

Bornil asetat ve 6-gingerolün antikanser etkilerinin MCF-7 (meme) ve A549 (akciğer) hücre hatlarında ve kanser kök hücrelerinde araştırılması

Özlem Tomsuk

DOKTORA TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Temmuz, 2022

Investigation of the anticancer effects of bornyl acetate and 6-gingerol in MCF-7 (breast) and A549 (lung) cell lines and cancer stem cells

Özlem Tomsuk

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biotechnology and Biosafety

July, 2022

Bornil asetat ve 6-gingerolün antikanser etkilerinin MCF-7 (meme) ve A549 (akciğer) hücre hatlarında ve kanser kök hücrelerinde araştırılması

Özlem TOMSUK

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK

İkinci Danışman: Prof. Dr. Hülya SİVAS

Bu tez ESOĞÜ BAP tarafından 20182317 no'lu ve 20211724 no'lu projeler çerçevesinde desteklenmiştir.

Temmuz, 2022

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK danışmanlığında hazırlamış olduğum “Bornil asetat ve 6-gingerolün antikanser etkilerinin MCF-7 (meme) ve A549 (akciğer) hücre hatlarında ve kanser kök hücrelerinde araştırılması ” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

19/07/2022

Özlem TOMSUK

İmza

ÖZET

Kanser tedavisinde son yıllarda gerçekleşen ilerlemelere karşın kanser hâlâ önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Doğal aktif bileşenlerden elde edilen yeni farmasötik ürünler son yıllarda kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, ülkemizde endemik olarak da bulunan inula türlerinin ana bileşenlerinden biri olan bornil asetatın (BA) antikanser etkisi ve 6- gingerol ile olan sinerjik etkisi BEAS-2B, MCF-7 ve meme kanser kök hücrelerinde (MKKH), A549 ve akciğer kanser kök hücrelerinde (AKKH) araştırılmıştır. Ülkemizde inula türleri halk arasında yaygın olarak kanser tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. İnula türlerinin ana bileşenlerinden biri olan BA hakkında sadece birkaç tane bilimsel çalışmaya rastlanmıştır. 6-gingerol (6G) zencefilin aktif maddelerinden biridir. Literatürde antioksidan, antitümörojenik ve antiinflamatuvar etkileri birçok makalede bildirilmiştir. Fakat literatürde hem BA ve 6G'nin sinerjik etkisine dair hem de bu maddelerin kanser kök hücreleri üzerindeki etkilerine dair bilgi boşluğu bulunmaktadır. Literatürdeki bu boşluğu doldurmak amacıyla; öncelikle BEAS-2B, MCF-7, MKKH, A549 ve AKKH hücrelerinde BA ve 6G'nin etkin dozları çeşitli sitotoksisite testleriyle araştırılmıştır. Ardından, H&E, immünohistokimya, AO/EB ve Anneksin V/PI, ROS, LDH ve RT²-PCR yöntemleri ile araştırmalar derinleştirilmiştir. Buna göre, BA ve 6G MCF-7, MKKH, A549 ve AKKH hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkiye sahiptir. RT²-PCR ile AKKH ve MKKH hücrelerinde BAX, BCL-2, TGFB1, TGFB3, WNT2, BMP2 ve ITGA5 gen ekspresyonları araştırılmış ve bu sonuçlara göre de apoptotik sinyal yollarının aktive olduğu ve test maddelerinin anti-kanser aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu çalışmada sadece belirli dozlarda BA ve 6G'nin etkisi değil aynı zamanda kanser kök hücreleri üzerindeki etkileri detaylı olarak literatüre sunulmuştur. Sonuç olarak, bu çalışma kanser kök hücrelerine dayalı yeni ilaçlar geliştirmeye teşvik etme potansiyelini taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bornil asetat, 6-gingerol, apoptoz, antikanser, sitotoksisite, kanser kök hücreleri, MCF-7, A549.

SUMMARY

Despite the advances in cancer treatment in recent years, cancer still emerges as an important public health problem. New pharmaceutical products derived from natural active ingredients have been used in cancer treatment in recent years. In this study, the anticancer effect and synergistic effect of bornyl acetate (BA), one of the main components of inula species, which are also endemic in our country, and the synergistic effect with 6-gingerol on BEAS-2B, MCF-7 and breast cancer stem cells (BCSC), A549 and lung cancer stem cells (LCSC) were investigated. Inula species are widely used in our country for cancer treatment. Only a few scientific studies have been found about BA, which is one of the main components of inula species. 6-gingerol (6G) is one of the active ingredients of ginger. Antioxidant, antitumorogenic and anti-inflammatory effects have been reported in many articles in the literature. However, there is a lack of information in the literature both about the synergistic effect of BA and 6G and the effects of these substances on cancer stem cells. In order to fill this gap in the literature; First of all, the effective doses of BA and 6G in BEAS-2B, MCF-7, BCSC, A549 LCSCs were investigated by various cytotoxicity tests. Then, researches were deepened with H&E, immunocytochemistry, AO/EB and Annexin V/PI, ROS, LDH and RT²-PCR methods. Accordingly, BA and 6G have cytotoxic and apoptotic effects in MCF-7, BCSC, A549 and LCSC cells. BAX, BCL-2, TGFB1, TGFB3, WNT2, BMP2 and ITGA5 gene expressions were investigated by RT²-PCR in LCSC and BCSC cells, and according to these results, it was revealed that apoptotic signaling pathways were activated and the test substances showed anti-cancer activity. In this study, not only the effect of certain doses of BA and 6G, but also the effects on cancer stem cells were presented in detail to the literature. In conclusion, this study has the potential to encourage the development of new drugs based on cancer stem cells.

Keywords: Bornyl acetate, 6-gingerol, apoptosis, anticancer, cytotoxicity, cancer stem cells, MCF-7, A549.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	6
2.1. Meme Kanseri	6
2.2. Akciğer Kanseri	11
2.2. Kanser Kök Hücreleri	15
2.4. Çalışmada Kullanılan Test Maddeleri	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Materyaller	22
3.2. Test Maddelerinin Hazırlanması	22
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	22
3.4. CD44+/CD24- Meme Kanseri Kök Hücrelerinin (MKKH) MCF-7 Hücre Hattından İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu	23
3.4.1. CD44+/CD24- MKKH'nin MCF-7 hücre hattından immünomanyetik olarak izolasyonu	23
3.4.2. CD44+/CD24- MKKH'nin kültürü	24
3.4.3. CD44+/CD24- MKKH Flow Sitometri ile Karakterizasyon Analizleri	25

İÇİNDEKİLER (Devamı)

3.5. CD326+ ve CD133+ Akciğer Kanseri Kök Hücrelerin A549 Hücre Hattından İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Kültürü	25
3.5.1. AKKH'lerin immunomanyetik olarak (MACS) izolasyonu (immunseleksiyon)	25
3.5.2. İzole Edilen CD326+ ve CD133+ Akciğer kanser kök hücrelerinin kültürü.....	26
3.5.3. CD326+ ve CD133+ Akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile izolasyon yönteminin karakterizasyonu	27
3.6. WST-1 Testi ile Mitokondriyel Aktivite Üzerinden Sitotoksite Analizi	28
3.7. Nötral Kırmızısı (NR) ile Lizozomal Aktivite Üzerinden Sitotoksite Analizi	29
3.8. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyaması ile Hücre Morfolojisinin İncelenmesi	29
3.9. İmmünositokimyasal Analiz ile Apoptotik Belirteçlerin İncelenmesi	30
3.10. Annexin V/PI ile Apoptoz Analizi	30
3.11. Akridin Oranj/ Etidyum Bromür (AO/EB) ile Apoptoz Analizi	31
3.12. ROS Analizi ile Oksidatif Stresin İncelenmesi	31
3.13. Laktat Dehidrogenaz Testi ile Hücre Nekrozunun İncelenmesi.....	32
3.14. RT ² -PCR Yöntemi.....	32
3.14.1. RT ² -PCR ile genotipik analizler.....	32
3.14.2. Total RNA izolasyonu.....	33
3.14.3. RNA konsantrasyonunun ölçümü	33
3.14.4. cDNA Eldesi	34
3.14.5. qRT-PCR reaksiyonunun hazırlanması	35
3.15. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1. Kanser Kök Hücrelerinin Akış Sitometri Yöntemi ile Karakterizasyon Analizleri	36
4.1.1. CD44+/CD24- meme kanser kök hücrelerinin (MKKH) akış sitometrisi ile karakterizasyon analizi.....	36
4.1.2. CD326+/CD133+ akciğer kanser kök hücrelerinin (akkh) akış sitometrisi ile karakterizasyon analizi.....	37
4.2. Sitotoksik Etkinin WST-1 Testi ile Mitokondriyel Aktivite Yoluyla Belirlenmesi	39
4.3. Sitotoksik Etkinin Nötral Kırmızısı Analizi ile Lizozomal Aktivite Yoluyla Belirlenmesi.....	47

İÇİNDEKİLER (Devamı)

4.4. Hücre Morfolojisinin H&E Boyama ile İncelenmesi	51
4.5. Apoptotik Belirteçlerin İmmunositokimyasal Olarak Değerlendirilmesi	57
4.6. Apoptotik Etkinin AO/EB Yöntemi ile Belirlenmesi.....	63
4.7. Apoptotik Etkinin Anneksin V/PI Yöntemi ile Belirlenmesi.....	69
4.8. Oksidatif Stresin ROS Aktivitesi Yoluyla Belirlenmesi	76
4.9. Hücre Nekrozunun LDH Analizi ile Belirlenmesi	78
4.10. RT ² -PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi	83
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR DİZİNİ	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. MCF-7 hücre hattından izole edilen CD44+/CD24- MKKH'nin karakterizasyonunun flow sitometrik olarak analizi	36
4.2. MCF-7 hücrelerinden izole edilen CD44+/CD24- MKKH sferik kültürünün invert mikroskop altında görüntülenmesi.....	37
4.3. A549 hücre hattından izole edilen CD326+/CD133+ AKKH'nin karakterizasyonunun flow sitometrik olarak analizi	38
4.4. A549 hücre hattından izole edilen CD326+/CD133+ AKKH sferik kültürünün invert mikroskop altında görüntüsü	38
4.5. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 testi ile değerlendirilmesi	40
4.6. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 testi ile değerlendirilmesi	42
4.7. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 testi ile değerlendirilmesi	43
4.8. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 testi ile değerlendirilmesi	44
4.9. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 testi ile değerlendirilmesi	46
4.10. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin Nötral kırmızısı alımı ile değerlendirilmesi.....	48
4.11. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin Nötral kırmızısı alımı ile değerlendirilmesi	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

4.12. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin	
Nötral kırmızısı alımı ile değerlendirilmesi.....	50
4.13. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin	
Nötral kırmızısı alımı ile değerlendirilmesi.....	51
4.14. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki	
morfolojik etkisinin H&E boyaması ile gösterilmesi	53
4.15. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki	
morfolojik etkisinin H&E boyaması ile gösterilmesi	54
4.16. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki	
morfolojik etkisinin H&E boyaması ile gösterilmesi	55
4.17. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki	
morfolojik etkisinin H&E boyaması ile gösterilmesi	56
4.18. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki	
morfolojik etkisinin H&E boyaması ile gösterilmesi	57
4.19. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin	
Bax ve Bcl-2 belirtecini kullanarak immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi	58
4.20. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin	
Bax ve Bcl-2 belirtecini kullanarak immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi	59
4.21. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin	
Bax ve Bcl-2 belirtecini kullanarak immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi	60
4.22. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin	
Bax ve Bcl-2 belirtecini kullanarak immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi	61
4.23. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin	
Bax ve Bcl-2 belirtecini kullanarak immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi	62
4.24. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin	
AO/EB yöntemi ile görüntülenmesi	65

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

4.25. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin AO/EB yöntemi ile görüntülenmesi	66
4.26. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin AO/EB yöntemi ile görüntülenmesi	67
4.27. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin AO/EB yöntemi ile görüntülenmesi	68
4.28. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin AO/EB yöntemi ile görüntülenmesi	69
4.29. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun apoptotik etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile değerlendirilmesi.....	71
4.30. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun apoptotik etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile değerlendirilmesi.....	72
4.31. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun apoptotik etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile değerlendirilmesi.....	73
4.32. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun apoptotik etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile değerlendirilmesi.....	74
4.33. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun apoptotik etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile değerlendirilmesi.....	75
4.34. Hücre gruplarında BA, 6G, BA/6G, 5-FU ve 5-FU/BA etkisinin intraselüler ROS seviyesinin flow sitometrik olarak değerlendirilmesi	77
4.35. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun etkisinin LDH yöntemi ile değerlendirilmesi	79
4.36. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun etkisinin LDH yöntemi ile değerlendirilmesi	80
4.37. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun etkisinin LDH yöntemi ile değerlendirilmesi	81

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

4.38. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun etkisinin LDH yöntemi ile değerlendirilmesi	82
4.39. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun etkisinin LDH yöntemi ile değerlendirilmesi	83
4.40. BA, 6G ve BA/6G maddelerinin AKKH hücreleri üzerindeki etkisinin gen ifade seviyesi 1 kat ve üzeri değişen BAX, BCL-2, TGFB1, TGFB3, WNT2, BMP2 ve ITGA5 genlerinin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak gösterilmesi.....	85
4.41. BA, 6G ve BA/6G maddelerinin MKKH hücreleri üzerindeki etkisinin gen ifade seviyesi 1 kat ve üzeri değişen BAX, BCL-2, TGFB1, TGFB3, WNT2 ve BMP2 genlerinin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak gösterilmesi.....	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

3.1. Çalışmada kullanılan kontrol ve deney grupları	23
3.2. Gen ekspresyonu cDNA sentezi için hazırlanan karışım içeriği.....	34
3.3. qPCR master-mix bileşen ve hacimleri.....	35



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler μM $^{\circ}\text{C}$ **Açıklama**

Mikromolar

Santigrat derece

Kısaltmalar

CD

FITC

PI

APC

BCL2

BAX

VEGFA

BMP2

WNT2

TGFB1

TGFB3

Açıklama

Cluster of differentiation

Fluorescein-5-isothiocyanate

Propidium iodide

Allophycocyanin

B-Cell CLL/Lymphoma 2/Apoptosis Regulator

BCL2 Associated X Protein

Vascular Endothelial Growth Factor A

Bone Morphogenetic Protein 2

Wnt Family Member 2

Transforming Growth Factor Beta 1

Transforming Growth Factor Beta 3

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Biyoteknolojik gelişmelerin getirdiği yeniliklere rağmen kanser hala önemini korumaktadır. Anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve bağışıklık sisteminin anormal tanınması ile karakterize edilen kanser “hiç iyileşmeyen bir yaraymış” gibi kabul edilmektedir (Yin vd., 2021). Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) 2018 yılı verilerine göre, Dünya’da 18,1 milyon kanser vakasına rastlanmış ve her yıl 9,6 milyon kişi kanser nedeni ile hayatını kaybetmiştir. 2040 yılına kadar bu rakamın ikiye katlanacağı ve 30-69 yaş arasında bulaşıcı olmayan hastalıklardan kaynaklanan ölümlerin %30’unun kanser nedeniyle olacağı öngörülmektedir. Ayrıca, Amerika’da 2019 yılı verilerine göre, 1.7 milyon kanser vakasına rastlanmış ve ortalama 600 bin kişi hayatını kaybetmiştir (Siegel vd., 2019).

