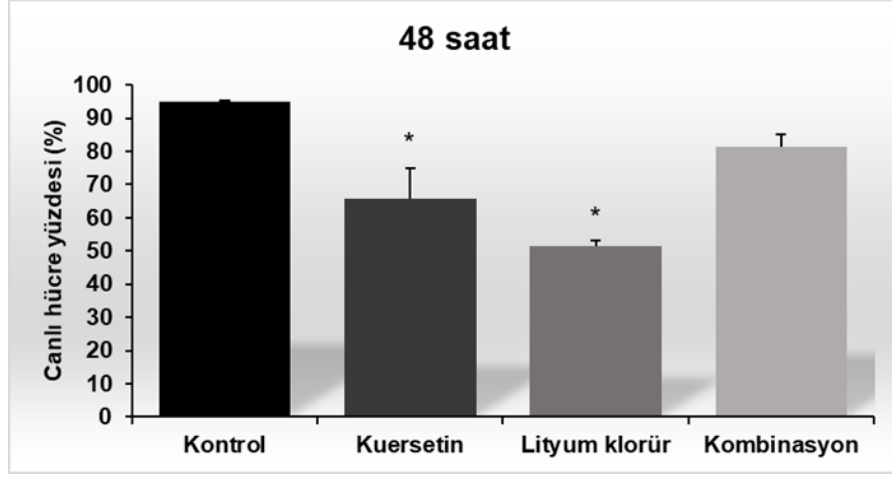
Şekil 4.39 Lityum klorür (95,55 mM) tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (24 saat)



Şekil 4.40 Kuersetin + lityum klorür tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (24 saat)

Kontrol grubundaki hücrelerin 48 saatteki canlı hücre yüzdesi %95,1 belirlenmiştir. Kuersetin (100,9 µM) uygulandığında canlı hücre yüzdesi %65,6 lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında canlı hücre yüzdesi %51,3 ve 100,9 µM kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında canlı hücre yüzdesi %81,4 hesaplanmıştır (Şekil 4.41).

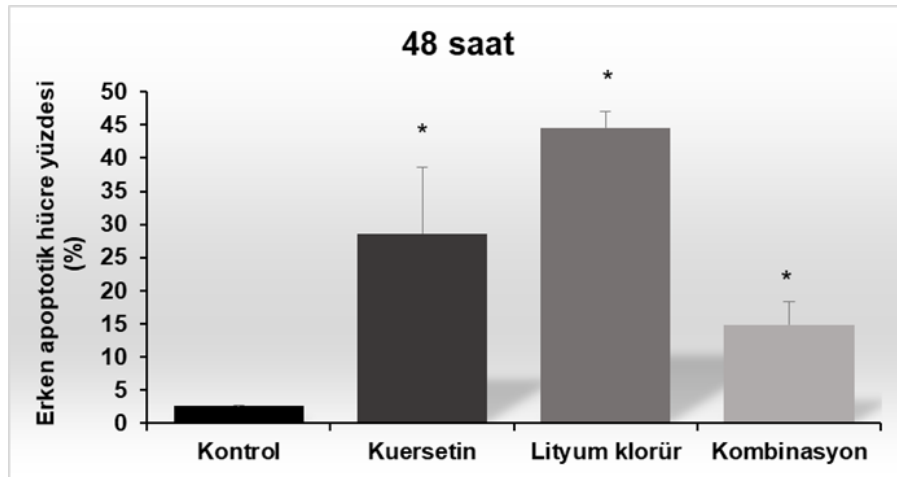
Kuersetin (100,9 µM) ve lityum klorür (95,55 mM) tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki canlılık yüzdesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0.05^*$). Fakat 100,9 µM kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki canlılık yüzdesinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma görülmemiştir ($p > 0.05$).



Şekil 4.41 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin canlı hücre yüzdeleri ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) (48 saat)

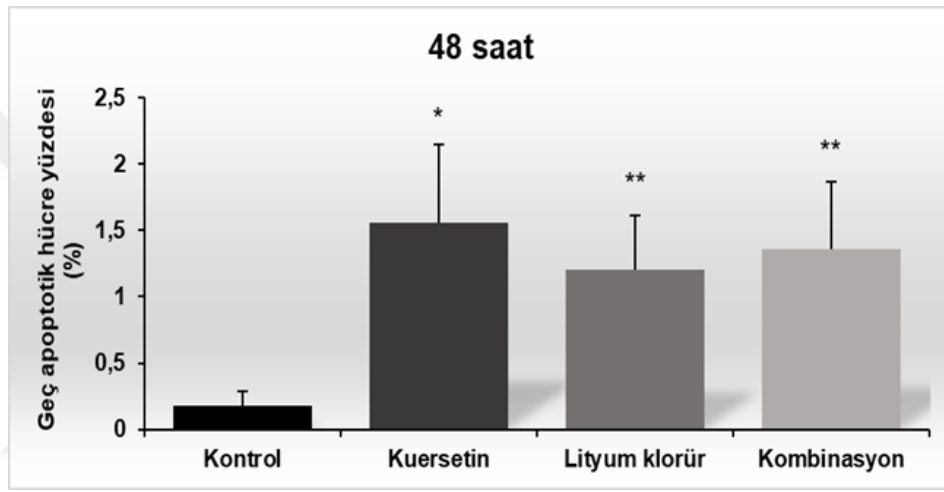
Kontrol grubundaki hücrelerin 48 saatteki erken apoptotik hücre yüzdesi %2,6 belirlenmiştir. Kuersetin (100,9 μ M) uygulandığında erken apoptotik hücre yüzdesi %28,6 lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında erken apoptotik hücre yüzdesi %44,6 ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında erken apoptotik hücre yüzdesi %14,9 saptanmıştır (Şekil 4.42).

Kuersetin (100,9 μ M), lityum klorür (95,55 mM) ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdesinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir artış görülmüştür ($p < 0.05^*$).



Şekil 4.42 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin erken apoptotik hücre yüzdeleri ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) (48 saat)

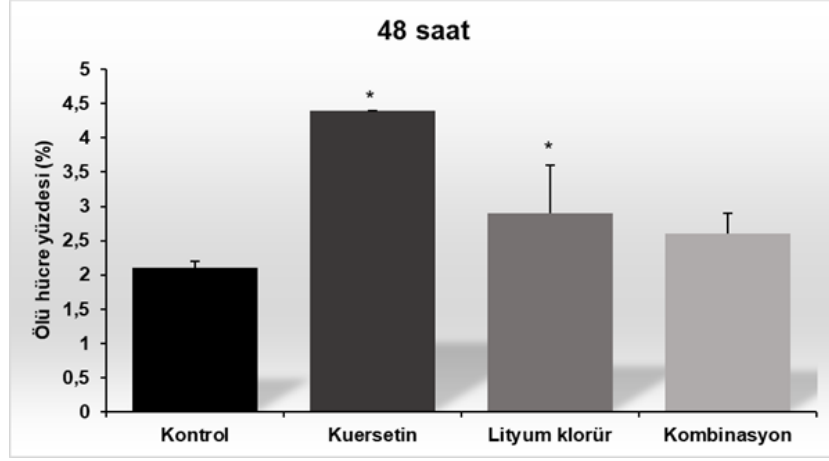
Kontrol grubundaki hücrelerin 48 saatteki geç apoptotik hücre yüzdesi %0,18 bulunmuştur. Kuersetin (100,9 μ M) uygulandığında geç apoptotik hücre yüzdesi %1,56 lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında geç apoptotik hücre yüzdesi %1,2 ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında geç apoptotik hücre yüzdesi %1,36 belirlenmiştir. Kuersetin (100,9 μ M), lityum klorür (95,55 mM) ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin geç apoptotik hücre yüzdesi kontrol grubuna kıyasla Şekil 4.43’de görüldüğü gibi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$).



Şekil 4.43 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin geç apoptotik hücre yüzdeleri ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$) (48 saat)

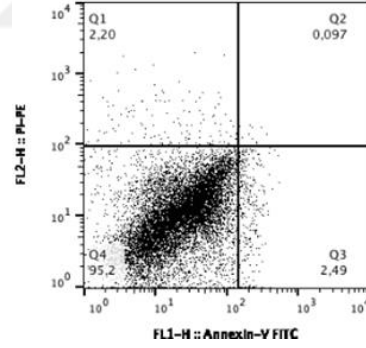
Kontrol grubundaki hücrelerin 48 saatteki ölü hücre yüzdesi %2,1 bulunmuştur. Kuersetin (100,9 μ M) uygulandığında ölü hücre yüzdesi %4,4 lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında ölü hücre yüzdesi %2,9 ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyonu uygulandığında ölü hücre yüzdesi %2,6 tespit edilmiştir (Şekil 4.44).

Kuersetin (100,9 μ M) ve lityum klorür (95,55 mM) tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin ölü hücre yüzdesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p<0.05^*$). Fakat 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin ölü hücre yüzdesinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı derecede fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

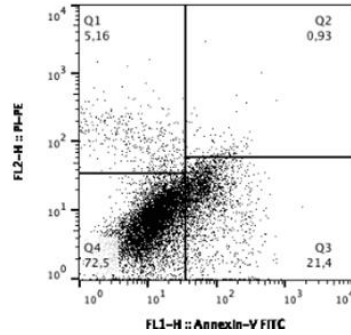


Şekil 4.44 Kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin ölü hücre yüzdeleri ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) (48 saat)

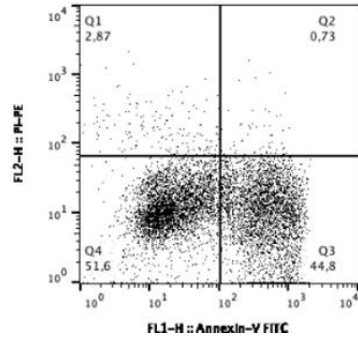
Kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı Şekil 4.45’de gösterilmiştir. 48 saat kuersetin tedavisi uygulanan gruba ait histogram dağılımı Şekil 4.46’da ve 48 saat lityum klorür tedavisi uygulanan gruba ait histogram dağılımı Şekil 4.47’de verilmiştir. 48 saat kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan gruba ait histogram dağılımı ise Şekil 4.48’de belirtilmiştir.