Son yıllarda, kanser araştırmacıları ve uygulayıcıları odak noktalarını yavaş yavaş kanser hücrelerinden kanser ve kök hücrelere yönelik ikili bir ilgiye kaydırmışlardır. Hızla gelişen iki alanın, mevcut kanser alanının ve ortaya çıkan kök hücre alanının birleştirilmesi, kanserler için yeni tedavilerin geliştirilmesinde benzeri görülmemiş ışıltılar üretecek gibi görünmektedir. Kök hücreye özgü karakteristikler bu kapsamda ön plana çıkmaktadır. Kök hücreler kendini yenileme, kısıtlama olmaksızın göç edebilme ve çeşitli olgun hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte, gen mutasyonları ile veya belirli koşullar altında bu süreçler bozulabilir ve kök hücrelerin malign transformasyonuna yol açabilir. Plastisiteye sahip bu hücreler daha sonra giderek daha agresif hale gelebilmekte ve örneğin antikanser tedavileri gibi zorlu koşullara son derece uyum sağlayabilmektedir. Bununla birlikte, kök hücrelerin kendilerinin mi yoksa kök hücre benzeri fenotipler elde eden diğer hücrelerin mi kanser ilerlemesinin itici gücü olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır (Yin vd., 2021; Cao vd., 2021)

Son yıllarda hücresel araştırmalarda kullanılan geleneksel modeller yerine 3 boyutlu yöntemlerde geliştirilmektedir. Geleneksel modeller, petri kabındaki 2B kültüre ve hayvan testlerine dayanmaktadır. Bununla birlikte, 2D kültür, mikro ortamın yokluğundan kaynaklanan in vivo gerçek durumdan büyük ölçüde farklıdır. Buna karşılık, hayvan testleri daha güvenilirdir, ancak insan ve hayvanlar arasındaki mikro-ortamlardaki farkı görmezden gelmek zordur. Son zamanlarda, insanlara daha yakın bir model oluşturmak için yapay

organlar önerilmekte ve araştırmacılar 3B bu yöntemlere doğru hareket etmektedir. Bunlardan biri organoid kültür teknikleri, diğeri ise mikroakışkan teknolojisine dayanan organ-on-a-chip olmak üzere iki strateji hızla geliştirilmektedir. İlki üç boyutlu hücre teknolojisine dayanmaktadır. Ancak, karmaşık ve dinamik mikro ortamın yeniden üretilmesi için koşulları tam olarak kontrol etmek tartışmaya açık bir konu olarak yerini almaktadır. Buna karşılık, çip üzerindeki organ, mikro çevreyi düzenleyebilmektedir. Araştırmacılar, organoid kültür tekniğinin sınırlamalarını ele almak ve aynı zamanda çip üzerinde organın gerçekliğini geliştirmek için organoid kültür teknikleri ile mikroakışkan platformu arasında iş birlikleri kurmaktadır. Son yıllarda, mikroakışkanlara dayalı yapay organlar, göğüs, akciğer, canlı, kalp, böbrek vb. gibi birden fazla organ türü dahil olmak üzere çeşitlilik sunmakta ve hatta aynı organ için farklı modeller oluşturulmaktadır. Cancer-on-a-chip teknolojisi ile de kemoterapötiklerin muhtemel etkileri veya biyoteknolojik ilaç adaylarının etkisi araştırılmaya başlanmıştır (Cecen vd., 2021; Song vd., 2021). Bu bireysel organ modelleri zorlayıcı avantajlar sunsa da özellikle farmakokinetik ve farmakodinamik modelleme için prelinik testler için çip üzerinde organ teknolojisinin tam potansiyelinin, ancak insan fizyolojisini özetlemek için bu modelleri entegre ederek gerçekleştirilebileceği konusunda artan bir kabul olmuştur. Bu vizyonla motive olan araştırmacılar, vücuttaki ilaç aktivitesini etkileyen ardışık süreçleri kopyalayabilen çoklu organ modellerinin geliştirilmesini sürdürmeye başladılar. Bu tür bir sistem yaratmaya yönelik en yaygın yaklaşım, birden fazla mikro mühendislik ürünü organ modelini, fizyolojik olarak uygun bir şekilde fonksiyonel entegrasyon ve etkileşimlerine izin veren akışkan bir ağ aracılığıyla birbirine bağlamaktır. Bu alandaki son gelişmeler hem karmaşık organ düzeyindeki etkileri hem de organ-organ etkileşimlerini yansıtan vücut düzeyinde ilaç yanıtlarını öngörmek için bu insan 'çip üzerinde vücut' sistemlerinin benzersiz yeteneği sayesinde mümkün olmuştur. Böyle çalışmalarda, dört antikanser ilacının sıralı absorpsiyonunu, metabolizmasını ve etkinliğini göstermek için birbirine bağlı mikrofabiike hücre kültürü odalarından oluşan bir ağ oluşturmak için meme kanseri, bağırsak ve karaciğer modellerini birleştirmiştir. Bu sistemin bir uzantısı, ilaçların bağırsak absorpsiyonundan önce gastrointestinal sindirimini simüle etmek için bir mide asidi mide odasını içermektedir; bu, oral yoldan verilen ilaçların biyoyararlanımını ve etkinliğini belirleyen tüm fizyolojik süreçleri yakalamak için entegre insan modellerinin geliştirilebileceğini göstermiştir (Chaplin vd., 2015; Thomford vd., 2018; Cecen vd., 2021; Song vd., 2021; Nahak vd., 2022; Singh ve Seed, 2022).

İlaç etkinliğini test etmek için çip üzerinde organ yaklaşımlarının potansiyeli, kanser progresyonu sırasında bir mikro-mühendislik 3D epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) tahlili geliştiren yakın tarihli bir çalışmada araştırılmıştır. Akciğer kanseri sferoidlerini, endotelize edilmiş bir mikrokanaalın bitişiğindeki bir 3D matris jelinde kültürleyerek, bu model, endotelial hücreye bağlı bir şekilde kanser hücrelerinde EMT'nin neden olduğu tümör dağılımını ve fenotipik değişiklikleri özetlemiştir. Bu sistemin bir ilaç tarama platformu olarak potansiyelini göstermek için, keşif hattının başlarındaki muhtemel ilaçlardan ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı ilaçlara kadar uzanan 12 ilaç vasküler kanala tanıtılmış ve bunların inhibe etme yetenekleri EMT, kanser sferoidlerinin doğrudan görselleştirilmesiyle analiz edilmiştir. İlginç bir şekilde, bu modeldeki etkili ilaç konsantrasyonları, geleneksel bir 2D dağılım tahlilinde ölçülenlerden üç büyüklük sırası kadar farklıydı. Ayrıca, EMT'yi inhibe etmek için gereken konsantrasyona göre sıralanan 12 ilacın nispi sıralamaları, 2D kültür sonuçlarıyla tutarlı değildi. Öncü bileşikler ve şu anda pazarlanan ilaçlar arasındaki bu tür etkinlik karşılaştırması, aday yeni moleküler varlıkların bazı kapasitelerde diğer mevcut seçeneklerden daha iyi performans göstermesi arzu edildiğinden, kurşun optimizasyonu sırasında geçerli/uygun olmama kararları üzerinde derin bir etkiye sahip olabilir. Başka bir çalışmada, aynı grup, in vitro mikro hücre kültürü analoglarını hesaplamalı farmakokinetik ve farmakodinamik modellerle bağlamak için bu sistemlerin uygulanabilirliğini göstermiştir. Kolon kanseri, karaciğer ve kemik iliği bölmeleri yoluyla ortak ortamları yeniden dolaştırarak tegafur ve 5-florourasil antikanser aktivitesini modellemek için bir mikroakışkan cihaz oluşturuldu. Bu çalışmadan elde edilen toksisite verileri, mikro cihazdaki akış hızlarını, ortam hacimlerini, ilaç konsantrasyonlarını, reaksiyon kinetiğini ve sitotoksik aktiviteyi yansıtan hesaplamalı, fizyolojik tabanlı farmakokinetik ve farmakodinamik model ile birlikte analiz edilmiştir. Bu analizde deneysel olarak ölçülen sitotoksisite, in vivo hepatosit, kolon karsinomu ve hematopoetik kök hücre ölümünün daha doğru tahminlerini oluşturmak için hesaplama modelini iyileştirmek için kullanıldı. Bu çalışma, çip üzerinde organ modellerinde ölçekleme allometrisini ele almak ve insanla ilgili farmakokinetik ve farmakodinamik tahminler üretmek için mikro mühendislikle oluşturulmuş hücre kültürünü sayısal bir farmakokinetik ve farmakodinamik yaklaşımla birleştiren bütünleştirici bir strateji göstermektedir. Örneğin, şu anda kanser tedavisi olarak kullanılması düşünülen bir antimalaryal ilaç olan artemisinin antikanser etkilerini araştırmak için mikro mühendislikle hazırlanmış bir karaciğer kanseri modeli kullanıldı. Artemisinin katı tümörlere mikroakışkan iletimi, hücre-hücre yapışmasının

artmasına ve kanser hücresi göçünün etkili bir şekilde inhibisyonuna yol açmıştır, böylece ilacın bir antikanser terapötik olarak potansiyelini göstermiştir. Entegre tüm vücut fizyolojisinin mikro mühendislikle oluşturulmuş çok organlı modellerini yaratmada devam eden ilerleme ile birleştirildiğinde, bu çip üzerinde organ tabanlı fenotipik tarama yaklaşımı, ilacın yeniden konumlandırılmasının potansiyelinden yararlanmak için artan çabaları büyük ölçüde kolaylaştırabilir. Dolayısıyla doğal aktif bileşenler olmak üzere tüm ilaç adayları bu platformlar üzerinden test edilerek daha az maliyetli olarak ve kısa zamanda faz araştırmalarına geçmek mümkün olacaktır (Bersini vd., 2014; Chaplin vd., 2015; Esch vd., 2015; Bovard vd., 2017; Thomford vd., 2018; Mittal vd., 2018; Cecen vd., 2021; Song vd., 2021).

Kanserler artık yalnızca klonal olarak genişlemiş bir malign hücre popülasyonu olarak algılanmamaktadır. Artık tümörlerin klonal genişlemeyi sağlayan hücre içi sürücü mutasyonlarından ve çeşitli mikro çevresel bileşenlerin katkılarında kaynaklanan oldukça karmaşık sistemler olduğunu biliyoruz. Tümör hücreleri ve kanserle ilişkili fibroblastlar, hücre dışı matris (ECM) bileşenleri ve endotelial hücreler gibi stromal bileşenler arasındaki etkileşim, hastalığın ilerlemesini ve tedaviye yanıtı belirlemektedir. Hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimleri, tümör büyümesi ve gelişmesinde kilit rol oynarken tümör hücreleri ile stroma arasındaki etkileşimin, hastalığın başlamasını, ilerlemesini ve tedaviye direnci kontrol ettiği gösterilmiştir (Miller vd., 2020; Virumbrales-Muñoz ve diğerleri, 2017). Aslında, stromal hücreler epitel hücrelerini etkileyen kemokinleri, sitokinleri, büyüme faktörlerini ve ECM proteinlerini salgılar ve bu nedenle, çoğalma ve çevresini istila etme yeteneği de dahil olmak üzere tümörün ana özelliklerini etkilemektedir (Kalot vd., 2022; Wang vd., 2021; Mittal vd., 2018).

İnsan genomu dizisinin çıkarılmasından bu yana birçok hastalık için binlerce yeni molekül hedef olarak belirlenmiştir. Bu hedeflere yönelik olarak uygulanan yöntemler ile bilinen tıbbi bitkilere ait aktif bileşenler seçici aktivite gösterebilmektedir (Wanchai vd., 2018). Mevcut ilaç keşif çabalarında, doğal ürünler, doğrudan yüksek verimli taramada veya kimyasal kütüphaneler için sentetik veya yarı sentetik bileşiklerin geliştirilmesi için omurga yapıları olarak kullanılabilecek yeni kimyasal varlıkların önemli kaynaklarıdır. Tarihsel olarak, doğal aktif bileşenler özellikle kanser ve bulaşıcı hastalıklar için ilaç keşfinde ve ayrıca kardiyovasküler hastalıklar (örneğin, statinler) ve multipl skleroz (örneğin,

fingolimod) dahil olmak üzere diğer terapötik alanlarda önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, çok sayıda başarılı ilaç keşfi örneğine rağmen, doğal ürünlerin birkaç dezavantajı, ilaç şirketlerini doğal ürün bazlı ilaç keşif programlarını azaltmaya yöneltmiştir. Doğal ürün ekranları tipik olarak, geleneksel hedef tabanlı tahlillerle uyumlu olmayabilecek doğal kaynaklardan bir özütler kitaplığı içermektedir. İlgilenilen biyoaktif bileşiklerin belirlenmesi zor olabilir ve bilinen bileşiklerin yeniden keşfedilmesini önlemek için replikasyon araçlarının uygulanması gerekir. Biyoaktif bir doğal ürünü izole etmek ve karakterize etmek için yeterli biyolojik materyale erişmek de zor olabilir. Ayrıca, ilgili biyoaktiviteler sergileyen (değiştirilmemiş) doğal ürünler için fikri mülkiyet (IP) haklarının kazanılması bir engel olabilir, çünkü doğal olarak oluşan bileşikler orijinal formlarında her zaman patentlenemeyebilir (yasal çerçeveler ülkeler arasında değişiklik gösterir ve gelişmektedir), ancak basit türevleri olmasına rağmen patent korumalı olabilir. Ek bir karmaşıklık katmanı, 2014 yılında yürürlüğe giren Birleşmiş Milletler 1992 Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi ve Nagoya Protokolü çerçevesinde biyolojik materyalin menşe ülkeleri ile fayda paylaşımı ihtiyacını tanımlayan düzenlemelerle ilgili olmuştur (Koparde vd., 2019; Atanasov vd., 2021; Gonzalez vd., 2022).

Doğal aktif bileşenlerden elde edilen yeni farmasötik ürünler son yıllarda kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkilerden elde edilen bazı bileşenlerin özellikle flavanoitler, fenolik bileşikler, alkaloitler, lektinler ve terpenoitlerin antikanser veya antitümöral aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu gibi doğal bileşenler etkilerini farklı mekanizmalar ve hücre sinyal yolları ile ortaya koymaktadır. Alkaloitler iğ ipliklerine etki ederek, kanserli hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerlemelerini engellerken, fenolik bileşikler ise daha çok hücre döngüsünü kontrol eden apoptotik mekanizmada rol alan proteinler üzerinde etkili olmaktadır (Gadioli vd., 2018). Bu etki mekanizmaları, reseptörler, reseptör proteinleri, matriks proteinleri, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri vb. gibi moleküler hedefler düzeyinde olabilmektedir (Manure vd., 2018). Örneğin, indirubinin seçici olarak siklin-bağımlı kinazları inhibe ettiği moleküler hedefler üzerinde etkili oldukları rapor edilmiştir (Balunas ve Kinghorn, 2005; Wanchai vd., 2018). Aynı zamanda bitkilerden elde edilen bu sekonder metabolitlerin birçok patolojik durumla ilişkilendirilen oksidatif strese karşı da koruyucu etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Böylelikle, yan etkisi en az olabilecek seçici özelliği olan yeni ilaçlar araştırılmaktadır (Rajesh vd., 2015;

West, 2017; Johnson vd., 2018; Manure vd., 2018; Sun vd., 2018; Isgut vd., 2018; Atanasov vd.,2021).

Bu tez çalışmasında bazı biyolojik etkileri bilinen 6-gingerol ile etkisi henüz tanımlanmamış olan halk arasında yaygın olarak kullanılan ve ülkemizde endemik türleri bulunan *Inula sp.* bitkisinin bileşenlerinden birisi olan fonksiyonel bisiklik bir monoterpen olan bornil asetatın önemli kanser türlerinden meme ve akciğer kanser hücrelerinde ve bu hücrelerden elde edilen kanser kök hücrelerindeki antikanser etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1.Meme Kanseri

Meme kanseri, dünyada en yaygın kanserlerden birisi olup yeni teşhisi konulan ikinci sıradaki kanser türüdür (Mitra ve Dash, 2018). Küresel olarak, yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakası kaydedilmiştir (melanom dışı cilt kanseri hariç; 18,1 milyon), 2020 yılında kanserden yaklaşık 10,0 milyon hayatını kaybetmiştir (melanom dışı cilt kanseri hariç 9,9 milyon). Halk Sağlığı Kurumu tarafından yayınlanan, Türkiye birleşik veri tabanı istatistiklerine göre, %24.9 oranında kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş Türkiye birleşik veri tabanı istatistiklerine göre ise 40 yaş üstü kadınlarda %43 oranında en sık görülen kanser türüdür (Türkiye kanser istatistikleri, 2017). Dolayısıyla, kadınlarda başlıca ölüm nedeni haline gelmekte ve meme kanseriyle ilişkili risk faktörleri her geçen gün artmaktadır. Araştırmalar meme kanserinin yaşa özgü olabileceğini ve klinik semptomlar, moleküler profil, biyolojik özellikler, histopatoloji ve tedaviye yanıt gibi özelliklerinin diğer kanser türlerinden farklı olduğunu göstermiştir (Ruan vd., 2022; Riaz vd., 2022; Braso-Maristany vd., 2021).

Kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel olarak uygulanan tedavi yöntemlerinin yan etkileri birçok eksojen ve endojen faktörü uyurabildiğinden tekrar meme kanseri riskini artırabilmektedir. Meme kanseri tedavisinde kemoterapi ve hormonal adjuvan tedavisi, cerrahi öncesi tümör boyutunu küçültmeyi hedeflerken, cerrahi ve radyoterapi sonrası tümör

dokusunu yok etmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca ileri evre meme kanseri veya metastaz hastalarına semptomları kontrol altına almak ve sağkalımı iyileştirmek için sistemik kemoterapi uygulanmaktadır. Bununla birlikte, meme kanseri tedavisinde kemoterapiye direnç hala bulunmakta ve bu da tedavi başarısızlığına neden olmaktadır. Genetik ve çevresel faktörler, kentsel yaşam tarzı, kentleşme, düşük gelirli ülkelerde erken teşhis eksikliği ve yetersiz tesisler gibi çeşitli faktörler bu kanser türünün insidansını artırmaktadır. Bu durum, meme kanseri hastalarının tedavi edilmesini daha zor hale getirmekte ve meme kanserine dayalı ölümler giderek artmaktadır. Meme metastatik kanseri çoğu kadının ölümüne neden olmakta ve kanıtlar göstermektedir ki bu kanser türünün erken teşhisinin, hastalığı tahmin etme ve yönetmede hayati olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca metastaz sürecindeki aktif moleküllerin ve mekanizmaların anlaşılması ve saptanması, metastatik meme kanserli hastalarda tedavi yaklaşımlarına sunmaktadır. Bu nedenlerle, birçok araştırma, meme kanserinin daha etkili ve yan etkisi az tedavisine odaklanmak üzere ilaç tasarımları geliştirmek üzerine yapılmaktadır (Ruan vd., 2022; Ko ve Moon, 2015; Mitra ve Dash, 2018; Zakaria vd., 2018). Meme kanserli metastaz yapmış hastalarda %30-60 kemik lezyonu, %21-32 akciğer lezyonu, %4-10 beyin lezyonu ve %15-32 karaciğer lezyonu bulunmaktadır. Özellikle, akciğer metastazları tipik olarak meme kanserinin birincil tanısından sonraki beş yıl içinde ortaya çıkmakta ve mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde etkilemektedir. Bu tür metastazlar, öksürüğe, hemoptiziye, solunum güçlüğüne ve yakın ölüme yol açan normal akciğer işlevine müdahale etmektedir. Meme kanserinin akciğer metastazlarından ölen hastaların yaklaşık %60-70'ini tedavi etmek zor olmaya devam etmektedir. Ortalama sağ kalımı yalnızca 25 ay olan, yalnızca akciğer metastazı olan hastalarda özellikle prognoz düşüktür. Meme kanserli hastaların yönetiminde hormonal ve hedefe yönelik tedaviye karşı koyan faktörleri ortadan kaldıracak etkili ve daha az toksik tedavi stratejilerinin belirlenmesi önemlidir. Meme kanserlerinde pek çok mutasyon olduğu, epigenetik faktörlerin yanı sıra transkripsiyonel seviyede birçok değişikliğin olduğu bulgulanmıştır. BRCA1, BRCA2, p53 ve PTEN gibi gen mutasyonları daha çok ailesel meme kanseri öykülerinde gözlenmektedir (Braso-Maristany vd., 2021; Riaz vd., 2022).

Meme kanseri genellikle duktal veya lobüler epitel hücreleri hiperproliferasiyona uğradığında ve iyi huylu tümörler geliştirdiğinde başlar. Duktal karsinomlar, teşhis edilen vakaların %40-70'ini oluşturur ve ilk olarak normal epitelyumun düz epitelyal atipiyeye (FEA) dönüşmesiyle, ardından atipik duktal hiperplazi ve ardından duktal karsinoma in situ'ya

(DCIS) dönüşerek ilerlediğine inanılmaktadır ve daha sonra invaziv duktal karsinom (IDC) ve malign meme kanseri ile sonuçlanabilmektedir. Öte yandan, lobüler kökenli meme kanserleri normal lobüler epitel hücreleri atipik lobüler hiperplazi geliştirdiğinde başlar ve daha sonra lobüler karsinoma in situ'ya (LCIS) dönüşür. LCIS, invaziv lobüler karsinom (ILC) olarak adlandırılan daha agresif bir forma daha da ilerleyebilir. Meme malignitelerinin %1'inden azını oluşturan diğer bir nadir meme neoplazmı formu, memenin mezenkimal dokusunun heterojen neoplazmalarından kaynaklanan meme sarkomudur (Miyazaki vd., 2019). İkincisi, memenin bağ dokusu ve mezoderminden kaynaklanan fibro-epitelyal neoplazmları içerir. Memede lipomatöz ve nöral tümörlere ek olarak vasküler neoplazmalar da bildirilmektedir. Hiperplastik meme tümörlerinin malign ve agresif tümörlere ilerlemesine birçok faktörün katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu faktörler arasında hormonlar, yaş, genetik mutasyonlar ve DNA onarım sistemindeki hatalar, kimyasal ve çevresel kanserojenler, diyet ve yaşam tarzı yer alır (Kalot vd., 2022; Forman, 2020).

Meme kanseri tedavi stratejilerinde güncel olarak, immünoterapötik yöntemler kullanılmakta ve reseptör tirozin kinaz inhibitörleri, histon deasetilazlar, PARP inhibitörleri, androjen reseptör inhibitörleri, farnezil transferaz inhibitörleri, SRC inhibitörleri, PI3K/Akt/mTOR, JAK/STAT ve CDK4/6 inhibitörleri gibi sinyal yollarını hedef alarak geliştirilmektedir. Bu yaklaşımın temeli sinyal kaskadlarının inhibisyonu ile direk olarak tümör ve tümör mikroçevresinin değişimi ve proteinlerin ekspresyon seviyelerinin değiştirilmesi hedeflenmektedir (Schröder vd., 2021; Sheikh-Hosseini vd., 2021; Godone vd., 2018). Geleneksel olarak kullanılan kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemlerinin yan etkileri birçok eksojen ve endojen faktörü uyurabildiğinden tekrar meme kanseri riskini artırabilmektedir. Bu durum, meme kanseri hastalarının tedavi edilmesini daha zor hale getirmekte ve meme kanserine dayalı ölümler giderek artmaktadır. Bu nedenlerle, birçok araştırma, meme kanserinin yan etkisi az ve daha etkili bir tedavi yöntemine odaklanarak yeni ilaç tasarımları geliştirmektedir (Ko ve Moon, 2015; Mitra ve Dash, 2018; Zakaria vd., 2018). Meme kanserli hastaların yönetiminde hormonal ve hedefe yönelik tedaviye karşı koyan faktörleri ortadan kaldıracak etkili ve daha az toksik tedavi stratejilerinin belirlenmesi önemlidir.

Meme kanserinin etiyolojisi ve kanserli hücrelerin çoğalması genellikle bir dizi mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalardan herhangi biri doğal kaynaklardan

türetilen bir bileşik ile hedeflenebilir ve tedavi yaklaşımı olarak ortaya konulabilir (Bonofiglio vd., 2016). Meme kanserinin genomik yapısının kapsamlı bir portresi, çok sayıda yüksek verimli profil oluşturma çabalarının bir sonucu olarak artık mevcut hale gelmiştir. Bu genomik veriler, meme kanserinin etiyolojisi hakkında yeni bilgiler sağlar. Meme kanseri geleneksel olarak östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve onkogen ERBB2'nin (HER2) reseptör durumuna göre ER+, HER2+ (ER-/PR-/HER2+) ve negatif (TN) (ER-/PR-/HER2-) üçlü olarak adlandırılan üç alt tipte sınıflandırılır. Bu reseptör alt tipleri, 50 gen ekspresyon sınıflandırıcısına (PAM50) dayalı olarak beş intrinsik meme kanseri alt tipine daha da indirgenmiştir. Bu farklı moleküler alt tipler, hastalık progresyonu, metastatik yayılma paternleri, klinik prognoz ve tedaviye yanıt bakımından farklılık gösterir. Bu nedenle, meme kanseri için hasta sınıflandırması, tedavi planlaması ve klinik yönetimi üzerinde önemli etkileri vardır (Riaz vd., 2022; Jin ve Mu, 2015).

Yaş, tümörün derecesi, progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ve tümör hücreleri tarafından östrojen reseptörünün (ER) ekspresyonu ve meme kanseri tedavisi gibi birçok faktörün prognozda dikkate alınması gerektiği bildirilmiştir. Örneğin; önceki çalışmalara göre meme kanseri, lüminal A (ER+ ve/veya PR+, HER-2 negatif) (%26,55), HER-2 negatif lümen B (ER+ ve/veya PR+, HER-2 negatif) (%31,38), HER-2 pozitif (ER+ ve/veya PR+, HER-2+) (%24,14), HER-2 zenginleştirilmiş (ER-, PR-, HER-2+) ile luminal B (%8,62) ve bazal benzeri veya üçlü negatif (ER-, PR-, HER-2 negatif, CK5/6+ ve/veya EGFR+) (%9,31). Bununla birlikte, bu yüzdeler hastanın durumuna ve farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Riaz vd., 2022; Jin ve Mu, 2015).

Meme kanseri için terapötik yöntemler gelişmekle birlikte, meme kanseri kök hücreleri (MKKH) olarak adlandırılan kalıcı tümör hücreleri alt kümesi nedeniyle hastalık nüksü ve metastazı büyük bir terapötik endişe oluşturmaktadır. MKKH'lerin meme tümörleri içinde ikincil organlara tümör metastazını destekleyen benzersiz tümörjenik özelliklere sahip hücre alt kümeleridir. MKKH, CD24, CD44, CD133, CD29, CD61 ve ALDH1 gibi spesifik hücre yüzeyi belirteçleri kullanılarak tümörler içindeki heterojen popülasyonlardan izole edilmiştir. MKKH'ler apoptozdan kaçabildikleri için radyasyon ve kemoterapi gibi geleneksel tedaviler MKKH'lere karşı etkisizdir. Zhang vd. ayrıca MKKH'lerin metastaz geçirmiş karaciğerde de bulunabileceğini ve MKKH hücrelerinin

kanser hücresi metastazını başlatmak ve teşvik etmek için kendi kendini yenileme özelliklerini kullandığını göstermiştir. Bir diğer araştırmada, TGF β 1'i bir fare meme kanseri modeline enjekte edilmiş ve CD44'ü MKKH'leri artırmaya teşvik ederek meme kanserinin karaciğer metastazı eğilimini arttırdığı ortaya konulmuştur (Riaz vd., 2022; Liu vd., 2022; Zhang vd., 2018).

MKKH şu anda meme kanseri tedavisi için büyük bir engel olarak kabul edilmektedir (Wang vd, 2013). MKKH sadece tümör başlangıcını ve büyümesini sağlamakla kalmıyor, aynı zamanda tümör metastazına ve terapötik direnç aracılık etmektedir. MKKH'ler ya normal meme kök hücrelerinden ya da epitelyal-mezenkimal geçiş yoluyla meme epitel hücrelerinden kaynaklanır. Al-Hajj vd., 2003 yılında insan meme kanserinden izole edilmiş KKH'ler bulmuşlardır ve bunlarda ilk olarak katı tümörler arasında EpCAM+, CD44+ ve CD24- hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyonunun ve sinyal yollarının (örneğin; Notch ve Kirpi) aktivasyonuna dikkat çekmişlerdir (Al-Hajj vd, 2003; Bose ve Shenoy, 2014; Ricardo vd, 2011). CD44, birçok kanserde yüksek oranda eksprese olan ve CD44'ün hücre yüzeyine alınması yoluyla metastazı düzenleyen bir hücre yüzeyi yapışma reseptörüdür (Senbanjo ve Chellaiah, 2017). Ayrıca CD44, meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli tiplerdeki kök hücreler için bir işaretleyici olarak tanımlanmıştır (Senbanjo ve Chellaiah, 2017; Hermawan ve Putri, 2018).

MKKH'ların kökenlerine ilişkin öne çıkan iki fikir, Mintz vd.nin yaptığı teratokarsinom çalışmalarından alınmıştır (Hartwig vd., 2014; Wang vd., 2013). 2003 yılında iki yüzey glikoproteininin ekspresyonuna dayalı olarak MKKH'ların tanımlanmasından bu yana, CD44+/CD24- fenotipi güvenilir bir izolasyon kriteri haline gelmiştir (Al-Hajj vd., 2003; Ponti vd., 2005; Wright vd., 2008; Perrone vd., 2012; Wang vd., 2012). Artan CD44 seviyeleri ve düşük CD24 ekspresyonu, proliferasyon, adezyon, migrasyon ve invazyon kapasitesinin artmasına katkıda bulunmaktadır (Herrera-Gayol vd., 1999; Gotte vd., 2006; Schabath vd., 2006). Meme kanseri metastazı için yaygın yerlerden bazıları, tümü CD44, hyaluronan ve osteopontin için spesifik ligandlar içeren kemik, akciğer, karaciğer ve beyindir (Ruan vd., 2022). Diğer *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, ilave MKKH belirteçleri olarak ALDH1, CD133, CD49 ve CD61'i da aydınlatmıştır. Embriyogenez, Notch, Hedgehog ve Wnt ile ilgili yollar da MKKH'lerin yayılmasına ve tedaviye dirençlerinin kalıtsal olmasına katkıda bulunmakla ilişkilendirilmiştir.