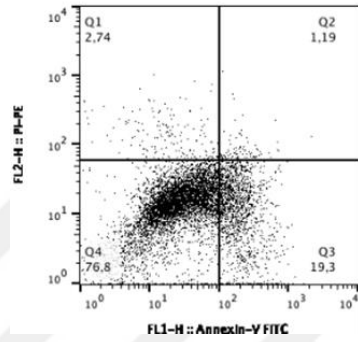
Şekil 4.45 Kontrol grubundaki MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (48 saat)



Şekil 4.46 Kuersetin (100,9 μM) tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (48 saat)



Şekil 4.47 Lityum klorür (95,55 mM) tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (48 saat)



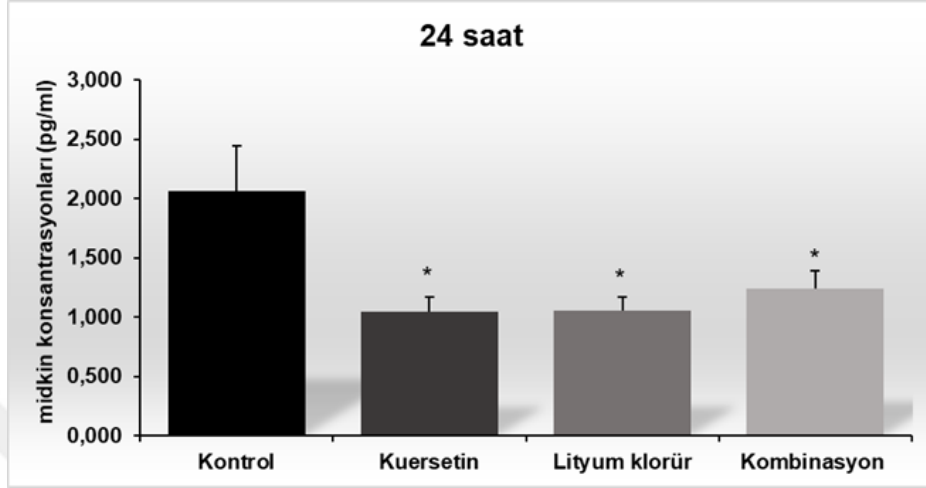
Şekil 4.48 Kuersetin + lityum klorür tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerinin histogram dağılımı (48 saat)

4.1.8 Kuersetin, Lityum Klorür ve Kuersetin + Lityum Klorür Kombinasyon Tedavisi Uygulanan MCF-7 ve CCD Hücrelerindeki Midkin Düzeyleri

Kuersetin (100,9 μ M), lityum klorür (95,55 mM) ve kombinasyonları (IC_{50} dozları) insan meme kanseri hücrelerine (MCF-7) ve sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerine (CCD) 24 ve 48 saat uygulanmış olup insan midkin deteksiyon kiti (Boster, Cat. No. EK1235) kullanılarak midkin ekspresyonu belirlenmiştir. IC_{50} dozları belirlenen kuersetin, lityum klorür ve kombinasyonları MCF-7 hücrelerine 5 tekrarlı, CCD hücrelerine 4 tekrarlı uygulanmıştır.

Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyonları MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine 24 saat uygulandıktan sonra elde edilen midkin değerleri kontrol grubu midkin değerleri ile karşılaştırılmış olup, Şekil 4.49'da gösterilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin midkin değeri 2,05 pg/ml bulunmuştur. Kuersetin (100,9 μ M) uygulandığında midkin değeri 1,04 pg/ml, lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında midkin değeri 1,05 pg/ml ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulandığında midkin değeri 1,23 pg/ml

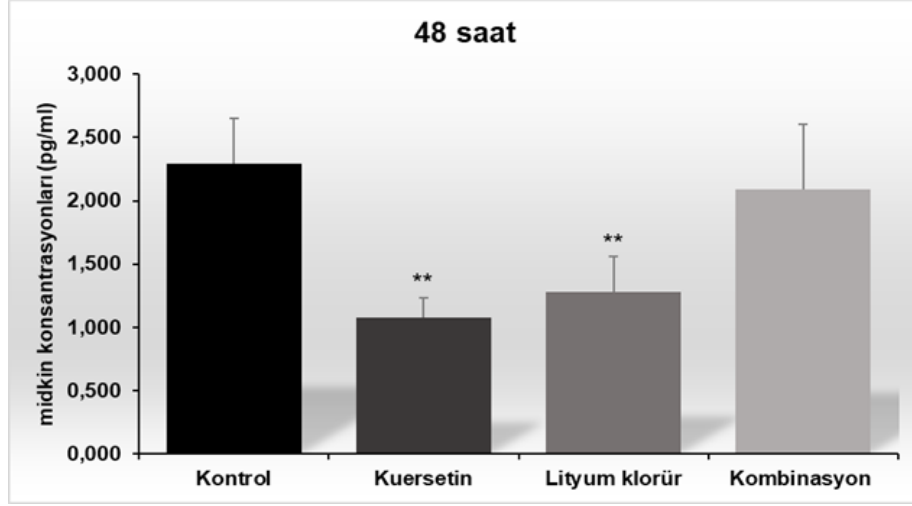
hesaplanmıştır. MCF-7 hücrelerindeki kontrol grubunun midkin düzeyi ile kuersetin, lityum klorür ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan grupların midkin düzeylerinin farklı olduğu görülmüştür ($p<0.05^*$).



Şekil 4.49 Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerindeki midkin düzeyleri ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$) (24 saat)

Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyonları MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine 48 saat uygulandıktan sonra elde edilen midkin değerleri kontrol grubu midkin değerleri ile karşılaştırılmış olup, Şekil 4.50’de gösterilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin midkin değeri 2,29 pg/ml bulunmuştur. Kuersetin (100,9 μ M) uygulandığında midkin değeri 1,07 pg/ml, lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında midkin değeri 1,27 pg/ml ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulandığında midkin değeri 2,09 pg/ml hesaplanmıştır.

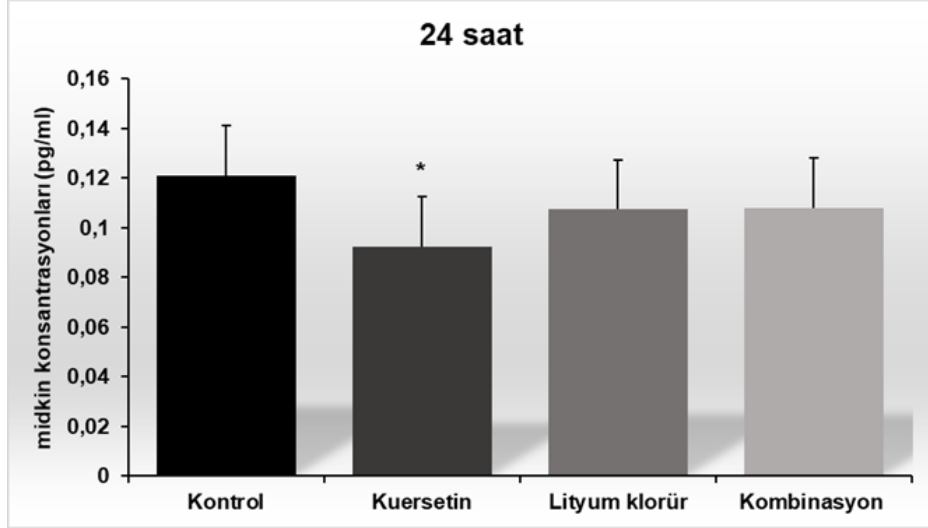
MCF-7 hücrelerindeki kontrol grubunun midkin düzeyleri ile kuersetin ve lityum klorürün tek başlarına uygulanması ile elde edilen midkin düzeylerinin farklı olduğu görülmüştür ($p<0.01^{**}$). Ancak MCF-7 hücrelerindeki kontrol grubunun midkin düzeyleri ile kombinasyon tedavisi uygulanan gruptan elde edilen midkin düzeylerinin anlamlı derecede farklı olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.50 Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi uygulanan MCF-7 hücrelerindeki midkin düzeyleri ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) (48 saat)

Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyonları CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerine 24 saat uygulandıktan sonra elde edilen midkin değerleri kontrol grubu midkin değerleri ile karşılaştırılmış olup, Şekil 4.51’de gösterilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin midkin değeri 0,12 pg/ml bulunmuştur. Kuersetin (100,9 μ M) uygulandığında midkin değeri 0,09 pg/ml, lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında midkin değeri 0,10 pg/ml ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulandığında midkin değeri 0,10 pg/ml tespit edilmiştir.

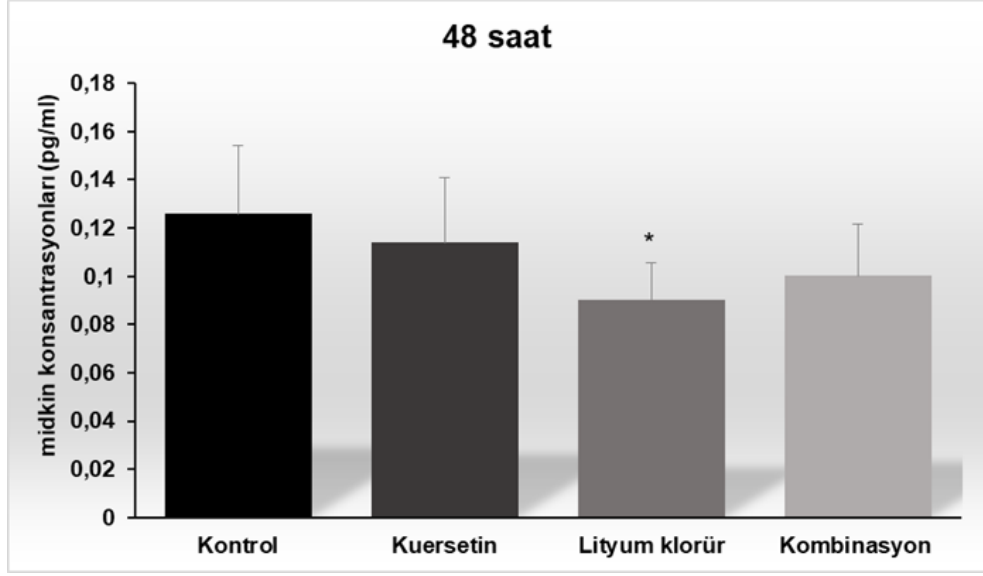
CCD sağlıklı insan kolon hücrelerindeki kontrol grubunun midkin düzeyleri ile kuersetin uygulanması ile elde edilen midkin düzeylerinin farklı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05^*$). Ancak CCD sağlıklı insan kolon hücrelerindeki kontrol grubunun midkin düzeyleri ile lityum klorür ve kombinasyon tedavisi uygulandığında elde edilen midkin düzeylerinin farklı olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).



Şekil 4.51 Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi uygulanan CCD hücrelerindeki midkin düzeyleri ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$) (24 saat)

Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyonları CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerine 48 saat uygulandıktan sonra elde edilen midkin değerleri kontrol grubu midkin değerleri ile karşılaştırılmış olup, Şekil 4.52’de gösterilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin midkin değeri 0,13 pg/ml bulunmuştur. Kuersetin (100,9 μ M) uygulandığında midkin değeri 0,11 pg/ml, lityum klorür (95,55 mM) uygulandığında midkin değeri 0,09 pg/ml ve 100,9 μ M kuersetin + 95,55 mM lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulandığında midkin değeri 0,10 pg/ml hesaplanmıştır.

CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerindeki kontrol grubunun midkin düzeyleri ile lityum klorürün tek başına uygulanması ile elde edilen midkin düzeylerinin 48 saatte farklı olduğu görülmüştür ($p<0,05^*$). CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerinde 48 saat kuersetin tedavisi uygulanan gruptaki midkin düzeyleri kontrol grubundaki hücrelerle kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı azalma gözlenmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerindeki kontrol grubunun midkin düzeyleri ile kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanarak elde edilen midkin düzeyleri karşılaştırıldığında 48 saatte anlamlı derecede farklı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.52 Kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi uygulanan CCD hücrelerindeki midkin düzeyleri ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) (48 saat)

4.2 Öneriler

Bu tez çalışmasında MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine ve CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerine antioksidan özelliği olan kuersetin, pek çok kanser çeşidinde farmakolojik etkisi olan lityum klorür ve kombinasyon tedavisi uygulanarak sitotoksik etkileri MTT analiziyle değerlendirilmiştir. Her iki hücre hattında da kuersetin ve lityum klorürün düşük dozlarının hücre proliferasyonuna etkisi olmadığı görülmüştür. MCF-7 hücrelerinde kuersetin ve lityum klorürün 48 saatte hücre canlılığını doza bağlı olarak daha çok azalttığı belirlenmiştir.

MCF-7 hücrelerine 48 saat kuersetin tedavisi uygulandığında IC_{50} dozu $100,9 \mu M$, lityum klorür tedavisi uygulandığında IC_{50} dozu $95,55 \text{ mM}$ olduğu bulunmuştur. Kuersetinin MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki antiproliferatif etkilerinin incelendiği bir araştırmada 48 saatteki IC_{50} dozu $92,4 \mu M$ bulunmuştur [181].

Lityum klorürün MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin ele alındığı bir çalışmada iki evreli etki sergileyerek 10 mM LiCl dozunun hücre sayısında artışa neden olduğu fakat 100 mM LiCl dozunun ise tersine hücre çoğalmasını engelleyerek hücreleri apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir [21].

Bu tez çalışması ile $300 \mu M$ kuersetin ve daha yüksek dozlarının toksik etki göstererek CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerini öldürmeye başladığı

tespit edilmiştir. Bu toksik etki, fare fibroblast hücrelerinde yapılan bir araştırmada kuersetinin yükseltgenme tepkimelerine kararsızlık göstererek prooksidan özelliğinin açığa çıkmasından kaynaklandığı açıklanmıştır [182]. 100 mM ve daha yüksek dozlarda lityum klorür tedavisinin CCD sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerinde toksik etkiye yol açtığı gözlemlenmiştir. BALB/c 3T3 fibroblast hücrelerinde lityum klorürün hücre proliferasyonuna etkisinin incelendiği bir çalışmada ise düşük dozların (1mM-25mM) hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu saptanmıştır [183].

Kuersetin (IC_{50} dozu: 100,9 μ M) ve lityum klorürün en iyi etki ettiği doz aralıkları ile MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde kombinasyon tedavileri gerçekleştirilmiştir. Kuersetin ve lityum klorür tek başlarına MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine uygulandığında doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azaltırken, kombinasyonlarında ise hücre canlılığında artışa neden olduğu (antagonistik etki) ilk kez bu tez çalışmasında tespit edilmiştir. Kuersetinin kimyasal yapısında yer alan katekol ve hidroksikarbonil kısımları, metallerle etkileşime girerek şelasyona neden olmaktadır [184], [185]. Kuersetinin; bakır (II) [186], kurşun (II) klorür [187] ve çinko iyonu [188] ile tepkimeye girdiğinde şelatlayıcı ajan olarak rol aldığı literatür çalışmalarıyla kanıtlanmıştır.

Arsenik trioksit, kuersetin ve kombinasyon tedavisinin C6 glioma hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir araştırmada tek başlarına uygulandığında hücre sayısında azalma görülürken, kombinasyon tedavisi uygulandığında kuersetinin yarı metal olan arsenik trioksidin hücreleri öldürebilme özelliğini baskılayarak antagonistik etki gösterdiği saptanmıştır [189]. T98G insan glioblastoma hücrelerine lityum klorür, imatinib mesilat ve kombinasyon tedavileri uygulandığında lityum klorürün imatinib mesilat ile antagonist olduğu sonucuna ulaşılmıştır [190].

Bu tez çalışmasında MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi (IC_{50} dozları) uygulanarak oksidatif stres düzeyleri MDA tayini ile antioksidan enzim aktiviteleri ise GSH ve SOD düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan MDA, oksidatif hasarın parametresi olarak ölçümlerde kullanılmaktadır [102].

48 saat lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulandığında MDA düzeyinde anlamlı derecede artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,01^{***}$). Hidrojen peroksit radikalının çeşitli metallerle tepkimeye girdiğinde hidroksil radikali meydana geldiği literatürde yer almaktadır [191]. MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine tek başına 24 ve 48 saat kuersetin tedavisi (IC_{50} dozu: 100,9 μ M) uygulandığında ise kontrol grubuna kıyasla MDA düzeyinde azalma görülmüştür. Kuersetinin antioksidan kapasitesi yüksek olduğundan zararlı radikalleri temizleyebildiği bilinmektedir [192].

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi (IC_{50} dozları) uygulanarak GSH düzeyleri ölçüldüğünde 48 saatte kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı azalma olduğu saptanmıştır ($p<0,01^{***}$).

U937 lösemi hücrelerine kuersetin tedavisi uygulanarak GSH seviyelerinin ölçüldüğü bir çalışmada kuersetinin serbest radikallerden hidrojen peroksiti temizleyerek azalttığı fakat kuersetin tedavisinin süresi arttığında serbest radikallerle mücadelesinin zayıflayarak redükte glutatyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir [193].

Antioksidan olan kuersetinin yükseltgenme tepkimesine girdikten sonra açığa çıkardığı ara moleküller, glutatyon ile etkileşime girdiğinde glutatyon miktarının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir [194].

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde kuersetin, lityum klorür ve kombinasyon tedavisi (IC_{50} dozları) uygulanarak SOD düzeyleri ölçüldüğünde 48 saatte tek başına kuersetin, lityum klorür ve kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavilerinin SOD aktivitesini tetikleyerek istatistiksel olarak anlamlı artışa yol açtığı belirlenmiştir ($p<0,03^{**}$, $p<0,01^{***}$). Literatürde süperoksit dismutaz enziminin tüm izoformlarının aktif hale gelebilmesi için metal iyonlara gereksinim duyduğu bildirilmiştir [195].

Lityum klorür ve lityum karbonat metallerinin sıçan beyinindeki SOD aktivitesine etkilerinin ele alındığı bir araştırmada metallerin SOD enziminin belli bir kısmına özgü seçicilik göstermeden bağlanarak, istatistiksel açıdan anlamsız artışa neden olduğu bulunmuştur [196].