MKKH'lerin mevcut en iyi terapilerden kaçma yetenekleri, ayrıca epitelyal-mezenkimal geçişe (EMT) ve ters mezenkimal-epitelyal geçişe (MET) girme yetenekleriyle ilişkilidir. Çünkü tedaviden sonra devam eden hücreler sıklıkla hem epitelyal hem de mezenkimal belirteçler sergiler. Sırasıyla MKKH'ler sitokeratin ve vimentinin ekspresyon profillerine benzemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, MKKH'lerin tümör nişi bağlamında araştırılmasının önemini vurgulamıştır. Paklitaksele yanıt olarak artan TGF β ve IL-8 ekspresyonu, üçlü negatif tümörlerde kanser kök hücrelerinin genişlemesine katkıda bulunur. Diğer taraftan, IL-8 reseptörü CXCR1'in bir antikor ile terapötik hedeflenmesi gösterilmiştir. Ayrıca, IL-8 reseptörü CXCR1'in bir antikorla terapötik hedeflenmesinin, birkaç klinik öncesi modelde tümör başlangıcını azalttığı gösterilmiştir (Liu vd., 2022; Maccalli, 2019; Pappaccio ve Desiderio, 2018).

Son yıllarda, MKKH'leri hedefleyen ilaçların taranması için in vitro ve in vivo model kullanılmaktadır. 2D in vitro hücre kültürü modelinin kullanımı, yapay büyüme ortamından dolayı kanser hücrelerinin karmaşık mikro-ortamının olmaması dezavantajına sahiptir. Öte yandan, bir hayvan modelinin kullanılması, nispeten yüksek başarısızlık oranının yanı sıra maliyet ve zaman sorununu da kısıtlamıştır (Aggarwal vd., 2009; Wickenwerder vd., 2003). Bu nedenle, 3B hücre kültürleri, ilaç keşfinde hayvan modellerinin yanı sıra 2B in vitro zayıflıklarının üstesinden gelmek için faydalı olabilmekte ve meme kanseri tedavisine yönelik inovatif bu teknolojiler son dönemlerde kullanılmaktadır. Ek olarak, birkaç çalışma mamosferde artan KKH belirtecini göstermiştir ve bu nedenle araştırmacılar bu modeli MKKH araştırmaları için, yani moleküler mekanizmayı keşfetmenin yanı sıra MKKH'leri hedef alan ilacın taranması için kullanma eğilimindedir (Oliveira vd., 2010; Hermawan ve Putri, 2018).

2.2.Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri dünya çapında en sık teşhisi konulan ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenini oluşturan en yaygın kanser türüdür. Klinikopatolojik özelliklere sahip heterojen bir hastalık olarak bilinmektedir (Thai vd., 2021). Amerikan kanser derneğinin 2022 verilerine göre yaklaşık olarak 236.740 akciğer kanseri vakası teşhis edilmiş olup yaklaşık 130.180 hasta hayatını kaybetmiştir. Türkiye'de Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü aracılığı ile açıklanan 2017 yılındaki verilere göre erkeklerde her 100.000 kişiden 56,7'si

akciğer kanseridir. 2020 yılı GLOBOCAN Batı Asya, Orta ve Doğu Avrupa ve ABD’de en son kanser verileriyle karşılaştırıldığında Türkiye kanser insidansı dünya insidansının üzerinde seyretmektedir. Akciğer kanserinin evreleri göz önüne alındığında %56,5 oranında uzak metastaz yaptığı kaydedilmiştir. Türkiye’nin akciğer kanser haritasındaki verilere göre ise erkeklerde 100 binde 75, kadınlarda ise 100 binde 10 olarak akciğer kanseri kaydedilmiştir (GLOBOCAN, 2020; Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017).

Akciğer kanserinde başlıca risk faktörleri sigara, alkol, pasif içicilik, hava kirliliği, arsenik ve krom gibi çeşitli metaller, asbest, radyasyon, bazı organik kimyasallar, mesleki maruziyet ve akciğer kanserine duyarlılık genleridir. Sigara akciğer kanserinin başlıca en önemli nedenini oluşturmaktadır. (Cao vd., 2019). Histolojik görünümüne ve klinik davranışlarına göre iki ana türü mevcuttur; küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK). En yaygın görülen ana tür KHDAK olarak tespit edilmiştir.

Akciğer kanserlerinden küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (KHDAK) tümorogenezin altında yatan moleküler yolaklar birçok hasta için hastalığın yönetiminde değişikliklere yol açmıştır (Myall vd., 2018). Moleküler açıdan değerlendirildiğinde, Wnt, Notch, Hedgehog ve PI3K/AKT gibi normal kök hücrelerde bulunan moleküler yolakların kök hücre özelliklerini KHDAK’da da düzenlediği gösterilmiştir. Örneğin; Wnt sinyal yolağının akciğer kanser kök hücrelerini düzenlediği açık şekilde ortaya konulmuştur. Wnt sinyal yolağı kök hücre transkripsiyon faktörü olan Oct4’nin ifadesini kontrol ederek bu işlevini yerine getirmektedir. Notch sinyal yolağında ise CD133+’ün akciğer kanser kök hücrelerinin proliferasyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. CD133+’ün akciğer kanseri hücrelerinde Notch inhibisyonuna, büyümenin durmasına ve kemoterapiye hassas yanıt verilmesine neden olduğu belirtilmiştir (Chanvorachote vd., 2016).

Akciğer kanserinin halk sağlığı üzerindeki temel zorluğu, çoğu hastada (>%75) tanısında evre III veya IV hastalığa sahip olduğundan, ileri evre nedeniyle kötü prognozudur. Akciğer kanserinin evrenmesi yaygın olarak primer tümörün büyüklüğü, lokal lenf bezi tutulumu ve metastaz varlığı göz önüne alınarak gerçekleştirilmektedir. Skuamöz ve adenokarsinom KHDAK da uygulanacak tedavi ve prognoz açısından, evre IA ve B, IIA ve B, IIIA ve B ile IV olarak sınıflandırılmaktadır. Akciğer kanserli hastaların prognozu,

hastalığın evresi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Örneğin, klinik evre IA hastalarında 5 yıllık sağkalım oranı ortalama %60 iken, klinik evre II-IV hastalığında 5 yıllık sağkalım yaklaşık %40 ila %5'in altında görülmektedir. Erken evrelerde cerrahi müdahaleler yapılabilmesine karşın ileri evredeki hastalar için cerrahi tedavi uygulanamamakta ve ortalama 5 yıl sağ kalımı artırmak için kemoterapötik ilaçlar tercih edilmektedir. İlerlemiş akciğer kanseri tedavisi, kemoterapiye ve histolojiye dayanıyordu. Son on yılda, prediktif biyobelirteçlerin keşfi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi ile biyoteknolojik yeni farmasötik ürünlerle yeni terapötik fırsatlar yaramaktadır (Thai vd., 2021; Nooreldeen ve Bach, 2021).

Akciğer kanserli vakaların %80-85'inin KHDAK ait olduğu tahmin edilmektedir (<https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer>). KHDAK birkaç tür ile tanımlanmaktadır ve her türü farklı hücre tiplerine sahiptir. Büyük hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom veya epidermoid karsinom, adenokarsinom, adenoskuamöz karsinom, sarkomatoid karsinom, tükürük bezi karsinomu, pleomorfik ya da sarkomatoid, karsinoid tümör, mukoepidermoid karsinom ve sınıflandırılmamış karsinom gibi türleri sayılabilir. Skuamöz karsinomları akciğerlerin içini kaplayan ince düz hücrelerden oluşan akciğer kanser tipidir. Adenokarsinomlar alveolleri kaplamakta ve mukus gibi maddelere hücrelerde başlamaktadır. Diğer alt türler daha nadir olarak görülmektedir. Erken tanı, hastaların hayatta kalma oranlarını iyileştirmeleri için çok önemlidir (Ahmed vd., 2018). Ancak, erken evrelerde semptomlar görülememekte, diğer organlara metastaz yapmaya başladığı zaman semptomlar ortaya çıkmaktadır.

Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve nöroendokrin karsinom olarak ayrılır. Katı tümörleri kapsayan heterojen hücre tipi popülasyonu içinde, tipik kemoterapilere direnebilen ve orijinal tümörü yeniden yerleştirebilen nadir bir KKH (kanser kök hücre) popülasyonu vardır. Akciğer KKH'ların biyolojik ve fonksiyonel belirteçlerini araştıran çok sayıda çalışma, çok çeşitli hücresel işlevlere sahip bir dizi belirteç tanımlamıştır. Akciğer KKH'ları ve KKH olmayanlar arasındaki fonksiyonel farklılıkları karşılaştırarak, iki ilgi çekici popülasyon tanımlanmıştır. Ho ve diğerleri (2007), akış sitometrisini kullanarak, yan popülasyon (SP) olarak adlandırılan Hoescht 33342 boyasını aktif olarak dışlayabilen küçük bir hücre popülasyonu izole etmişlerdir. Bu hücreler gelişmiş bir invazyon, kemo-direnç ve tümörjenik özellikler sergilemiştir. Daha fazla karakterizasyon, yüksek ABCG2 ekspresyonunun SP hücreleri ile ilişkisini ortaya çıkarmıştır ve o zamandan beri akciğer

KKH'larının fenotipik bir belirteci olarak kullanılmıştır (Ho vd.,2007; Salcido vd., 2010). Başka bir çalışmada, kemo-dirençli akciğer KKH'ları doksorubisin, cisplatin ve etoposid ile tedavi edildiklerinde, kemoterapötik basınca direnmek için doğal özelliklerine göre tanımlanmıştır. Hayatta kalan az sayıda hücrenin, embriyonik kök hücre belirteçlerinin ekspresyonu, kendini yenileme ve artan tümörijenik potansiyel dahil olmak üzere temel KKH özelliklerini gösterdiği bulunmuştur (Levian vd., 2008). Diğer katı tümörlere benzer şekilde, ALDH1, CD44, CD133, CD166 ve CD90 dahil olmak üzere akciğer KKH'larını tanımlamak için çeşitli belirteçler kullanılmıştır. İnsan akciğer kanseri hatlarında artan ALDH1 aktivitesi, çoğalma, kendini yenileme ve kemoterapi direnci ile ilişkilidir (Jiand vd., 2009). Leung vd. (2010), küçük hücreli olmayan akciğer kanser hattındaki CD44+ popülasyonlarının, küre oluşumu ve gelişmiş tümör başlatma potansiyeli dahil olmak üzere artan kök özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir. Hem hastadan türetilen hem de ticari hücre dizilerini kullanan Chen vd. (2008), CD133+ hücrelerinin, CD133- popülasyonları ile karşılaştırıldığında daha yüksek Oct4 ekspresyonu, gelişmiş istila ve kendini yenileme, tedaviye direnç ve artan KKH yetenekleri gibi kök benzeri özellikler sergilediğini bulmuştur. Eramo vd. (2008), akciğer kanseri hasta örneklerinden izole edilen CD133+ hücrelerinin, serumsuz koşullarda sferoid büyümeyi ve *in vivo* büyümeyi sürdürdüğünü, bu özelliklerin hücreler CD133- hücrelerine farklılaştığında kaybolduğunu ortaya koymuştur. Benzer sonuçları Bertolini vd. (2009), CD133+ hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak cisplatin tedavisinden sağ çıkabildiğini bildirmiştir. Bunun aksine, diğer çalışmalar CD133'ün evrensel bir belirteç olmadığını göstermiştir. Alternatif olarak aktive lökosit yapışma molekülü (ALCAM) olarak bilinen CD166, kolorektalden prostata ve glioblastomaya kadar birçok kanserde bilinen bir KKH belirteci olmuştur (Levina vd., 2008; Jiao vd., 2012; Kijima vd., 2012). NSCLC için, CD166'nın hasta tümör dokularının küçük bir alt kümesinde yüksek oranda eksprese edildiği ve *in vivo* CD166+ hücrelerinin kendi kendini yenileme ve tümör başlangıcı sergilediği gösterilmiştir (Zhang vd., 2012). Birkaç hastadan türetilmiş akciğer kanseri hücre hattında CD44 ve CD90 ve akciğer KKH'larının belirteçlerinin kullanımını tarayarak, Wang vd. küre oluşumu, mezenkimal belirteçlerin ekspresyonunun artmasının yanı sıra embriyonik kök genleri Oct4 ve Nanog ve ısınlamaya karşı direnç sergileyen her iki belirtecin yüksek oranda birlikte ekspresyonuna sahip nadir bir popülasyon tanımlamışlardır (Wang vd., 2013 Maccalli, 2019; Pappaccio ve Desiderio, 2018).

2.3.Kanser Kök Hücreleri

Tümör heterojenitesinin varlığı ilk olarak on dokuzuncu yüzyılda birkaç patolog tarafından gözlemlenmiştir. Histolojik heterojenlik, belirteç ekspresyonu, genetik manzaralar, kanser ilerlemesi ve tedaviye yanıtın çeşitliliği ile ilişkilendirilmiştir. Daha yakın zamanlarda, klonal çalışmalar, bir neoplazmin, birlikte tümör büyümesinin sürdürülmesine katkıda bulunan tek tek hücrelerin bir araya gelmesinden oluştuğunu göstermiştir. Bu çeşitlilik sayesinde kanser hücreleri hayatta kalma ve değişen ortamlara uyum sağlama yeteneği kazanmaktadır. Kanser heterojenliğini açıklamak için iki ana model teorize edilmiştir: Klonal evrim modeli ve kanser kök hücre (KKH) modeli. Klonal evrim modeli, Darwinci teoriler temelinde öne sürülmüştür. Aslında, bir tümörün genetik ve epigenetik değişiklikler açısından birbirinden farklı olan çok sayıda bireysel hücreden oluştuğunu iddia etmektedir. Stephen Paget, belirli kanser hücrelerinin, ikincil bir tümörün büyümesi için uygun bir ortamla karakterize edilen uzak organlarda kök salmak için içsel bir yeteneğe sahip olduğunu iddia etmiştir. Geçtiğimiz yıllarda, normal ve malign kök hücrelerin varlığına odaklanan birçok çalışma yapılmıştır. 1961'de Till ve McCulloch hematopoietik kök hücreleri (HKK'ler) tanımlayan ilk kişilerdir. KKH konsepti, tümörlerin, genellikle normal orijinli dokuya benzeyen hiyerarşik bir organizasyon ile karakterize edildiğini ve hiyerarşinin tepesinde küçük bir KKH alt popülasyonu olduğunu varsaymaktadır. KKH'lerin hareketsiz olduğunu ve simetrik bölünme yoluyla KKH havuzunu koruyabildiğini veya asimetric bölünme yoluyla bir KKH ve geçici bir amplifiye edici (TA) hücre üretebildiğini varsaymaktadır. TA hücreleri, hızlı büyüme oranı ile karakterize edilmekte ve sonunda farklılaşmaya uğradıkları için uzun vadeli büyümeyi sürdüremeseler de tümör kütesinin çoğunluğunu oluşturmaktadır. Tersine, KKH'ler, immün sistemi baskılanmış farelerde ksenograft üretebilen ve kemo ve radyoterapiye direnç için tek bölmeyi temsil ettikleri için tümör başlangıcından sorumludur (Fidler vd., 2003; Vlashi vd., 2015; Maccalli, 2019; Pappaccio ve Desiderio, 2018).