Bu tez çalışması kapsamında kuersetin (100,9 μ M), lityum klorür (95,55 mM) ve kombinasyonları (IC₅₀ dozları) MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanmış olup apoptoza etkisi apoptoz deteksiyon kiti (BioLegend Cat. No. 640914) kullanılarak flow sitometri ile değerlendirilmiştir. 24 saatte kontrol grubundaki MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin sağlıklı şekilde çoğaldıkları ve apoptotik hücre grubuna geçiş olmadığı görülmüştür. 24 saatte kuersetin tedavisinin MCF-7 hücrelerini zayıf olarak preapoptotik bölgeye yönlendirdiği gözlemlenmiştir. 24 saat tek başına lityum klorür tedavisi (95,55 mM) uygulandığında MCF-7 hücrelerinin belirgin şekilde preapoptotik bölgeye geçtiği saptanmıştır.

Kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulanan hücre gruplarında ise preapoptoza geçişin lityum klorür tedavisi uygulanan hücre gruplarına kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir.

48 saatte kontrol grubundaki hücrelerin morfolojilerinin düzgün olduğu görülmüştür. 48 saat kuersetin ile inkübe edilen MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin ise hem kontrol grubuna hem de 24 saat kuersetin tedavisi uygulanan hücre gruplarına kıyasla daha çok preapoptotik bölgeye yönlendiği gözlenmiştir. MCF-7 hücrelerine 48 saat tek başına lityum klorür tedavisi uygulandığında 24 saat lityum klorür tedavisi uygulanan hücre gruplarına göre erken apoptoza daha çok geçiş yaptığı anlaşılmıştır.

Fakat 48 saat kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisi uygulandığında ise zamana bağlı olarak kuersetinin şelatlama özelliği [66] nedeniyle lityum klorürün etkisini bloke edebildiği ve preapoptotik hücre sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir.

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde kuersetin, tamoksifen ve kombinasyonlarının apoptotik etkilerine bakılan bir çalışmada düşük doz kuersetin tedavisinin bifazik etki göstererek tamoksifenin hücreleri apoptoza yönlendirmesini engellediği ancak yüksek dozu ile kombinasyon tedavisi uygulandığında apoptozu indüklediği saptanmıştır [197].

Kuersetinin, MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında Hsp ısı şok proteinlerine etkisinin incelendiği bir araştırmada 25 μ M ve 100 μ M kuersetin tedavisinin Hsp proteinlerinin gen ifadesini azalttığı ve kaspazın çalışmasını tetikleyerek hücreleri apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir [198]. MCF-7 hücrelerinde flow sitometri yöntemiyle apoptozun değerlendirildiği başka bir çalışmada ise kuersetinin zamana bağlı olarak apoptoza uğrayan hücrelerin oranında artışa neden olduğu bulunmuştur [199].

MDA-MB-453 insan meme kanseri hücre hattına 1 μ M - 100 μ M konsantrasyon aralıklarında kuersetin tedavisi uygulanan bir çalışmada kuersetinin Bax ve Bcl-2 gen ifadelerini düzenleyerek, kaspaz-3 enziminin aktivitesini arttırarak apoptozu desteklediği gözlemlenmiştir [200].

Moleküler tipi HER2+ olan BT-474 insan meme kanseri hücrelerinde kuersetin tedavisinin apoptoza etkisinin gözlemlendiği bir araştırmada kuersetinin hücreleri dışsal yolak aracılığıyla apoptoza yönlendirdiği fakat kuersetin ile içsel yolağın tetiklenmediği tespit edilmiştir [201].

Kuersetin tedavisinin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattında apoptoz mekanizmasındaki rolünün araştırıldığı bir çalışmada kuersetinin 24 saatte dikkate değer derecede apoptotik etki sergilemediği fakat 48 saat inkübe edilen hücrelerde ise apoptoza giden hücrelerde artış olduğu ispatlanmıştır [202]. MTC insan medüller tiroid kanseri hücrelerinde valproik asit, suberoil bis-hidroksamik asit ve lityum klorürün apoptotik etkilerine bakılan bir çalışmada hem valproik asit - lityum klorür kombinasyon tedavisinin hem de suberoil bis-hidroksamik asit - lityum klorür kombinasyon tedavisinin apoptozu indüklediği belirlenmiştir [20].

Sinir kılıfı tümörlerinde lityum klorürün apoptotik etkilerinin gözlemlendiği bir araştırmada lityum klorürün apoptozu baskıladığı ve hücreleri nekroza yönlendirdiği görülmüştür [203].

Lityum klorür, mitomisin - c ve kombinasyonlarının MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerindeki apoptoza etkilerinin incelendiği bir çalışmada lityum klorürün Bax ve Bcl-2 genlerinin anlatımını düzenleyerek apoptoza geçişi hızlandırdığı gözlenmiştir [204].

NT2/D1 insan embriyonel karsinom hücrelerinde kuersetin ve lityum klorürün sitotoksik ve apoptotik etkilerinin ele alındığı bir araştırmada ise her iki etken maddenin en yüksek dozlarının p53 ve Wnt sinyal yolağı aracılığıyla hücre çoğalmasını baskıladığı kanıtlanmıştır [205].

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının aşırı aktifleşmesi meme kanseri hücrelerinin gelişip çoğalması ile ilişkili olduğu bilinmektedir [206]. CD44⁺/CD24⁻ meme kanseri kök hücreleri kuersetin ile muamele edilerek PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağına etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada kök hücrelerin PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı ile ilişkili olduğu ve kuersetinin bu yolakla hücre proliferasyonunu önleyebildiği tespit edilmiştir [207]. Lenf kanseri hücrelerine kuersetin tedavisi uygulanarak PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağına etkisinin incelendiği bir çalışmada kuersetinin bu yolağı baskıladığı ve apoptoza yönlendirdiği anlaşılmıştır [208].

Literatürde MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarında kuersetinin apoptoza etki ettiği yolakların ele alındığı şemada PI3K/Akt yolağını durdurabildiği fakat GSK3- β 'yı yukarı regüle ettiği bildirilmiştir [209]. HT-29 insan kolon kanseri hücreleri kuersetin ve epigallokateşin-3 gallat ile tedavi edilip GSK3- β ve Wnt yolağı üzerindeki etkilerine bakılan bir araştırmada kuersetinin GSK3- β 'yı baskılayamadığı fakat epigallokateşin-3 gallatın GSK3- α 'yı durdurucu özelliğinin olduğu sonucuna varılmıştır [210]. Lityumun ise GSK3- β 'yı durdurabildiği fakat Wnt/ β -katenin yolağını aktifleştirdiği bilinmektedir [211].

Kuersetin (100,9 μ M), lityum klorür (95,55 mM) ve kombinasyonları (IC₅₀ dozları) ile tedavi edilen insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) ve sağlıklı insan kolon fibroblast hücrelerinde (CCD) midkin ekspresyonu düzeyleri insan midkin deteksiyon kiti (Boster, Cat. No. EK1235) kullanılarak ölçülmüştür.

MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine 24 ve 48 saat tek başlarına kuersetin ve lityum klorür tedavisi uygulandığında kontrol grubuna göre belirgin şekilde midkin ekspresyonunda azalma olduğu saptanmıştır. Fakat kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavisinin ise 48 saatte kuersetinin kimyasal özelliği (metalleri kıskaçlama özelliği) [66] nedeniyle midkin ekspresyonunu dikkate değer derecede azaltmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

İnsan prostat kanseri hücre hatları olan PC-3, LNCaP hücrelerinde ve CD44+/CD133+ prostat kanseri kök hücrelerinde kuersetin ve midkin ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada hem siRNA ile midkinin susturulduğu hem de kuersetin ile muamele edilen hücrelerde hücre canlılığının azaldığı, apoptoza giden hücre sayısında artış olduğu ve sitokrom c düzeyinde dikkate değer derecede artış olduğu gözlemlenmiştir [212].

Meme kanseri teşhisi konulan hastaların cerrahi operasyon geçirmeden önce ve geçirdikten sonra toplanan serum biyolojik sıvılarında midkin seviyeleri ölçülen bir çalışmada cerrahi operasyonun ardından incelenen serumlarda midkin seviyelerinin belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır [213].

Lityum klorürün HTB-81 insan prostat kanseri hücre hattında midkin ekspresyonuna etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise lityum klorürün iki evreli etki sergileyerek düşük dozlarının midkin düzeyinin artmasına neden olurken, yüksek dozlarının midkin düzeyini azalttığı sonucuna varılmıştır [214].

Tez çalışması kapsamında; kuersetin ve lityum klorürün MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği, kombinasyon tedavisinde ise etken maddelerin antagonistik etkileşimleri nedeniyle apoptotik hücre yüzdelерinin düştüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle kuersetin + lityum klorür kombinasyon tedavilerinin kanser hücrelerinin sinyal yollarındaki etki mekanizmalarına ışık tutularak daha ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca kuersetin + lityum klorür kombinasyonlarının meme kanserinin tedavisine katkı sağlayabilmesi için öncelikle *in vivo* hayvan deneyleri ile sonrasında klinik çalışmalarla desteklenmesi önerilmektedir.