Kanser kök hücreleri (KKH), kendini yenileme, farklılaşma, tümör oluşumu ve özel yüzey belirteçleri (CD24, CD44, CD133, CD117, ALDH vs.) gibi özelliklerle bilinen tümör hücrelerinin bir alt popülasyonu olarak tanımlanmaktadır. Yeni kanser terapileri için spesifik hedefler olan KKH'leri, böyle özgün karakterlere sahip olmalarından dolayı, kanserin

başlamasından, ilerlemesinden, metastazından, nüksetmesinden ve ilaç direncinden sorumludur (Ghasemi vd., 2019; Walcher vd., 2020; Trosko, 2021).

KKH alt popülasyonunun izolasyonu üzerine ilk çalışmalar, normal kan kök hücrelerinin izolasyonu için hücre yüzeyi proteinlerini kullanan Weissman ve meslektaşları tarafından geliştirilen yöntemlerden ilham alınmıştır. Dick, Lapidot ve Bonnet ilk kez insan AML'sinde bir hiyerarşinin varlığını göstermiştir. Bir alıcı farede maligniteyi yayabilen hücrelerin, yetişkin HSC'lerin (CD34+/CD38-) aynı yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile karakterize edildiğini, diğerlerinin ise farklı farklılaşma seviyelerinde olgun kan hücreleri olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda, bu karakterizasyon, AML KKH popülasyonunu CD34+/CD38-/CD90-/IL-3R+/CD71-/HLA-DR-/CD117- olarak güncelleyerek Blair ve diğerleri tarafından uygulanmıştır. Geçtiğimiz yıllarda, katı tümörlerde KKH'lerin tanımlanmasına birkaç grup katkıda bulunmuştur. İlk belirteç, nörosferlerde eksprese edilen bir transmembran glikoproteini olan CD133'tür (prominin-1). İlginç bir şekilde, CD133+ popülasyonunun hem CD133+ hem de CD133- hücrelerini içeren bir tümörden kaynaklandığı gösterilmiştir, bu da bu popülasyonun kendini ve farklılaşmış bir soy üretebildiğini düşündürmektedir. CD133'ün KKH belirteci olarak kullanımı, rolü tam olarak açıklığa kavuşturulmadığı ve biyoenerjetik stres ile bağlantılı olduğu için yoğun bir şekilde tartışılmıştır. Ayrıca, CD133 sıklıkla normal dokunun endotelial progenitörleri tarafından eksprese edilmektedir. Buna rağmen, bu protein artık hepatoselüler karsinom, prostat kanseri, melanom ve kolorektal kanser gibi çeşitli kanserlerde KKH'lerin tanımlanması için yaygın olarak kabul edilmektedir. Genel olarak, çoğu KKH, menşei doku ile ilgili olarak farklı belirteçlerin ifadesi ile tanımlanmaktadır. Örneğin, KKH tanımlaması için faydalı bir yüzey proteini, çeşitli tümörijenik hücrelerde eksprese edilen hyaluronik asit reseptörü ve bunun yanı sıra bunun ekleme varyantları (CD44v) olan CD44'tür. Ayrıca, KKH'leri tanımak için kullanılan başka bir araç, *in vivo* olarak tümör büyümesini sürdürebilen hücrelerde yükseldiği bildirilen aldehit dehidrojenazın (ALDH) aktivitesidir (Blair vd., 1999; Blair vd., 2000; Jordan vd., 2000; Singh vd., 2004; Maccalli, 2019; Pappaccio ve Desiderio, 2018; Pathak ve Banerjee, 2020).

Tümörlerde kanser kök hücrelerin var olduğu ilk kez 1983 yılında Mackillop tarafından öne sürülmüş ve 1997 yılında başka bir ekip tarafından ilk defa akut myeloid lösemi tümöründen izole edilmiştir, ancak 2014 yılına kadar *in vitro* ortamda kültüre edilememiştir.

Buna göre tümör içerisinde sadece küçük bir hücre grubu tümör oluşturma yetisine sahiptir. Kanser kök hücreler (KKH) temel olarak kendini yenileme, pluri ya da multipotensi ve radyasyon, kimyasal ajan ve apoptoza karşı direnç özelliklerine sahiptir. KKH'nin bu özellikleri in vivo hayvan modellerinde doğrulanmıştır. Bir tümör, ilgili farklılaşma evrelerine göre farklılaşan heterojen bir hücre popülasyonundan oluşmaktadır. Tümör kütesinin dış kısmı, radyasyona ve kemoterapiye duyarlı farklılaşmış hücreler içerir; bunun nedeni, tümör oluşturmaya yakın olması ve aynı zamanda, indüklenen anjiyogenez veya kan damarı büyümesi nedeniyle yeterli kan akışının olmasıdır. Tümörün merkezine daha yakın bölgesi, mitotik evrelerden geçip yavru hücreleri oluşturabilme kapasitesine sahip öncü hücreleri içermektedir. Yavru hücreler, daha sonra kendi mikroçevrelerine göre belirli hücre tiplerine ayrılabilir (Yu, Pestell vd. 2012). Tümörün kalbinde ise hem yapısal hem de işlevsel olarak bir tümör kitlesi içindeki diğer hücrelerden farklı olan KKH'ler yer almaktadır. KKH'ler, yavru hücrelerinden birinin veya her ikisinin kimliğini korumaktadır. Bu hücreler, kendiliğinden yenilenme kabiliyetine sahiptir. Bunlar bir seri mitozdan geçip farklılaşan öncü hücre olabilmektedirler. İn vitro olarak KKH'lerinin üç karakteristik özelliği vardır: 1) Hücre yüzey belirteç profilleri kullanılarak izole edebilirler, 2) süspansiyon kültürlerinde küresel koloniler olarak görülen tümörküreler/sferoidler oluştururlar, 3) kemoterapötik ajanlara ve iyonize radyasyona direnci artırır. KKH'leri üzerine araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. KKH hipotezi; kanser tümörün başlaması, kendi özelliklerini devam ettirme ve kendini yenileme özelliklerine sahip kanser hücrelerinden oluştuğunu desteklemektedir. Böylece KKH hipotezine göre, bu KKHleri kendilerini yenileyebildiğinden, tümör başlatıcı özelliklerini devam ettirebilmektedirler. Kök hücre karakterinde olan bu hücreler; tümörün başlaması ve devamını sağladıkları gibi sessiz olmaları, etkin DNA onarımı yapabilmeleri, yüksek oranda çoklu ilaç direnç/MDR transporterlarına sahip olmaları ve hipoksik mikroçevre ortamında korunuyor olmaları nedeniyle kemoterapi ve radyoterapiye de dirençlidirler. Bu durum, günümüzde kanser tedavilerinin neden tümörü tamamen yok edemediğini açıklamaktadır. Bu sessiz ama dirençli hücrelerin ultrastrüktürel ve moleküler yapılarının tamamen ortaya konması; KKH-hedefli yeni terapötik ajanların geliştirilmesini sağlayacaktır. Bu sayede kanser patogenezindeki mekanizmaların anlaşılması; hastaların yaşam sürelerinin artışı ve etkin tedavilerin geliştirilmesini mümkün kılacaktır. KKH çalışmalarında en önemli hedeflerden biri, KKHlerini doğru bir şekilde karakterize edebilmektir. Yapılan literatür taramalarında akciğer KKH belirteçlerinin çoğunlukla CD90, CD117, CD133, CD166,

ALDH, CD326, BMI-1 olduğu gözlenmiştir. Kendilerine has özelliklerinden dolayı tedavide KKH'leri hedeflemek oldukça zordur. KKH'ler, anti-kanser terapötiklerine karşı direnci ve repopülasyon yeteneği ile karakterizedir. Kemoterapi ve radyasyon tedavisi ile tümör küçülmesi sonrasında tümörojenik hücreleri rejenere edebilme yeteneğine sahiptirler. KKH'lerin çoklu ilaca direnç özelliği, transmembran pompa proteinlerini kodlayan genlerin aşırı ekspresyonuyla ilişkilidir. Proteinler, hücredeki reaktif oksijen türleri ile düzenlenebilmekte, doku tipi ve doku içindeki hücrelere göre değişebilmektedir. Böylelikle KKH'leri hedefleyen terapötikler büyük özgüllük gerektirmektedir (Yu, vd. 2012; Zimmerman ve Wu 2011, Garofalo ve Croce 2015).

Hücre sessizliği, G0 fazı ile temsil edilen, döngüsel olmayan bir durumdaki kalıcılık olarak tanımlanır ve tersinir olarak tanımlanır, çünkü hücreler dış uyaranlara yanıt olarak hücre döngüsüne yeniden girebilmektedir. Hem yayılmış hem de tümör içi KKH'lerin bir özelliği olan sessizlik, birincil ve ikincil malignitelerin uyku halinden ve ayrıca yalnızca aktif olarak çoğalan hücreleri hedef alan standart kemoterapiye dirençten sorumludur. KKH'lerin sessizliği birkaç faktör tarafından desteklenebilmektedir. İlgili ana proteinler, sikline bağımlı protein kinaz inhibitörleri p21 ve p27, tümör baskılayıcılar p53 ve Rb'nin yanı sıra çok sayıda mikro-RNA'dır. Hücre sessizliğine katkıda bulunan diğer efektörler, Notch ile ilgili yolların ve Forkhead Box O (FoxO) transkripsiyon faktörünün bileşenleridir. İkincisi, PI3K-AKT yolunu ve reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini düzenlemedeki rolü sayesinde çevresel strese uyum ile de ilişkilidir. KKH'lerin temel özelliklerinden biri olan kendi kendini yenilemenin başlıca kanıtı, bağımsızlığı baskılanmış farelerde KKH'lerin seri transplantasyonlarının aşılınmasıdır. Kendi kendini yenileme kabiliyetine dahil olan merkezi yollardan biri, HSC'lerin bölünmesinde yer alan polcomb kompleks protein B lenfoma Mo-MLV yerleştirme bölgesi 1 homologudur (BMI-1). BMI-1'in lösemi veya mantle hücreli lenfomalar gibi çeşitli malignite türlerinde ve ayrıca gliomalarda ve yumurtalık kanserinde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (Till, 1961; Cheung vd., 2013; Chen vd., 2016; Maccalli, 2019; Pappaccio ve Desiderio, 2018; Pathak ve Banerjee, 2020).

KKH'lerinin oluşumu ile ilgili iki hipotez bilinmektedir: 1- Genetik ve epigenetik dengesizlikten ötürü normal kök hücreler veya progenitör hücreler çeşitli gen mutasyonlarına uğramakta ve KKH'lerine dönüşmektedir ve 2- Onkojen kaynaklı plastisite nedeniyle tümör hücreleri kök hücreye dönüşmektedir. KKH'ler, endotel hücrelerine

farklılaşarak anjiyogenezi teşvik etmekte ve ayrıca proanjiyogenik ve anjiyogenik faktörleri salgılamaktadır. Böylelikle oluşan sinyal yollarındaki dengesizlikler ve düzensizlikler malign transformasyona neden olabilmektedir. Bu nedenlerle, KKH'lerini ortadan kaldırmak için belirli bileşenlerle özel sinyal kaskatlarını hedeflemek (Notch, Hedgehog, Wnt/ β -catenin, PI3K/Akt, NF-kB, BMP ve TGF- β) popüler stratejilerden birisidir. Meme kanser kök hücreleri (MKKH) çoklu ilaç direnç genlerinin ifadesi ve ilaç akışı taşıyıcıları nedeniyle çeşitli geleneksel kemoterapötik ilaçlara karşı direnç sağlamaktadır. Aslında, geleneksel tedavilerin, agresifliğin artmasıyla birlikte kanser nüksüne yol açan tümörlerdeki kanser kök hücre popülasyonunun yüzdesini arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca genel kapsamda, konvansiyonel kemoterapi, radyasyon tedavisi ve moleküler hedefli tedaviler dahil olmak üzere standart anti-tümör tedavileri, KKH'lere karşı etkili olmadığı ve hatta sıklıkla KKH'lerin zenginleşmesine yol açarak tümörün nüksetmesine neden olabildiği ortaya konulmuştur. Bu nedenlerle, KKH'leri hedeflemenin kanser tedavilerinin etkinliğini arttırmanın anahtarı olduğu varsayılmaktadır (Nalla vd., 2019; Ghasemi vd., 2019; Butti vd., 2019; Bai vd., 2018; Liu ve Ho, 2018; Cao vd., 2021; Walcher vd., 2020; Trosko, 2021; Zhang vd., 2022). KKH'lerin bu tedavilere karşı dirençli olmalarının sebebi DNA hasarına yanıtı, çoğalma sürecinde sessiz olma, ABC taşıyıcılarının varlığına bağlı çoklu ilaç direnci ve çok sayıda farklı hücre içi sinyal yollarıyla ilişkilendirilmektedir (Can, 2014). Bu nedenlerle, MKKH ve AKKH'lerin yol açtığı ilaç direnci nedeniyle Notch, Hippo, Wnt, Hedgehog ve tümör stroma değişimleri dahil olmak üzere birçok sinyal yolu hedeflenerek tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Doğal aktif bileşenlerin (resveratrol, epigloalkateşin, kurkumin, kuersetin, ellagik asit, antosiyaninler vb.) ve bitki ekstraktlarının, kanser kök hücrelerinin patolojik aktivitelerini azaltarak bu moleküler yollar üzerinde doğrudan veya dolaylı bir etkiye sahip olduğu birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (Lawson vd., 2009; Hermawan ve Putri, 2018; Cianciosi vd., 2018'de derlenmiştir). Bunun yanı sıra, doğal aktif bileşenler kullanılarak, çoklu ilaç direncinin tersine çevrilmesi geleneksel kemoterapötiklerin duyarlılığının artırılması da umut vaat etmektedir (Nalla vd., 2019). Örneğin, MKKH üzerinde kurkuminin intervensiyonel etkileri araştırılmış ve mitomisin C ile birlikte uygulandığında kemo-duyarlı bir adjuvan olarak davrandığı ortaya konulmuştur (Li vd., 2018). Benzer bir çalışmaya göre, paklitaksel ile birlikte kestane ekstraktının, kemoterapiye duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Woo vd., 2017).