- [1] C. Burz, I. Berindan-Neagoe, O. Balacescu, and A. Irimie, "Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets," *Acta Oncologica*, vol. 48, no. 6, pp. 811-821, 2009.
- [2] P. A. Futreal, A. Kasprzyk, E. Birney, J. C. Mullikin, R. Wooster, and M. R. Stratton, "Cancer and genomics," *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 850-852, 2001.
- [3] J. Guziel and C. L Shapiro, Mount sinai expert guides. Wiley, pp. 1-22, 2019.
- [4] K. Polyak, "Breast cancer: origins and evolution," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 11, pp. 3155-3163, 2007.
- [5] Cancer today, <http://gco.iarc.fr/today/home.html>, 10.10.2021.
- [6] A. Burguin, C. Diorio, and F. Durocher, "Breast cancer treatments: Updates and new challenges," *J.Pers. Med.*, vol. 11, no. 8, p. 808, 2021.
- [7] M. Sudhakaran, S. Sardesai, and A. I. Doseff, "Flavonoids: New frontier for immuno-regulation and breast cancer control," *Antioxidants*, vol. 8, no. 4, p. 103, 2019.
- [8] J. A. Ross, and C. M. Kasum, "Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 22, pp. 19-34, 2002.
- [9] M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, and R. Masella, "Polyphenols, dietary sources and bioavailability," *Ann. Ist. Super. Sanita*, vol. 43, no. 4, pp. 348-361, 2007.
- [10] I. Erlund, "Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology," *Nutr. Res.*, vol. 24, no. 10, pp. 851-874, 2004.
- [11] S.-M. Tang, X.-T. Deng, J. Zhou, Q.-P. Li, X.-X. Ge, and L. Miao, "Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 121, p. 109604, 2020.
- [12] N. Ghosh, T. Chakraborty, S. Mallick, S. Mana, D. Singha, B. Ghosh, and S. Roy, "Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin-magnesium complex," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 151, pp. 807-813, 2015.
- [13] S. Trifunski and D. Ardelean, "Synthesis, characterization and antioxidant activity of Co(II) and Cd(II) complexes with quercetin," *Rev. Chim.*, no. 12, p. 3, 2016.
- [14] S. Roy, S. Banerjee, and T. Chakraborty, "Vanadium quercetin complex attenuates mammary cancer by regulating the P53, Akt/mTOR pathway and downregulates cellular proliferation correlated with increased apoptotic events," *BioMetals*, vol. 31, no. 4, pp. 647-671, 2018.

- [15] R. Ravichandran, M. Rajendran, and D. Devapiriam, "Structural characterization and physicochemical properties of quercetin-Pb complex," *J. Coord. Chem.*, vol. 67, no. 8, pp. 1449-1462, 2014.
- [16] B. Shahzad, M. N. Mughal, M. Tanveer, D. Gupta, and G. Abbas, "Is lithium biologically an important or toxic element to living organisms? An overview," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 103-115, 2017.
- [17] M. Bauer and, M. Gitlin, *The Essential Guide to Lithium Treatment*. Springer International Publishing, İsviçre, 2016.
- [18] S. Derman et al., "Antioxidant activity and hemocompatibility study of quercetin loaded PLGA nanoparticles," *Iran. J. Pharm. Res.*, vol. 19, no. 1, 2020.
- [19] I. Hirai, M. Okuno, R. Katsuma, N. Arita, M. Tachibana, and Y. Yamamoto, "Characterisation of anti-Staphylococcus aureus activity of quercetin: Anti-MRSA activity of quercetin," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 45, no. 6, pp. 1250-1254, 2010.
- [20] J. T. Adler, D. G. Hottinger, M. Kunnimalaiyaan, and H. Chen, "Inhibition of growth in medullary thyroid cancer cells with histone deacetylase inhibitors and lithium chloride," *J. Surg. Res.*, vol. 159, no. 2, pp. 640-644, 2010.
- [21] M. Suganthi, G. Sangeetha, G. Gayathri, and B. Ravi Sankar, "Biphasic dose-dependent effect of lithium chloride on survival of human hormone-dependent breast cancer cells (MCF-7)," *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 150, no. 1-3, pp. 477-486, 2012.
- [22] F. Marmol, "Lithium: Bipolar disorder and neurodegenerative diseases possible cellular mechanisms of the therapeutic effects of lithium," *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 32, no. 8, pp. 1761-1771, 2008.
- [23] K. E. Lukong, "Understanding breast cancer – The long and winding road," *BBA Clin.*, vol. 7, pp. 64-77, 2017.
- [24] A. Sudhakar, "History of cancer, ancient and modern treatment methods," *J. Cancer Sci. Ther.*, vol. 01, no. 02, pp. i-iv, 2009.
- [25] B. N. Chau, J. Bergseid, and J. Y. J. Wang, *Apoptosis and Cancer Therapy*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany, pp. 551-567, 2006.
- [26] L. A. Lambert, D. H. Lambert, and K. Keyomarsi, *The biology and treatment of cancer*. John Wiley & Sons, Inc., USA, pp. 101-122, 2008.
- [27] F. Hassiotou, and D. Geddes, "Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge," *Clin. Anat.*, vol. 26, no. 1, pp. 29-48, 2013.
- [28] P. M. Prendergast, *Cosmetic surgery*. Springer Berlin Heidelberg, Heidelberg, pp. 47-55, 2013.
- [29] Breast cancer signs and symptoms | most common symptoms, <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/breast-cancer-signs-and-symptoms.html>, 10.10.2021.
- [30] Meme kanseri evreleri, <https://vahitozmen.com/t/hastalar-icin-bilgiler/tani/evrelendirme/html>, 10.10.2021.

- [31] R. A. Oldenburg, H. Meijers-Heijboer, C. J. Cornelisse, and P. Devilee, "Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found?" *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 63, pp. 125-149, 2007.
- [32] C. Li, Ed., Breast cancer epidemiology. Springer New York, New York, 2010.
- [33] S. Zakhari, and J. Hoek, "Epidemiology of moderate alcohol consumption and breast cancer: Association or causation?" *Cancers*, vol. 10, no. 10, p. 349, 2018.
- [34] C. Wendt, and S. Margolin, "Identifying breast cancer susceptibility genes – a review of the genetic background in familial breast cancer," *Acta Oncol.*, vol. 58, no. 2, pp. 135-146, 2019.
- [35] M. A. Thorat, and R. Balasubramanian, "Breast cancer prevention in high risk women," *Best Prac. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, vol. 65, pp. 18-31, 2020.
- [36] P. Kenemans, R. A. Verstraeten, and R. H. M. Verheijen, "Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer," *Maturitas*, vol. 49, no. 1, pp. 34-43, 2004.
- [37] S. M. Fragomeni, A. Sciallis, and J. S. Jeruss, "Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer," *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, vol. 27, no. 1, pp. 95-120, 2018.
- [38] J. Makki, "Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance," *Clin. Med. Insights Pathol.*, vol. 8, 2015.
- [39] J. V. Fiorica, "Breast cancer screening, mammography, and other modalities" *Clin. Obstet. Gynecol.*, vol. 59, no. 4, pp. 688-709, 2016.
- [40] F. J. Gilbert, and K. Pinker-Domenig, Diseases of the Chest, Breast, Heart and Vessels 2019-2022. Springer International Publishing, Cham, 2019.
- [41] J. Zgajnar, Breast cancer management for surgeons. Springer International Publishing, Cham, 2018.
- [42] A. G. Waks, and E. P. Winer, "Breast cancer treatment: A review," *JAMA*, vol. 321, no. 3, p. 288, 2019.
- [43] J.-M. Renoir, V. Marsaud, and G. Lazennec, "Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 85, no. 4, pp. 449-465, 2013.
- [44] D. Ravishankar, A. K. Rajora, F. Greco, and Helen. M. I. Osborn, "Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy," *Int. J. Biochem. Cell Bio.*, vol. 45, no. 12, pp. 2821-2831, 2013.
- [45] X. Lu et.al., "Quercetin reverses docetaxel resistance in prostate cancer via androgen receptor and PI3K/Akt signaling pathways," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 16, no. 7, pp. 1121-1134, 2020.
- [46] K.-T. Tan, S. Li, Y. R. Li, S.-L. Cheng, S.-H. Lin, and Y.-T. Tung, "Synergistic anticancer effect of a combination of paclitaxel and 5-demethylnobiletin against lung cancer cell line in vitro and in vivo," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 187, no. 4, pp. 1328-1343, 2019.

- [47] C. G. Fraga, K. D. Croft, D. O. Kennedy, and F. A. Tomás-Barberán, "The effects of polyphenols and other bioactives on human health," *Food Funct.*, vol. 10, no. 2, pp. 514-528, 2019.
- [48] R. Tsao, "Chemistry and biochemistry of the dietary polyphenols," *Nutrients*, vol. 2, no. 12, pp. 1231-1246, 2010.
- [49] F. Cardona, C. Andrés-Lacueva, S. Tulipani, F. J. Tinahones, and M. I. Queipo-Ortuño, "Benefits of polyphenols on gut micromiota and implications in human health," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 24, no. 8, pp. 1415-1422, 2013.
- [50] Y. Zhou et al., "Natural Polyphenols for prevention and treatment of cancer," *Nutrients*, vol. 8, no. 8, p. 515, 2016.
- [51] F. Di Meo, A. Valentino, O. Petillo, G. Peluso, S. Filosa, S. Crispi, "Bioactive polyphenols and neuromodulation: Molecular mechanisms in neurodegeneration," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 7, p. 2564, 2020.
- [52] A. Serino, and G. Salazar, "Protective role of polyphenols against vascular inflammation, aging and cardiovascular disease," *Nutrients*, vol. 11, no. 1, p. 53, 2018.
- [53] D. Procházková, I. Boušová, and N. Wilhelmová, "Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 4, pp. 513-523, 2011.
- [54] M. Atinç, and İ. Kalkan, "Flavonoidler ve sağlık üzerine etkileri," *Aydın Gastron.*, vol. 2, no. 1, p. 8, 2018.
- [55] F. Perez-Vizcaino, and C. G. Fraga, "Research trends in flavonoids and health," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 646, pp. 107-112, 2018.
- [56] S. B. Gürlür, Y. Kiraz, and Y. Baran, *Biodiversity and Biomedicine*. Elsevier, pp. 403-440, 2020.
- [57] T. P. T. Cushnie, and A. J. Lamb, "Antimicrobial activity of flavonoids," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 26, no. 5, pp. 343-356, 2005.
- [58] D. M. Kopustinskiene, V. Jakstas, A. Savickas, and J. Bernatoniene, "Flavonoids as anticancer agents," *Nutrients*, vol. 12, no. 2, p. 457, 2020.
- [59] T. Aktaş, and H. Çölgeçen, "Farklı bitki türlerinden bitki doku kültürü teknikleriyle flavonoidlerin üretimi," p.9.
- [60] Z. Tavşan, and H. A. Kayali, "Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 116, 2019.
- [61] T. Kobayashi, T. Nakata, and T. Kuzumaki, "Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells," *Cancer Lett.*, vol. 176, no. 1, pp. 17-23, 2002.
- [62] N. L. Vukovic, A. D. Obradovic, M. D. Vukic, D. Jovanovic, and P. M. Djurdjevic, "Cytotoxic, proapoptotic and antioxidative potential of flavonoids isolated from propolis against colon (HCT-116) and Breast (MDA-MB-231) cancer cell lines," *Food Res. Int.*, vol. 106, pp. 71-80, 2018.