2.4.Çalışmada Kullanılan Test Maddeleri

Bornil asetat (BA) bisiklik bir monoterpendir. *Pinus densiflora*, *Rosmarinus officinalis*, *Valeriana officinalis* ve konifer yağları gibi bitkilerden elde edilen uçucu yağların ana bileşenlerinden birisidir. Ülkemizde de endemik türleri olan *Inula* sp. bitkisinin aktif bileşenlerinden biridir. Cilt kremlerinin kimyasal ve aktif bileşiminde, yara bakımında ve doğal antiseptik ajan olarak kullanılmaktadır (Yang vd., 2018). Antioksidan ve anti-inflamatuar aktivitesi çeşitli hücre ve doku formlarında gösterilmiştir. Yakın zamanda hipotensif etkisi in vivo bir çalışma ile gösterilmiştir. Bornil asetat özellikle LPS uyarılmış inflamasyon üretimini düşürdüğü bulgulanmıştır. Ayrıca, akciğer inflatuvar hastalıkları için koruyucu etkiye sahip bir ajandır. Son yıllarda, endotele ox-LDL uyarılmış lökosit adezyonuna karşı etkili olduğu ve ateroskleroz hastalıklarında kullanılabileceği bulgulanmıştır. Aynı çalışmada BA'nın hücre adezyonunu, lökosit ve makrofaj adezyonunu gen ekspresyonu seviyesinde inhibe ettiği HUVEC hücrelerinde gösterilmiştir. Sitotoksik etkisi son dönemde yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiştir. BA'nın HeLa, HT29, A549, MCF-7 ve FL (insan amniyon hücreleri) hücre hatlarında sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösteren tek bir çalışma bulunmaktadır (Karan vd., 2018). Yakın zamanda yapılmış bu çalışmada, LDH ve BrdU analizi yapılmış ve hücre morfolojisindeki değişiklikler ters faz mikroskopla fotoğraflanarak gösterilmiştir. Elde ettiğimiz bazı bulgulara paralel sonuçlar bu çalışma ile de ortaya konulmuştur.

6-gingerol, zencefil olarak da bilinen *Zingiber officinale* türünün ana bileşenlerinden birisidir ve farklı kanser tiplerinde sitotoksik ve apoptotik aktiviteyle birlikte antikanser etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Poltronieri vd., 2014). Bu çalışma kapsamında da benzer sonuçlar elde edilerek 6G'nin sitotoksik ve apoptotik etkisi ortaya konulmuştur. Ayrıca, *Zingiber officinale* ekstraktları ve 6-gingerol ile yapılan çok sayıdaki çalışmayla farklı kanser tiplerinde antikanser etkiye sahip olmalarının yanı sıra koruyucu etkiye de sahip oldukları gösterilmiştir. Nrf2, p38/MAPK, p65/NF-κB, TNF-α, ERK1/2, SAPK/JNK, ROS/NF-κB/COX-2, caspases-3, -9, and p53 ilgili bazı sinyal yolları ve önemli mediatörler aracılığıyla etki gösterdikleri ortaya konulmuştur (Poltronieri vd., 2014; Haris vd., 2018; Lima vd., 2018'de derlenmiştir).

Zingiber officinale ekstraktları ve 6-gingerolun farklı kanser tiplerinde antikanser etkiye ve koruyucu etkiye de sahip oldukları bilinmektedir. Bu etkilerini Nrf2, p38/MAPK, p65/NF-κB, TNF-α, ERK1/2, SAPK/JNK, ROS/NF-κB/COX-2, caspases-3, -9, and p53 gibi

bazı sinyal yolları ve önemli mediatörler aracılığıyla gösterdikleri ortaya konulmuştur (Baliga vd., 2011; Poltronieri vd., 2014; Lima vd., 2018’de derlenmiştir). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, 6-gingerol ve aspirin sentezlenerek pro-ilâç olarak kullanılmış ve gastropreventif antikanser aktiviteye sahip olduğu in vivo olarak gösterilmiştir (Zhu vd., 2017). Ayrıca cispatin, 5-FU, paklitaksel, wortmannin ve rapamycin gibi ilâçlarla ve quersetin, shogaol ve kurkumin gibi doğal aktif bileşenlerle olan sinerjik etkisi de gösterilmiştir (Zhang vd., 2017; Shao vd., 2016).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Kullanılan Kimyasal Materyaller

Bornil Asetat (Acros), 6-gingerol (MedChemExpress) Penisilin/Streptomisin (Gibco) FBS (Sigma ve Gibco), MTT (Sigma), DMSO (Sigma), Tripsin/EDTA (Sigma), Bax antikoru (Santa cruz), Bcl-2 antikoru (Santa cruz), Meme Kanser Kök Hücre İzolasyon Kiti (Pluriselect).

3.2. Test maddelerinin hazırlanması

Bornil asetat ve 6-gingerol test maddeleri DMSO içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Bornil asetat taze olarak 100 mM ana stok olarak hazırlanmış ve ardından 10 mM konsantrasyonda besiyeri ile seyreltilerek deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. 6-gingerol 10 mM ana stok olarak hazırlanmıştır. Dozlar her deney için taze olarak hazırlanıp taze besiyeri kullanılarak dilüsyonlar yapılmıştır. DMSO miktarı %0,1'in altındadır. Bornil asetat oda sıcaklığında ve 6-gingerol -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada Tablo1'de verilen hücre grupları kullanılmıştır. Hücreler 25 ve 75 cm²'lik flasklarda büyütülmüştür. Hücreler %10 (v/v) FBS, 100 ünite/mL penisilin/streptomisin, %1 glutamat içeren DMEM besiyeri içinde, 37°C'de %5 CO₂ içeren atmosfer ve uygun nem altında kültüre edilmiştir. Hücreler %80 oranında yoğunluğa ulaştıkları zaman 37°C'de %1 tripsin/EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılarak taze besiyerine toplanmıştır. Hücreler sayılarak uygun konsantrasyonda yeni kültür kaplarına ekilmiştir. Tüm hücresel çalışmalarda hücre sayıları %0.04 Tripan mavisi ile sayılarak belirlenmiş ve canlı hücreler göz önünde bulundurularak deneysel süreçlere karar verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kontrol ve deney grupları

Akciğer normal epitel hücresi	Normal insan bronş epitel hücre hattı (ATCC kat no: BEAS-2B)
Ebeveyn kanser hücresi	İnsan meme kanser hücre hattı (ATCC kat no: MCF-7)
	İnsan akciğer kanser hücre hattı (ATCC kat no: A549)
Meme kanser kök hücresi (MKKH)	CD44+ ve CD24- Meme kanser kök hücreleri
Akciğer kanser kök hücresi (AKKH)	CD326+ ve CD133+ Akciğer kanser kök hücreleri

3.4. CD44+/CD24- Meme Kanser Kök Hücrelerinin (MKKH) MCF-7 Hücre Hattından İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu

3.4.1. CD44+/CD24- MKKH'nin MCF-7 hücre hattından immünomanyetik olarak izolasyonu

MCF-7 hücre hattından PluriSelect CD44+/CD24- Meme kanseri kök hücre izolasyon kiti kullanılarak kanser kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kit prosedürüne göre uygulanan işlemler şöyledir: Öncelikle CD24- hücreleri negatif seçimle uzaklaştırılmıştır. Bunun için hücreler soğuk 1X PluriSelect Plus tamponu ile yıkanacak ve 5 mL'lik tüplerin içine 5×10^6 adet hücre konulmuştur. Biotinlenmiş CD24 antikorundan 25 μ L tüplere eklenmiş ve 15 dakika boyunca $2-8^{\circ}\text{C}$ ' de inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında hücreler yeniden soğuk 1 x PluriSelect Plus tamponu ile yıkanmış ve PluriSelect Streptavidin Ferrofluid'den 50 μ L eklenerek 15 dakika 4°C 'de inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında soğuk tamponla yeniden süspanse edilen hücreler 300 g'de 8 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve oluşan tampon soğuk tamponda yeniden süspanse edilmiştir. Daha sonrasında tüp PluriSelect mıknatısının içine yerleştirilmiş ve 6 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. CD24 low/- olan hücreler pipet yardımı ile yeni bir tüpe aktarılmıştır. Mıknatısa yerleştirme işlemi minimum 2-3 kere tekrarlanmıştır. Yeni tüpümüz 300 g'de 8 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve PluriSelect Plus tamponunda

yeniden süspanse edilerek bir diğer seçim aşaması olan CD44+ hücrelerinin pozitif olarak izolasyonuna geçilmiştir. Bu seçim için ilk olarak 10 µL biyotinlenmiş CD44 antikorları tüpe eklenecek ve 15 dakika boyunca 4°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler 3 mL soğuk 1x PluriSelect Plus tamponu ile yıkanmış ve 300 g’de 8 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen hücreler yeniden soğuk 1 x PluriSelect Plus tamponu ile süspanse edilerek 50 µL PluriSelect Streptavidin Ferrofluid eklenerek 15 dakika 4°C’de inkübe edilmiştir. Hücreler tampon ile yıkandıktan sonra 300 g’de 8 dakika santrifüj edilerek yine tampon solüsyonu ile yeniden süspanse edilmiştir. Daha sonrasında tüp PluriSelect mıknatısının içine yerleştirilerek 6 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış ve istenmeyen hücreler uzaklaştırılmıştır. Son olarak tüp mıknatıstan uzaklaştırılarak ve CD24low/- CD44+ hücrelerinin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. CD44+/CD24- MKKH’nin kültürü

İzole edilen CD44+/CD24- kanser kök hücreleri, laboratuvarımızda rutin olarak yapılan sayma yöntemi ile sayılarak uygun konsantrasyonda kanser kök hücre medyumunda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre boyunca her gün kontrol edilerek hücreler pasajlamaya kadar büyütülmüş ve deneysel süreç için gerekli sayıya ulaşana kadar inkübe edilmiştir.

Kısaca özetlemek gerekirse; izole edilen kanser kök hücreleri yüksek glukozlu %10 FBS içeren DMEM besiyerinde ve ardından Promocell kanser kök hücre besiyeri kullanılarak kültüre edilmiştir. Bunun için izole edilen hücreler Promocell besiyeri ile yeniden süspanse edilmiş ve 10^6 hücre/mL medyum olacak şekilde kültür ortamı içinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca her gün mikroskop ile kontrol yapılmış ve 3-4 günde bir taze medyum ile değişimi yapılarak pasajlar yapılmıştır. Tek hücre süspansiyonu elde edebilmek için hücre süspansiyonu 40 µm olan bir süzgeçten geçirilmiştir. Daha sonrasında hücreler kültür kaplarında 4 mL medyum içinde 4×10^4 adet hücre olacak şekilde kültüre edilmiştir. Hücreler sayılarak uygun konsantrasyonda yeni kültür kaplarına ekilmiştir. Deneyler için gerekli sayıya ulaşınca kadar pasaja devam edilmiştir.

3.4.3. CD44+/CD24- MKKH Akış Sitometri ile Karakterizasyon Analizleri

Önceki aşamalarda izole edilen MKKH hücreleri Annexin V-PI apoptoz kiti kullanarak hücre canlılığı akış sitometri cihazı ile analiz edilerek verimlilikleri test edilmiştir. Verimlilik sonuçları %95 üstü olan hücreler CD44+ ve CD24- antikorları ile ileri karakterizasyon işlemlerine alınmıştır. Antikorlarla işaretleme için hücreler, belirlenen hücre yüzey belirteçlerine özel -FITC, konjuge CD44+ ve CD24- monoklonal antikorları ile ve uygun izotip kontrolleri ile oda sıcaklığında 45 dakika ve karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yıkama solusyonu olarak %0,1 sodyum azide içeren PBS eklenerek 5 dakika 1300 rpm’de santrifüj edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonları FACS Calibur Akım Sitometri (BD Sciences) cihazında okutulmuş ve analiz değerlendirmesi BD CellQuest™ software programı ile yapılmıştır.

3.5. CD326+ ve CD133+ Akciğer Kanseri Kök Hücrelerin A549 Hücre Hattından İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Kültürü

3.5.1. AKKH’lerin immunomanyetik olarak (MACS) izolasyonu (immunseleksiyon)

A549 hücreleri izolasyon için yeterli sayıya ulaştıklarında CD133+ ve CD326+ olan hücreler manyetik hücre ayırma tekniği olan MACS yöntemi (pluriSelect, Germany) ile monoklonal antikorlar kullanılarak immun seleksiyonu yapılarak izole edilmiştir. İzolasyon verimliliği (saflık ve canlılık) açısından test edilen hücreler, bu proje önerisinde yapılması planlanan analizler için yeterli sayıya ulaşana kadar tümörsferik kültüre edilmiştir. İzolasyon için hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp 2 mL’lik tüpe konularak tek hücre süspansiyonu haline getirilerek santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kitin içerisindeki B tamponundan 500 µL ve yıkama tamponundan da 500 µL eklenerek toplam 1 mL içerisinde 5x10⁶ adet hücre olacak şekilde konsantrasyonu ayarlanmıştır. Kitin içerisinde bulunan 30 µm’lik prefiltrasyon filtresi (S-pluriBead strainer) kullanılarak solüsyon içerisindeki agregatlar uzaklaştırılmıştır. Üzerine 200 µL S-pluriBead süspansiyonu ve 500 µL M-pluriBead süspansiyonu eklenip oda ısısında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Tüp 5’er dk arayla nazikçe dairesel hareketlerle homojenize edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra 50 mL’lik konik tabanlı tüpe altta 30 µm’lik filtre üstte 60 µm’lik filtre olmak üzere yerleştirilmiştir. Süzmeden önce filtre 1 mL yıkama tamponu

ile ıslatılmıştır. Hücre-antikor-mikrobead solüsyonu filtrenin üzerinden nazıkçe eklenerek filtre edilmiştir. Filtre de kalan tüm hücreler antikor pozitif hücreler iken, filtreden tüpün içine geçen hücreler ise antikor negatif hücreler olmuştur. Filtreler 5 mL'lik pipet kullanılarak nazıkçe 2 kez 2 mL yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Filtrede kalan antikor pozitif KKH'ler hem microbeadlerden hem de filtreden kitin içerisinde bulunan ayırıştırma solüsyonu ile uzaklaştırılarak, PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Bu işlem her bir antikor (CD133+ ve CD326+) için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. İzole Edilen CD326+ ve CD133+ Akciğer kanser kök hücrelerinin kültürü

İzole edilen CD326 ve CD133 pozitif kanser kök hücreleri, laboratuvarımızda rutin olarak yapılan sayma yöntemi ile sayılarak uygun konsantrasyonda kanser kök hücre medyumunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca her gün mikroskop ile kontrolleri yapıp sferlerin morfolojisi izlenerek pasaj zamanına karar verilip uygun zamanlarda pasajlanarak kültür; hücre sayısı, deney ve analizler için gereken miktara ulaşıncaya kadar devam ettirilmiştir. Kısaca özetlersek; MACS yöntemi ile izole edilen kanser kök hücreler (CD133+ ve CD326+) PromoCell'in kanser kök hücre kiti kullanılarak tümörsferik kültüre edilmiştir. Bunun için izole edilen hücreler 3-5 mL medyum (Promocell, C-28070, Heidelberg, Germany) ile resüspende edilerek ve 10×10^5 hücre/mL medyum olacak şekilde tümörsfer kültür ortamı için inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler 4-10 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca her gün mikroskop ile kontrolleri yapılacak 3-4 günde bir taze medyum ile değişimi yapılarak ve tümörsferlerde koyu renk merkez oluşmadan pasajlar yapılmıştır. Bunun için öncelikle tümörsferleri içeren medyum konik tabanlı tüpe aktararak tümörsferler toplanmıştır. Konik tüp oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bekletilerek tümörsfer sedimantasyonu sağlanmıştır. Tümör kürelerinin tüpte kalmasına dikkat edilerek, yaklaşık 200 μ L kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüpe eşit miktarda (200 μ L) medyum eklenerek 10 dakika boyunca sedimantasyon işlemi tekrarlanmıştır. Sedimantasyon süresinin sonunda 200 μ L PBS nazıkçe tüp içerisinden aspire edilmiştir. Tümörsferlerin üzerine 1 mL tripsin-EDTA eklenerek 2-4 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Her 30 saniyede bir tripsin-EDTA solüsyonu ile tümörsferler pipetleme ile resüspanse edilerek ve tripsin-EDTA tüp eğilerek dikkatli bir şekilde aspire edilerek üzerine 5 mL taze medyum eklenerek 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak ve hücreler yeniden 5 mL taze

medyum ile resüspanse edilmiştir. Tek hücre süspansiyonu elde edebilmek için hücre süspansiyonu 40 µm'lik bir süzgeçten geçirilerek ve hücreler mikroskop altında canlılıkları kontrol edilerek ve sayım yapılmıştır. Daha sonrasında hücreler kültür kaplarında 4 mL medyum içinde 4×10^4 adet hücre olacak şekilde kültüre edilmiştir.

3.5.3. CD326+ ve CD133+ Akciğer kanser kök hücrelerin akış sitometri ile izolasyon yönteminin karakterizasyonu

İzole edilip kültürde çoğaltılan CD326 ve CD133 negatif ve pozitif hücreler, izolasyonun verimliliği (saflığı ve canlılığı) açısından Akış sitometri ile analiz edilmiştir. Bunun için CD326+, CD133+ antikorları (saflık) ve Annexin V-PI apoptoz kiti (canlılık) kullanılmıştır. İlk olarak izolasyonunun verimliliği, saflık (CD326+ ve CD133+) ve hücre canlılık (Annexin V-PI) analizleri ile test edilmiştir. Beklenen saflık oranı, izolasyon kitinin üreticisine göre %70-98'tir (daha önce laboratuvarımızda yaptığımız immunoseleksiyon çalışmalarından elde ettiğimiz sonuçlarda %90-98 saflıkta izolasyon gerçekleştirilmiştir. Kanser kök hücrelerinde beklenen hücre sayısı ise başlangıçtaki hücre sayısının %1-25'i kadardır. Tüm bu analizler yapılarak izolasyonun verimliliği olumlu sonuçlandığında hücreler, ilave antikorlar ile (ABCG2+, ALDH1+, CD90+) ileri karakterizasyon işlemlerine alınmıştır. Akış analizlerinde antikorlarla yapılarak olan işaretlemeler kısaca özetlersek; Belirlenen hücre yüzey işaretçilerine özel -FITC, -PE ve PerCP konjuge CD326+ ve CD133+ monoklonal antikorları ile ve uygun izotip kontrolleri ile oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yıkama solusyonu (%0.1 sodyum azide içeren PBS) eklenerek 5 dk 1300 rpm santrifüj edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonları akış sitometri cihazında okutulacak ve analizi BD CellQuest™ software programı ile yapılacaktır.

Kısaca özetlersek; MACS yöntemi ile izole edilen kanser kök hücreler (CD326+ ve CD133+) PromoCell'in kanser kök hücre kiti kullanılarak tümörsferik kültüre edilmiştir. Bunun için izole edilen hücreler 3-5 mL medyum (Promocell, C-28070, Heidelberg, Germany) ile resüspanse edilerek ve 10×10^5 hücre/mL medyum olacak şekilde tümörsfer kültür ortamı için inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler 4-10 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca her gün mikroskop ile kontrolleri yapılarak 3-4 günde bir taze medyum ile değişimi yapılarak ve tümörsferlerde koyu renk merkez oluşmadan pasajlar yapılmıştır. Bunun için öncelikle tümörsferleri içeren medyum konik tabanlı tüpe aktararak

tümörsferler toplanmıştır. Konik tüp oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bekletilerek tümörsfer sedimantasyonu sağlanmıştır. Tümör kürelerinin tüpte kalmasına dikkat edilerek, yaklaşık 200 µL kalacak şekilde süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüpe eşit miktarda (200 µL) medyum eklenerek 10 dakika boyunca sedimantasyon işlemi tekrarlanmıştır. Sedimantasyon süresinin sonunda 200 µL PBS nazıkçe tüp içerisinden aspire edilmiştir. Tümörsferlerin üzerine 1 mL tripsin-EDTA eklenerek 2-4 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Her 30 saniyede bir tripsin-EDTA solüsyonu ile tümörsferler pipetleme ile resüspanse edilerek ve tripsin-EDTA tüp eğilerek dikkatli bir şekilde aspire edilerek üzerine 5 mL taze medyum eklenerek 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak ve hücreler yeniden 5 mL taze medyum ile resüspanse edilmiştir. Tek hücre süspansiyonu elde edebilmek için hücre süspansiyonu 40 µm'lik bir süzgeçten geçirilerek ve hücreler mikroskop altında canlılıkları kontrol edilerek sayım yapılmıştır. Daha sonrasında hücreler kültür kaplarında 4 mL medyum içinde 4×10^4 adet hücre olacak şekilde kültüre edilmiştir. Hücreler sayılarak uygun konsantrasyonda yeni kültür kaplarına ekilmiştir. Deneyler için gerekli sayıya ulaşıncaya kadar pasaja devam edilmiştir.

3.6.WST-1 Testi ile Mitokondriyel Aktivite Üzerinden Sitotoksiste Analizi

WST-1(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) mitokondri aktivitesine dayalı olan sitotoksiste testidir (Tan and Berridge, 2000). Test, kitin alındığı firmanın önerdiği yöntemle göre uygulanmıştır. Hücreler 2×10^3 (A549 ve BEAS-2B) hücre/kuyucuk ve 5×10^3 (MCF-7, MKKH ve AKKH) hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra uygun koşullarda MCF-7, A549 ve BEAS-2B hücreleri için 24, 48 ve 72 saat ile MKKH ve AKKH hücreleri için 24 saat test maddelerinin farklı dozlarıyla muamele edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri uzaklaştırılıp, final konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde WST-1 boyası besiyeriyle hücrelere aktarılıp 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 490 nm dalga boyunda ELISA cihazında okutulmuştur.

Hücre kültürü çalışmaları, NCI (National Cancer Institute/Ulusal Kanser Enstitüsü)'nin *in vitro* sitotoksiste tarama çalışmalarındaki yaklaşımı esas alınarak hücre hatları ile bornil asetat ve 6-gingerolun farklı konsantrasyonları kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca iki maddenin kombinasyonu gerçekleştirilerek sinerjik etkisi araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, pozitif kontrol olarak 5-FU (5-Fluorourasil) kullanılmıştır.

Sitotoksosite testleri hem zamana bağılı hem de doza bağılı olarak analiz edilmiştir. Her bir konsantrasyon en az 4 bağımsız kuyucukta test edilmiştir. Deneyler sonuçların doğrulanması açısından en az 3 kez tekrarlanmıştır. Bornil asetat (BA) ve 6-gingerol (6G) ile muamele edilen hücrelere 24 saat süreyle uygulanmıştır. MCF-7, A549 ve BEAS-2B hücreleri için 24, 48 ve 72 saat ile MKKH ve AKKH hücreleri için 24 saat test maddelerinin farklı dozlarıyla muamele edilmiştir. Her sitotoksosite testinde IC_{50} (başlangıçta ekilen hücrelerin yarısının çoğalmasını durduran doz) değerleri belirlenmiştir. Hücre sayımları %0.04 Tripan mavisi boyası kullanılmış ve ölü hücreler hücre sayısına dahil edilmemiştir. Sitotoksosite test sonuçlarına göre belirlenen doz üzerinden moleküler düzeyde araştırmalar uygulanmıştır.

3.7. Nötral Kırmızısı (NR) ile Lizozomal Aktivite Üzerinden Sitotoksosite Analizi

Nötral red analizi, NICEATM (The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, 2003) tarafından uygulanan yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre hücreler 2×10^3 (A549 ve BEAS-2B) hücre/kuyucuk ve 5×10^3 (MCF-7, MKKH ve AKKH) hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilip, 24 saat büyütüldükten sonra test maddesinin farklı konsantrasyonları eklenerek hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 100 µl/kuyucuk PBS ile yıkandıktan sonra %1 oranındaki NR boyası ile 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırılıp hücreler tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara formazan tuzlarının çözülmesi için 100 µl DESORB (%1 glacial asetik asit, %49 etanol) aktarılıp, ELISA (Biotek-800 TS) cihazında 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Her doz için en az 4 kuyucuk içeren en az 3 ayrı deney gerçekleştirilmiştir.

3.8. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyaması ile Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

Test maddelerinin hücre üzerindeki morfolojik etkisi H&E boyama yöntemiyle ortaya konulmuştur. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 24 saat büyümeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler, test maddelerinin belirli dozlarıyla 48 saat muamele edildikten sonra PBS ile yıkanmıştır. Methanolle fikse edilerek PBS ile yıkanmıştır. Hematoksilende 5 dakika muamele edildikten sonra 3 kere PBS

ile yıkanmıştır. Ardından, eosin ile 10 dakika muamele edilip PBS ile yıkandıktan sonra preparat hazırlanarak mikroskopik inceleme gerçekleştirilmiştir.

3.9. İmmünohistokimyasal Analiz ile Apoptotik Belirteçlerin İncelenmesi

Yöntem standart olarak uygulanan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, hücreler 6 kuyucuklu plakalara 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 24 saat büyümeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler, test maddelerinin belirli dozlarıyla 48 saat muamele edildikten sonra PBS ile yıkanarak, metanol ile 10 dakika fikse edilmiştir. Ardından 3 kere PBS ile yıkandıktan sonra bloklama solüsyonu kullanılarak bloklanıp Bax ve Bcl-2 antikorları ile gece boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyon sonunda biotinleme yapılarak 10 dakika inkübe edilmiştir. Yıkama işleminin ardından, streptosidin peroksidaz ile 10 dakika muamele edilmiştir. Süre sonunda, PBS ile 3 kere yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra AEK kromojen ile 10 dakika inkübe edilip, PBS ile tekrar yıkama yapılarak hematoksin ile 5 dakika inkübe edildikten sonra preparat hazırlanmıştır. Preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

3.10. Annexin V/PI ile Apoptoz Analizi

Anneksinler kalsiyum bağımlı fosfolipit ailesi proteinlerindendir ve tercihen fosfatidilserine (PS) bağlanırlar. Normal fizyolojik şartlar altında PS plazma zarının içerisinde lokalize olarak bulunur. Apoptoz başladığı zaman (erken apoptotik dönem) veya hücre nekrozu sırasında plazma zarındaki fosfolipid zar bütünlüğü değişir ve PS ekstrasellüler zar alanında transloke olur ve işaretli flüoresans (örn. FITC, APC) anneksin V aracılığıyla kalsiyum bağımlı tarzda tayin edilebilir (Ulukaya vd., 2011). Anneksin V hücre yüzeyinde ayırt edici şekilde apoptotik hücrelere bağlanabilmektedir. Propidyum iyodür (PI), sadece hücre zarı hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Dolayısıyla, canlı hücreler; FITC/APC-/PI-, erken apoptotik hücreler; FITC/APC+/PI- ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler; FITC/APC+/PI+ boyanmakta ve bu şekilde birbirlerinden ayırt edilmektedirler.

Yöntem, Annexin V-PI (Biolegend) apoptoz tayin kiti protokolüne göre uygulanmıştır. Bu amaçla, belirli sayıda hücre 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildikten sonra bornil asetat ve 6-gingerolün IC₅₀ olarak belirlenen dozu ile muamele edilmiştir.

Uygulama süreleri sonunda, hücreleri zedelemekten üzerlerinden tüm besiyeri uzaklaştırılarak 2 kere soğuk PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Ardından anneksin V binding buffer ile muamele edilip 5 µl APC ve 10 µl PI boyası eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. Son olarak, 400 µl anneksin V binding buffer eklenerek akış sitometresi cihazında analiz edilmiştir.

3.11. Akridin Oranj/ Etidyum Bromür (AO/EB) ile Apoptoz Analizi

AO/EB yöntemi Hisham vd. (2009) kullandığı yöntemle göre uygulanmıştır. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 3×10^5 hücre/kuyucuk ve 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 24 saat büyümeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler, test maddelerinin IC₅₀ dozlarıyla 24 saat muamele edildikten sonra tripsin/EDTA ile 2 mL'lik santrifüj tüplerine toplanarak, 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Besiyeri aspirasyon ile uzaklaştırılıp 25 µl taze besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. AO/EB karışımı 1:1 oranında (100 mg/ml: 100 mg/ml) PBS içinde hazırlanmış ve sonra bu karışım 1:10 oranında besiyeri ile seyreltilmiştir. Bundan 1 µl alınıp 25 µl hücre süspansiyonuna eklenmiş ve hemen preparat hazırlanmıştır. LEICA DM2500 floresan mikroskobu ile görüntülenip fotoğraflama gerçekleştirilmiştir. Duke (Apoptosis methods and protocols, vol.282. 2004) tarafından belirtilen yöntemle göre apoptotik hücre tayini/analizi gerçekleştirilmiştir.

3.12. ROS Analizi ile Oksidatif Stresin İncelenmesi

Hücrede ROS (reaktif oksijen türleri) birikmesi başta kanser olmak üzere birçok hastalığa neden olabilmektedir. Bu nedenle sekonder metabolitlerin oksidatif strese neden olup olmadığı ROS kiti kullanılarak gösterilecektir (Roesslein vd., 2013). Yöntem, ROS (Biovision) oksidatif tayin kiti protokolüne göre uygulanmıştır. Bu amaçla, hücreler tripsin ile toplanarak thoma lamında sayılmıştır. Ardından, kit içerisinde bulunan ROS label ile 37°C'de 35 dakika karanlık bir ortamda floresan işaretleme gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda, 3×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildikten sonra hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda, test maddelerinin belirli konsantrasyonları ile 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Ardından, hücreler tripsin ile toplanıp santrifüj edilmiş ve ROS assay buffer eklenerek Ex/Em =

495/529 nm floresan yoğunluk kullanılarak akış sitometri cihazı ile ölçüm gerçekleştirilmiştir. Analiz için 3 farklı kontrol hazırlanmıştır: Negatif kontrol (işaretli olmayan hücreler), pozitif kontrol (sadece ROS ile işaretli hücreler) ve eksperimental kontrol/pozitif kontrol (1xROS inducer ile muamele edilmiş ROS işaretli hücreler).