- [63] S. J. Maleki, J. F. Crespo, and B. Cabanillas, "Anti-inflammatory effects of flavonoids," *Food Chem*, vol. 299, p. 125124, 2019.
- [64] L. Le Marchand, "Cancer preventive effects of flavonoids—a review," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 56, no. 6, pp. 296-301, 2002.
- [65] L. Li, L. Zhang, and G.-H. Du, *Natural small molecule drugs from plants*. Springer Singapore, Singapore, pp. 725-729, 2018.
- [66] C. Chen, J. Zhou, and C. Ji, "Quercetin: A potential drug to reverse multidrug resistance," *Life Sci.*, vol. 87, no. 11-12, pp. 333-338, 2010.
- [67] G. S. Kelly, "Quercetin. Monograph," *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.*, vol. 16, no. 2, pp. 172-194, 2011.
- [68] W. Wang et al., "The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 56, pp. 21-38, 2016.
- [69] M. Ersoz, A. Erdemir, S. Derman, T. Arasoglu and B. Mansuroglu, "Quercetin-loaded nanoparticles enhance cytotoxicity and antioxidant activity on C6 glioma cells," *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 25, no. 6, pp. 757-766, 2020.
- [70] M. Ay, A. Charli, H. Jin, V. Anantharam, A. Kanthasamy, and A. G. Kanthasamy, *Nutraceuticals*. Elsevier, pp. 447-452, 2016.
- [71] Y. D. Min et al., "Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line," *Inflamm. Res.*, vol. 56, no. 5, pp. 210-215, 2007.
- [72] O. Maksymchuk, A. Shysh, I. Rosohatska, and M. Chashchyn, "Quercetin prevents type 1 diabetic liver damage through inhibition of CYP2E1," *Pharmacol. Rep.*, vol. 69, no. 6, pp. 1386-1392, 2017.
- [73] A. W. Boots, G. R. M. M. Haenen, and A. Bast, "Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 585, no. 2-3, pp. 325-337, 2008.
- [74] D. Kashyap, S. Mittal, K. Sak, P. Singhal, and H. S. Tuli, "Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: Recent advances," *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 10, pp. 12927-12939, 2016.
- [75] W. Kim et al., "Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 16, no. 3, pp. 155-162, 2005.
- [76] M. Kaneuchi, M. Sasaki, Y. Tanaka, N. Sakuragi, S. Fujimoto, and R. Dahiya, "Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1," *Int. J. Oncol.*, vol. 22, no. 1, pp. 159-164, 2003.
- [77] D. Sang, R. Li, and Q. Lan, "Quercetin sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide in vitro via inhibition of Hsp27," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 35, no. 6, pp. 832-838, 2014.
- [78] S. Srivastava et al., "Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrest cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 24049, 2016.

- [79] D. Mota de Freitas, B. D. Levenson, and J. L. Goossens, The alkali metal ions: Their role for life. Springer International Publishing, Cham, pp. 557-584, 2016.
- [80] W. A. Hart, and O. F. Beumel, The chemistry of lithium, sodium, potassium, rubidium, cesium and francium. Elsevier, pp. 331-367, 1973.
- [81] Ö. D. Eker, ve M. Ç. Eker, "Lityumun metabolik yan etkileri" *Psikiyatriye Güncel Yaklaşımlar*, vol. 2, no. 1, pp. 26-51, 2014.
- [82] P. B. Mitchell, "On the 50th Anniversary of John Cade's Discovery of the Anti-Manic Effect of Lithium," *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, vol. 33, no. 5, pp. 623-628, 1999.
- [83] E. Jakobsson et al., "Towards a unified understanding of lithium action in basic biology and its significance for applied biology," *The Journal of Membrane Biology*, vol. 250, no. 6, pp. 587-604, 2017.
- [84] J. A. Quiroz, "Molecular effects of lithium," *Molecular Interventions*, vol. 4, no. 5, pp. 259-272, 2004.
- [85] P. Patel, and J. R. Woodgett, Current topics in developmental biology. Elsevier, pp. 277-302, 2017.
- [86] J. A. McCubrey et al., "GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer," *Oncotarget*, vol. 5, no. 10, pp. 2881-2911, 2014.
- [87] M. J. Lee, N. Jin, J. R. Grandis, and D. E. Johnson, "Alterations and molecular targeting of the GSK-3 regulator, PI3K, in head and neck," *Biochim. Biophys. Acta BBA- Mol. Cell Res.*, vol. 1867, no. 6, pp. 118679, 2020.
- [88] J. A. McCubrey et al., "Diverse roles of GSK-3: Tumor promoter-tumor suppressor, target in cancer therapy." *Advances in Biological Regulation*, vol. 54, pp. 176-196, 2014.
- [89] E. J. Henriksen, "Dysregulation of Glycogen Synthase Kinase-3 in skeletal muscle and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes," *Current Diabetes Reviews*, vol. 6, no. 5, pp. 285-293, 2010.
- [90] V. Palomo, D. I. Perez, Ç. Gil, and A. Martinez, "The potential role of glycogen S-synthase kinase 3 inhibitors as Amyotrophic Lateral Sclerosis pharmacological therapy," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 18, no. 20, pp. 3028-3034, 2011.
- [91] M. Maqbool, M. Mobashir, and N. Hoda, "Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 107, pp. 63-81, 2016.
- [92] A. M. Albeely, S. D. Ryan, and M. L. Perreault, "Pathogenic feed-forward mechanisms in Alzheimer's and Parkinson's disease converge on GSK-3," *Brain Plast.*, vol. 4, no. 2, pp. 151-167, 2018.
- [93] M. Maqbool, and N. Hoda, "GSK3 Inhibitors in the therapeutic development of diabetes, cancer and neurodegeneration: Past, present and future," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 23, no. 29, 2017.

- [94] P. A. Sabancı et al., "Sorafenib and lithium chloride combination treatment shows promising synergistic effects in human glioblastoma multiforme cells *in vitro* but midkine is not implicated," *Neurol. Res.*, vol. 36, no. 3, pp. 189-197, 2014.
- [95] Y. Lan, X. Liu, R. Zhang, Kç Wang, Y. Wang, and Z.-C. Hua, "Lithium enhances TRAIL-induced apoptosis in human lung carcinoma A549 cells," *Biomaterials*, vol. 26, no. 2, pp. 241-254, 2013.
- [96] A. Phaniendra, D. B. Jestadi, and L. Periyasamy, "Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases," *Ind. J. Clin. Biochem.*, vol. 30, no. 1, pp. 11-26, 2015.
- [97] D. Trachootham, W. Lu, M. A. Ogasawara, N. R.-D. Valle, and P. Huang, "Redox regulation of cell survival," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, no. 8, pp. 1343-1374, 2008.
- [98] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, no. 1, pp. 1-40, 2006.
- [99] I. Liguori et al., "Oxidative stress, aging, and diseases," *Clin. Interv. Aging*, vol. 13, pp. 757-772, 2018.
- [100] A. M. Pisoschi, and A. Pop, "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 97, pp. 55-74, 2015.
- [101] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 44-84, 2007.
- [102] D. Grotto et al., "Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification," *Quím. Nova*, vol. 32, no. 1, pp. 169-174, 2009.
- [103] O. Özcan, H. Erdal, G. Çakırca, and Z. Yönden, "Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA," *J. Clin. Exp. Investig.*, vol. 6, no. 3, 2015.
- [104] A. Somogyi, K. Rosta, P. Pusztai, Z. Tulassay, and G. Nagy, "Antioxidant measurements," *Physiol. Meas.*, vol. 28, no. 4, 2007.
- [105] M. Carrocho, and I. C. F. R. Ferreira, "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives," *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 51, pp. 15-25, 2013.
- [106] I. S. Young, "Antioxidants in health and disease," *J. Clin. Pathol.*, vol. 54, no. 3, pp. 176-186, 2001.
- [107] B. Aydemir, and E. K. Sari, "Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi," *Kocatepe Vet. J.*, vol. 2, no. 2, 2009.
- [108] E. Nozik-Grayck, H. B. Suliman, and C. A. Piantadosi, "Extracellular superoxide dismutase," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 37, no. 12, pp. 2466-2471, 2005.

- [109] G. Teskey et al., *Advances in clinical chemistry*. Elsevier, pp. 141-159, 2018.
- [110] H. J. Forman, H. Zhang, and A. Rinna, "Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis," *Mol. Aspects Med.*, vol. 30, no. 1-2, pp. 1-12, 2009.
- [111] K. Aquilano, S. Baldelli, and M. R. Ciriolo, "Glutathione: New roles in redox signaling for an old antioxidant," *Front. Pharmacol.*, vol. 5, 2014.
- [112] Mamta, K. Misra, G. S. Dhillon, S. K. Brar, and M. Verma, *Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals*. Springer New York, New York, 2014.
- [113] J. M. Estrela, A. Ortega, and E. Obrador, "Glutathione in cancer biology and therapy," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 43, no. 2, pp. 143-181, 2006.
- [114] I. Foster, "Cancer: A cell cycle defect," *Radiography*, vol. 14, no. 2, pp. 144-149, 2008.
- [115] G. H. Williams, and K. Stoeber, "The cell cycle and cancer," *J. Pathol.*, vol. 226, no. 2, pp. 352-364, 2012.
- [116] K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman, "The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer," *Cell Proliferation*, vol. 36, no. 3, pp. 131-149, 2003.
- [117] C. E. Caldon, R. J. Daly, R. L. Sutherland, and E. A. Musgrove, "Cell cycle control in breast cancer cells," *J. Cell. Biochem.*, vol. 97, no. 2, pp. 261-274, 2006.
- [118] J. H. Houtgraaf, J. Versmissen, and W. J. van der Giessen, "A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells," *Cardiovasc. Revasc. Med.*, vol. 7, no. 3, pp. 165-172, 2006.
- [119] P. Lara-Gonzalez, F. G. Westhorpe, and S. S. Taylor, "The spindle assembly checkpoint," *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 22, 2012.
- [120] T. Sandal, "Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer," *The Oncologist*, vol. 7, no. 1, pp. 73-81, 2002.
- [121] P. Hydbring, M. Malumbres, and P. Sicinski, "Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases," *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, vol. 17, no. 5, pp. 280-292, 2016.
- [122] C.-C. Chou et al., "Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 33, no. 8, pp. 1181-1191, 2010.
- [123] J.-A. Choi et al., "Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin," *Int. J. Oncol.*, 2001.
- [124] G. Coşkun, and H. Özgür, "Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması," *Arşiv Kaynak Tarama Derg.*, vol. 20, no. 3, 2011.
- [125] B. Alberts, *Molecular biology of cell*, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, 2015.

- [126] H. Akşit, ve A. Bildik “Apoptosis,” *Yüzüncü Yıl Üni. Vet. Fakültesi Derg.*, vol. 19, no. 1, 2008.
- [127] S. L. Fink, and B. T. Cookson, “Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells” *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 4, pp. 1907-1916, 2005.
- [128] S. Gupta, “Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis,” *Life Sci.*, vol. 69, no. 25-26, pp. 2957-2964, 2001.
- [129] D. L. Vaux, and S. J. Korsmeyer, “Cell death in development,” *Cell*, vol. 96, no. 2, pp. 245-254, 1999.
- [130] T. Harada, “Apoptosis and endometriosis,” *Front. Biosci.*, vol. 12, no. 8-12, p. 3140, 2007.
- [131] S. Orrenius, “Mitochondrial regulation of apoptotic cell death,” *Toxicol. Lett.*, vol. 149, no. 1-3, pp. 19-23, 2004.
- [132] C. Pfeffer, and A. Singh, “Apoptosis: A target for anticancer therapy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 2, p. 448, 2018.
- [133] T. J. Sayers, “Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 60, no. 8, pp. 1173-1180, 2011.
- [134] K. Matsuura, K. Canfield, W. Feng, and M. Kurokawa, International review of cell and molecular biology. Elsevier, pp.43-87, 2016.
- [135] Y. Kiraz, A. Adan, M. Kartal Yandim, and Y. Baran, “Major apoptotic mechanisms and fenes involved in apoptosis,” *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 7, pp. 8471-8486, 2016.
- [136] K. Kartlaşmış, U. Kökbaş, ve L. Kayrın, “Apoptozisin biyokimyası,” *Arşiv Kaynak Tarama Derg.*, vol. 25, no. 1, p. 52, 2016.
- [137] K. W. Yip, and J. C. Reed, “Bcl-2 family proteins and cancer,” *Oncogene*, vol. 27, no. 50, pp. 6398-6406, 2008.
- [138] C. M. Adams, S. Clark-Garvey, P. Porcu, and C. M. Eischen, “Targeting the Bcl-2 family in B cell lymphoma,” *Front. Oncol.*, vol. 8, no. 636, 2019.
- [139] E. Wawryk-Gawda et al., “P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells,” *Protoplasma*, vol. 251, no. 3, pp. 525-533, 2014.
- [140] G. Pistritto, D. Trisciuglio, C. Ceci, A. Garufi, and G. D’Orazi, “Apoptosis as anticancer mechanisms: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies,” *Aging*, vol. 8, no. 4, pp. 603-619, 2016.
- [141] M. S. D’Arcy, “Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy,” *Cell Biol. Int.*, vol. 43, no. 6, pp. 582-592, 2019.
- [142] T. Knight, D. Luedtke, H. Edwards, J. W. Taub, and Y. Ge, “A delicate balance– the Bcl-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 162, pp. 250-261, 2019.
- [143] S. Fulda, “Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer,” *Int. J. Cell Biol.*, vol. 2010, pp. 1-6, 2010.

- [144] Ö. Güleş, ve Ü. Eren, "Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler," *Yüzüncü Yıl Üni. Vet. Fakültesi Derg.*, vol. 19, no. 2, 2008.
- [145] G. Ç. Dinçel, ve O. Kul "Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri," *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg.*, vol. 5, no. 1, pp. 811-821, 2016.
- [146] H. Jono, and Y. Ando, "Midkine: A novel prognostic biomarker for cancer," *Cancers*, vol. 2, pp. 624-641, 2010.
- [147] M. Ergüven, T. Muramatsu, and A. Bilir, Ed., *Midkine: From Embryogenesis to Pathogenesis and Therapy*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2012.
- [148] T. Muramatsu, "Midkine and Pleiotrophin: Two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis," *J. Biochem*, vol. 132, no. 3, pp. 359-371, 2002.
- [149] K. Kadomatsu, S. Kishida, and S. Tsubota, "The heparin-binding growth factor midkine: The biological activities and candidate receptors," *J. Biochem.*, vol. 153, no. 6, pp. 511-521, 2009.
- [150] S. Arokiasamy, M. J. M. Balderstone, G. De Rossi, and J. R. Whiteford "Syndecan-3 in inflammation and angiogenesis," *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 3031, 2020.
- [151] P. S. Filippou, G. S. Karagiannis, and A. Constantinidou, "Midkine (MDK) growth factor: A key player in cancer progression and a promising therapeutic target," *Oncogene*, vol. 39, no. 10, pp. 2040-2054, 2020.
- [152] T. Muramatsu, "Structure and function of midkine as the basis of its pharmacological effects: Structure and function of midkine," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 171, no. 4, pp. 814-826, 2014.
- [153] S. Kishida et al., "Midkine promotes neuroblastoma through Notch2 signaling," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 4, pp. 1318-1327, 2013.
- [154] Y. Cai, Y. Lv, Z. Mo, J. Lei, J. Zhu, and Q. Zhong, "Multiple pathophysiological roles of midkine in human disease," *Cytokine* vol. 135, 2020.
- [155] C. Xu, S. Zhu, M. Wu, W. Han, and Y. Yu, "Functional receptors and intracellular signal pathways of midkine (MK) and pleiotrophin (PTN)," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 37, no. 4, pp. 511-520, 2014.
- [156] T. Ohuchida et al., "Midkine protects hepatocellular carcinoma cells against TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of caspase-3 activity," *Cancer*, vol. 100, no. 11, pp. 2430-2436, 2004.
- [157] G. Zhao, Y. Nie, M. Lv, L. He, T. Wang, and Y. Hou, "ER β -mediated estradiol enhances epithelial mesenchymal transition of lung adenocarcinoma through increasing transcription of midkine," *Mol. Endocrinol.*, vol. 26, no. 8, pp. 1304-1315, 2012.
- [158] Y. Tong et al., "Overexpression of midkine contributes to anti-apoptotic effects in human meningiomas," *J. Neurochem*, vol. 100, no. 4, pp. 1097-1107, 2007.

- [159] Y. Huang, M. Sook-Kim, and E. Ratovitski, "Midkine promotes tetraspanin-integrin interaction and induces FAK-Stat1 α pathway contributing to migration/invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 377, no. 2, 2008.
- [160] M. Erguven et al., "Decreased therapeutic effects of noscapine combined with imatinib mesylate on human glioblastoma in vitro and the effect of midkine," *Cancer Cell Int.*, vol. 11, no. 1, p. 18, 2011.
- [161] Y. Xu et al., "Midkine positively regulates the proliferation of human gastric cancer cells," *Cancer Lett.*, vol. 279, no. 2, pp. 137-144, 2009.
- [162] Ş. Comşa, A. M. Cîmpean, and M. Raica, "The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research", *ANTICANCER Res.*, s. 8, 2015.
- [163] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63, 1983.
- [164] J. C. Stockert, R. W. Horobin, L. L. Colombo, and A. Blázquez-Castro, "Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives," *Acta Histochem.*, vol. 120, no. 3, pp. 159-167, 2018.
- [165] A. van Tonder, A. M. Joubert, ve A. D. Cromarty, "Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays," *BMC Res. Notes.*, vol. 8, no. 1, p. 47, 2015.
- [166] M. B. Hansen, S. E. Nielsen, and K. Berg, "Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill," *J. Immunol. Methods*, vol. 119, no. 2, pp. 203-210, 1989.
- [167] P. K. Smith et al., "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Anal. Biochem.*, vol. 150, no. 1, pp 76-85, 1985.
- [168] B. J. S. C. Olson ve J. Markwell, "Assays for Determination of Protein Concentration," *Curr. Protoc. Protein Sci.*, vol. 48, no. 1, 2007.
- [169] A. Ayala, M. F. Muñoz, ve S. Argüelles, "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal," *Oxid. Med. Cell Longev.*, vol. 2014, pp. 1-31, 2014.
- [170] D. R. Janero, "Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 9, no. 6, pp. 515-540, 1990.
- [171] B. Halliwell ve S. Chirico, "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 57, no. 5, 1993.
- [172] M. E. Anderson, *Methods in enzymology*. Elsevier, 1985.
- [173] S. Gromer, H. Merkle, R. H. Schirmer, and K. Becker, *Methods in enzymology*. Elsevier, 2002

- [174] F. Johnson ve C. Giulivi, "Superoxide dismutases and their impact upon human health," *Mol. Aspects Med.*, vol. 26, no. 4-5, pp. 340-352, 2005.
- [175] S. Goldstein, C. Michel, W. Bors, M. Saran, and G. Czapski, "A critical reevaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 4, no. 5, pp. 295-303, 1988.
- [176] M. O. Kanev ve F. D. Gökalp Muranli, "Flow Sitometri ve Kullanım Alanları," *SAÜ Fen Bilim. Enstitüsü Derg.*, vol. 20, no. 1, p. 33, 2015.
- [177] M. G. Macey, *Flow Cytometry*. Humana Press, Totowa, 2007.
- [178] A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, and A. Nalbant, "Flow cytometry: basic principles and applications," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 37, no. 2, pp. 163-176, 2017.
- [179] H. Jacene, *Molecular imaging*. Cambridge University Press, 2017.
- [180] T.-C. Chou, "Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies," *Pharmacol. Rev.*, vol. 58, no. 3, pp. 621-681, 2006.
- [181] C.-C. Chou et al., "Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 33, no. 8, pp. 1181-1191, 2010.
- [182] M. Shirai, R. Yamanishi, J.-H. Moon, K. Murota, and J. Terao, "Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide-induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblasts," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 66, no. 5, pp. 1015-1021, 2002.
- [183] S. M. Rybak, and F. E. Stockdale, "Growth effects of lithium chloride in BALB/c 3T3 fibroblasts and madin-darby canine kidney epithelial cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 136, no. 2, pp. 263-270, 1981.
- [184] P.-G. Pietta, "Flavonoids as antioxidants," *J. Nat. Prod.*, vol. 63, no. 7, pp. 1035-1042, 2000.
- [185] C. Chen, J. Zhou, and C. Ji, "Quercetin: A potential drug to reverse multidrug resistance," *Life Sci.*, vol. 87, no. 11-12, pp. 333-338, 2010.
- [186] A. Torreggiani, M. Tamba, A. Trinchero, and S. Bonora, "Copper(II)-Quercetin complexes in aqueous solutions: spectroscopic and kinetic properties," *J. Mol. Struct.*, pp. 759-766, 2005.
- [187] L. Dangleterre, and J.-P. Cornard, "Interaction of lead (II) chloride with hydroxyflavones in methanol: A spectroscopic study," *Polyhedron*, vol. 24, no. 12, pp. 1593-1598, 2005.
- [188] G. Le Nest, O. Caille, M. Woudstra, S. Roche, F. Guerlesquin, and D. Lexa, "Zn- polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies," *Onorganica Chim. Acta*, vol. 357, no. 3, pp. 775-784, 2004.

- [189] E. Klauser, M. Gülden, E. Maser, S. Seibert, and H. Seibert, "Additivity, antagonism, and synergy in arsenic trioxide-induced growth inhibition of C6 glioma cells: Effects of genistein, quercetin and buthionine-sulfoximine," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 67, pp. 212-221, 2014.
- [190] Y. Aras, M. Erguven, E. Aktas, N. Yazihan, and A. Bilir, "Antagonist activity of the antipsychotic drug lithium chloride and the antileukemic drug imatinib mesylate during glioblastoma treatment in vitro," *Neurol. Res.*, vol. 38, no. 9, pp. 766-774, 2016.
- [191] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. Kalayci, "Oxidative Stress and Antioxidant Defense," *World Allergy Organ. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 9-19, 2012.
- [192] K. Murota, and J. Terao, "Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 417, no. 1, pp. 12-17, 2003.
- [193] R. Ferraresi et al., "Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin," *Free Radic. Res.*, vol. 39, no. 11, pp. 1249-1258, 2005.
- [194] M. R. de Oliveira, S. M. Nabavi, N. Braidy, W. N. Setzer, T. Ahmed, and S. F. Nabavi, "Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view," *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 5, pp. 532-549, 2016.
- [195] T. Fukai, and M. Ushio-Fukai, "Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 15, no. 6, pp. 1583-1606, 2011.
- [196] G. S. Shukla, "Mechanism of lithium action: In vivo and in vitro effects of alkali metals on brain superoxide dismutase," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 26, no. 2, pp. 235-240, 1987.
- [197] Z. Xu, D. Zhao, X. Zheng, B. Huang, X. Xia, and X. Pan, "Quercetin exerts bidirectional regulation effects on the efficacy of tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer therapy: An in vitro study," *Environ. Toxicol.*, vol. 35, no. 11, pp. 1179-1193, 2020.
- [198] E. Kıyga, A. Şengelen, Z. Adıgüzel, and E. Öney Uçar, "Investigation of the role of quercetin as a heat shock protein inhibitor on apoptosis in human breast cancer cells," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 47, no. 7, pp. 4957-4967, 2020.
- [199] J.-A. Choi et al., "Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin," *Int. J. Oncol.*, 2001.
- [200] E. J. Choi, S. M. Bae, and W. S. Ahn, "Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 31, no. 10, pp. 1281-1285, 2008.
- [201] H.-S. Seo et al., "Quercetin induces caspase-dependent extrinsic apoptosis through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 signaling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells," *Oncol. Rep.*, vol. 36, no. 1, pp. 31-42, 2016.

- [202] L. T. Nguyen et al., "Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity," *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 21, no. 2, p. 205, 2017.
- [203] Y. Wang, Q. Zhang, B. Wang, P. Li, and P. Liu, "LiCl Treatment Induces Programmed Cell Death of Schwannoma Cells through AKT- and MTOR-Mediated Necroptosis," *Neurochem. Res.*, vol. 42, no. 8, pp. 2363-2371, 2017.
- [204] M. Razmi, A. Rabbani-Chadegani, F. Hashemi-Niasari, and P. Ghadam, "Lithium chloride attenuates mitomycin C induced necrotic cell death in MDA-MB-231 breast cancer cells via HMGB1 and Bax signaling," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 48, pp. 87-96, 2018.
- [205] M. Mojsin, V. Topalovic, J. Marjanovic, and M. Stevanovic, "Quercetin and lithium chloride modulate Wnt signaling in pluripotent embryonal carcinoma NT2/D1 cells," *Arch. Biol. Sci.*, vol. 65, no. 1, pp. 201-209, 2013.
- [206] S. Ghayad, and P. Cohen, "Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR Pathway: New Hope for Breast Cancer Patients," *Recent Patents Anticancer Drug Discov.*, vol. 5, no. 1, pp. 29-57, 2010.
- [207] X. Li et al., "Quercetin suppresses breast cancer stem cells (CD44+/CD24-) by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR-signaling pathway," *Life Sci.*, vol. 196, pp. 56-62, 2018.
- [208] M. Granato et al., "Concomitant reduction of c-Myc expression and PI3K/AKT/mTOR signaling by quercetin induces a strong cytotoxic effect against Burkitt's lymphoma," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 79, pp. 393-400, 2016.
- [209] R. Molani Gol, and S. Kheirouri, "The Effects of Quercetin on the Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and MDA-MB-231: A Systematic Review," *Nutr. Cancer*, 2021.
- [210] G. Pahlke, Y. Ngiewih, M. Kern, S. Jakobs, D. Marko, and G. Eisenbrand, "Impact of Quercetin and EGCG on Key Elements of the Wnt Pathway in Human Colon Carcinoma Cells," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 19, pp. 7075-7082, 2006.
- [211] Morgado-Díaz, "Lithium reduces tumorigenic potential in response to EGF signaling in human colorectal cancer cells," *Int. J. Oncol.*, vol. 38, no. 5, 2011.
- [212] S. Erdogan et al., "Midkine downregulation increases the efficacy of quercetin on prostate cancer stem cell survival and migration through PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 107, pp. 793-805, 2018.
- [213] H. Çetin Sorkun, M. Akbulut, Y. Enli, E. Tepeli, S. Özkan, and E. Erdem, "Quantitative comparison of immunohistochemical and PCR analysis of midkine expression in breast cancer types and serum midkine level," *Turk. J. Med. Sci.*, vol. 46, no. 1, pp. 219-227, 2016.
- [214] M. Erguven, G. Oktem, A. N. Kara, and A. Bilir, "Lithium chloride has a biphasic effect on prostate cancer stem cells and a proportional effect on midkine levels," *Oncol. Lett.*, vol. 12, no. 4, pp. 2948-2955, 2016.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Engüleç İ., Akbaş G., Mansuroğlu B., Bilir A., " Mcf-7 Hücre Kültürlerinde Kuersetin ve Lityum Klorür Uygulamalarının Midkine Ekspresyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi", 4th International Congress of Academic Research, 7-9 Aralık 2020, s.121