3.13. Laktat Dehidrojenaz Testi ile Hücre Nekrozunun İncelenmesi

Laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesinin ölçülmesi canlı ve sağlıklı hücrelerin belirlenmesinden ziyade ölmüş ve hücre zarı hasar görmüş hücrelerin miktarının ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Hasarlı hücrelerde ekstrasellüler ortama salınan sitoplazmik bir enzimdir ve hücre nekrozunun da önemli bir belirteci olduğu bilinmektedir. Hücreler tarafından medyum ortamına bırakılmış LDH enzimleri, laktat bileşiğini pirüvat bileşiğine katalizler ve ortamda bulunan NAD^+ bileşiklerini NADH/H^+ 'a indirgenmektedir. NADH ürünleri sarı renkli tetrazolium tuzlarının kırmızı renkli formazan tuzlarına indirgenmesini sağlamaktadır. Suda çözünen kırmızı renkli formazan tuzlarının 490-630 nm dalga boyunda absorbanslarının ölçülmesiyle LDH miktarı spektral olarak belirlenebilmektedir. Böylece ölen ya da hücre zarı hasar gören hücrelerin miktarı indirek olarak ortaya konulmaktadır (Burd vd., 1973; Riss vd., 2016). LDH yöntemi test maddelerinin hücre hasarı üzerindeki etkisini araştırmak için kullanılmıştır.

LDH analiz kitindeki protokole göre gerçekleştirilen yöntemle göre, ilk olarak belirli sayıda hücreler 96 kuyucuklu kültür plakalarına ekilip 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra test maddelerinin farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. İnkübasyon sonunda her kuyucuktaki örneklerden 50 μl alınarak yeni bir plakanın kuyucuklarına aktarılacak 50 μl reaksiyon karışımı ilave edilerek 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, her kuyucuğa 50 μl stop solüsyonu eklenerek plakalar 5 dakika çalkalayıcıda bekletildikten sonra ELISA cihazında 450 ve 630 nm dalga boyunda absorbans değerleri okutulmuştur.

3.14. RT²-PCR Yöntemi

3.14.1. RT²-PCR ile Genotipik Analizler

AKKH ve MKKH hücreleri için BCL2, BAX, VEGFA (qiagen), BMP2, WNT2, TGFB1, TGFB3 (qiagen) ve ITGA5 genlerinin ekspresyonları RT²-PCR analizi ile belirlenmiştir.

Öncelikle; 3 farklı gruptaki hücrelerinden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ölçülmüştür. Daha sonra gen ekspresyonu için cDNA sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak RT²-PCR işlemi de gerçekleştirildikten sonra alınan sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülüne göre hesaplanarak istatistiksel analiz yapılmıştır.

3.14.2. Total RNA İzolasyonu

Kültürde çoğaltılan 1×10^6 hücre/mL seçilen hücre gruplarından total RNA izolasyonu Hybrid-R total RNA Purification Kit protokolü izlenerek gerçekleştirilmiştir. Ön hazırlık olarak; RL Buffer çözeltisine 150 µl 2-Merkaptoetanol, Lyse ALL çözeltisine 60 µl 2-Merkaptoetanol eklenmiştir. Diğer işlemler sırayla şu şekilde yapılmıştır.

1. Medyum içerisinde 1×10^6 hücre 15 ml falkon tüpüne alınarak 400 x g'de santrifüj edilmiştir. Ardından pellet hücreler 1 ml soğuk PBS çözeltisi ile yıkanarak santrifüj edilmiştir.

2. Hücre pelletine 400 µl RL tamponu eklenip vortekslenmiştir.

3. Homojenize olmuş örnek üzerine 100 µl Lyse ALL solüsyonu eklenip tekrar vortekslenmiştir.

4. Maksimum hızda 2 dk boyunca santrifüj edilmiştir.

5. Supernatant kit içeriğinde yer alan homogenization spin-column (Önceden 30 µl Buffer A solüsyonu eklenerek aktive edilen) içeren 2 ml'lik bir tüpe aktarılıp 2 dk 12000 x g'de santrifüj edilmiştir.

6. Altta kalan sıvıya 0.7 ml hacim saf etanol eklenip pipetlenerek iyice karıştırılmıştır.

7. Karışım RNA binding spin-column içeren 2 ml'lik bir tüpe aktarılıp 2 dk 12000 x g'de santrifüj edilmiştir.

8. Total RNA purifikasyonu için 2-8°C'de saklanan RNA binding spin-column üzerine 500 µl Wash buffer eklenmiş ve 1 dk boyunca 11000 x g'de santrifüj edilmiştir.

9. Altta kalan karışım dökülmüştür.

10. Kalan sıvıları uzaklaştırmak için 1 dk daha 11000 x g'de santrifüj edilmiştir.

11. RNA binding spin-column yeni bir tüpe yerleştirilerek 30 µl RNase-free water eklenmiştir.

12. 11000 x g'de 2 dk santrifüj edilmiştir.

13. RNA binding spin-column çıkarılarak örnek -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.14.3. RNA Konsantrasyonunun Ölçümü

Çalışmada kullanılan hücre gruplarından izole edilen RNA konsantrasyonları florometrik olarak (Qubit Fluorometer, Thermofisher Scientific, ABD) ölçülmüştür. Bu işlem için üretici tarafından sağlanan Qubit RNA HS Assay Kit (Thermofisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. 0.5 ml'lik tüplere 190 μl Qubit çalışma solüsyonuna 10 μl örneklerden eklendi ve vortekslenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. Benzer şekilde 190 μl Qubit çalışma solüsyonu ve 2 adet 10 μl standartlardan oluşan tüpler de hazırlanarak 15 dk oda ısında inkübe edilmiştir. Ardından öncelikle kit tarafından sağlanan 2 standart ve ardından örnekler cihaza yüklenerek okutulmuştur. Elde edilen ölçüm değerlerine göre örnek konsantrasyonları eşitlenerek cDNA sentezi işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.14.4. cDNA Eldesi

Hücre gruplarından izole edilen total RNA'lardan cDNA eldesi için Wizscript cDNA Synthesis kiti kullanılmıştır. RNA konsantrasyonları eşitlenmiştir. Tablo 1'de yer alan bileşenler ile 20 μl 'lik karışım hazırlanmıştır. 42°C 'de 5 dk inkübe edilmiştir. Ardından revers transkripsiyon karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Gen ekspresyonu cDNA sentezi için hazırlanan karışım içeriği

Karışım	Miktar (μl)
Template RNA & primer mix	1
10X reaction buffer	2
RNase Inhibitor (40U/ μl)	0.5
Reverse Transcriptase (200 U/ μl)	1
DTT (100mM)	1
RNase free water	20 μl 'ye tamamlandı
Toplam	20

3.14.5. qRT-PCR Reaksiyonunun Hazırlanması

Real time PCR işlemini gerçekleştirebilmek için Amplifyme probe universal mix kiti (BLIRT, Polonya) kullanılarak master mix hazırlanmıştır (Çizelge 3.3). Bu aşamada primerler ve analizi gerçekleştirmemizde yardımcı işaretli DNA problemleri eklenmiştir. Daha sonra master mix içeren tüplere eşit miktarda cDNA'lar ilave edildikten sonra qPCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. qPCR master-mix bileşen ve hacimleri

Bileşenler	X1
2x Amplifyme probe mix	10 µl
Forward primer (10 µM)	0.6 µl
Reverse primer (10 µM)	0.6 µl
Probe (10 µM)	0.2 µl
50x ROX solusyonu	0.4 µl
Template DNA/cDNA	x µl
PCR-grade water	20 µl'ye kadar eklenir

3.15. İstatistiksel Analiz

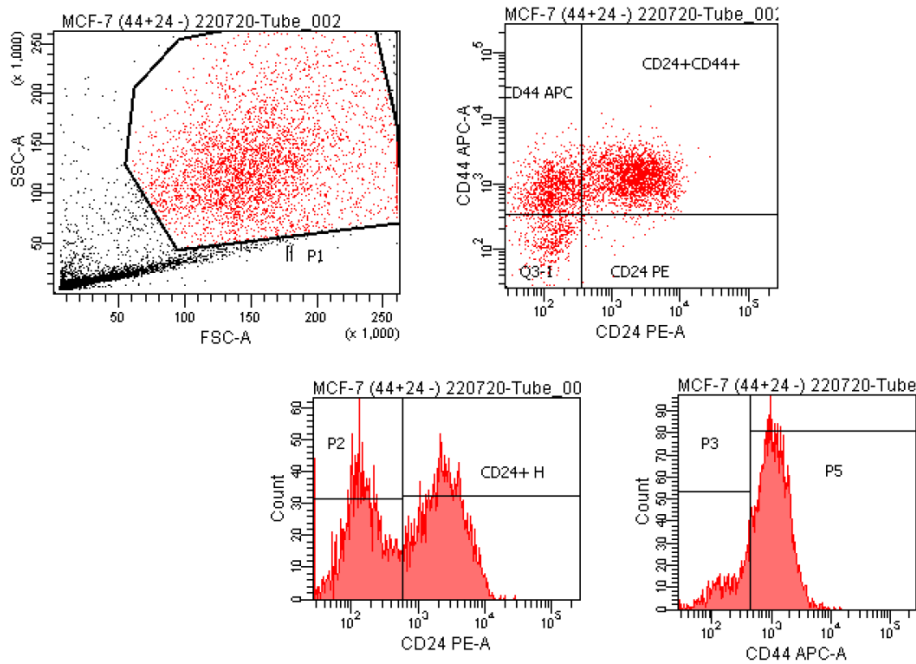
Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde 8.3 Graph Pad Prisma kullanılmış ve elde edilen verilerin one/two way ANOVA ile post-hoc olarak Dunnet testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Kanser Kök Hücrelerinin Akış Sitometri Yöntemi ile Karakterizasyon Analizleri

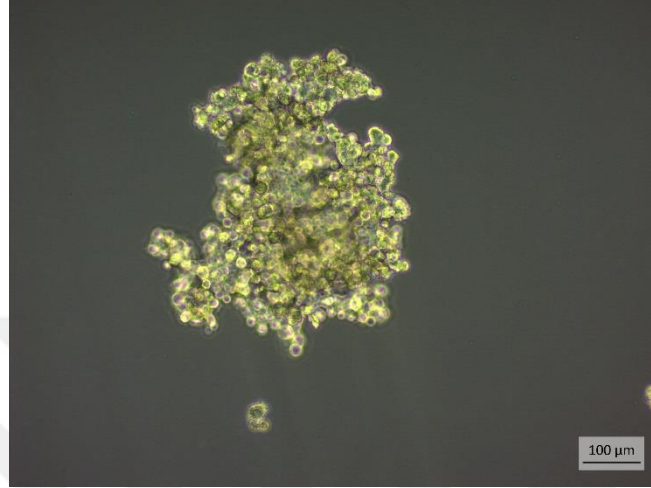
4.1.1. CD44+/CD24- meme kanser kök hücrelerinin (MKKH) akış sitometrisi ile karakterizasyon analizi

MCF-7 hücre hattından CD44+/CD24- MKKH izole edilerek akış sitometri cihazı kullanılarak karakterize edilmiştir (Şekil 1). %95 ve üstü verimli olan hücreler ile yola devam edilmiş ve CD44+ ve CD24- antikoları ile ileri karakterizasyon işlemlerine alınmıştır. Hücrelerin antikolarla işaretlemesi için belirlenen hücre yüzey belirteçlerine özel -FITC, konjuge CD44+ ve CD24- monoklonal antikoları ile ve uygun izotip kontrolleri yapılmıştır. Buna göre, CD24- düşük düzeyde görülürken CD44+ yüksek düzeyde görülmektedir. CD44+/CD24+ şeklinde ayrıştırılan hücre popülasyonu da ayrıca görülmektedir. Meme kanseri için Al-Hajji vd. (2003), transmembran glikoprotein CD44'ü aşırı eksprese eden ve hücre membran sialoglikoprotein CD24'ü (CD44^{high}/CD24^{-low}) düşük eksprese eden hücrelerin tümörijenik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.1. MCF-7 hücre hattından izole edilen CD44+/CD24- MKKH'nin karakterizasyonunun akış sitometrik olarak analizi.

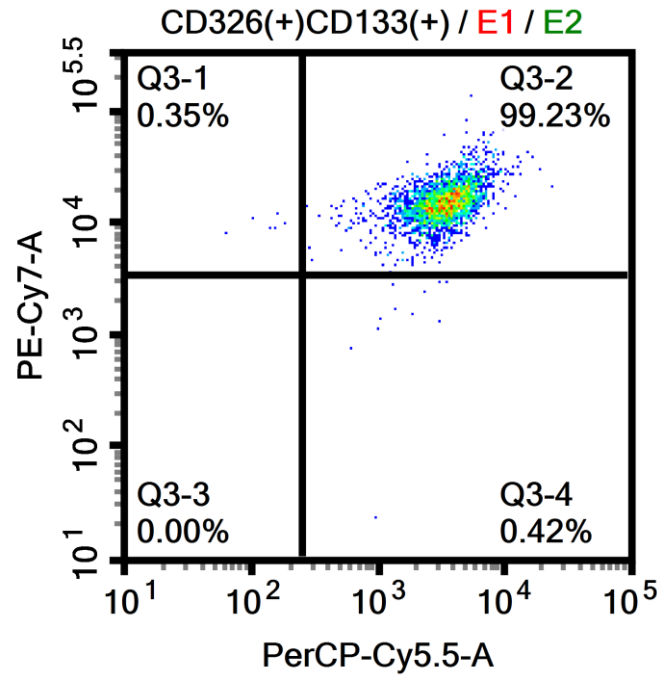
CD44+/CD24- olarak izole edilen MKKH kültüre edilerek uygun ortamda muhafaza edilmiştir. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi hücreler sferik kültür olarak üretilmiştir. Ardından monolayer olarak devam edilerek deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. MCF-7 hücrelerinden izole edilen CD44+/CD24- MKKH sferik kültürünün invert mikroskop altında görüntülenmesi.

4.1.2. CD326+/CD133+ akciğer kanser kök hücrelerinin (akkh) akış sitometrisi ile karakterizasyon analizi

A549 hücre hattından CD326+/CD133+ AKKH izole edilerek akış sitometri cihazı kullanılarak karakterize edilmiştir (Şekil 4.3). CD133 gen ekspresyonunun hücrelerde düşük düzeyde olması sebebiyle öncelikle CD326+ hücreleri izole edilerek kültüre edilmiş ve ardından CD133+ hücreler seçici olarak işaretlenip ayrıştırılmıştır. Hücrelerin antikorlarla işaretlemesi için belirlenen hücre yüzey belirteçlerine özel -FITC konjuge CD326+ ve CD133+ monoklonal antikorları ile ve uygun izotip kontrolleri yapılmıştır. Buna göre, CD326+ ve CD133+ yüksek düzeyde görülmüştür. CD326 ve CD133 antikorları ile ileri karakterizasyon yapılmış ve %99 oranında verimli bir sonuç elde edilmiştir.



Şekil 4.3. A549 hücre hattından izole edilen CD326+/CD133+ AKKH'nin karakterizasyonunun akış sitometrik olarak analizi.

CD326+/CD133+ AKKH sferik olarak kültüre edilmiştir. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi hücreler sferik kültür olarak üretilmiştir. Ardından hücreler monolayer olarak kültüre edilerek deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir.



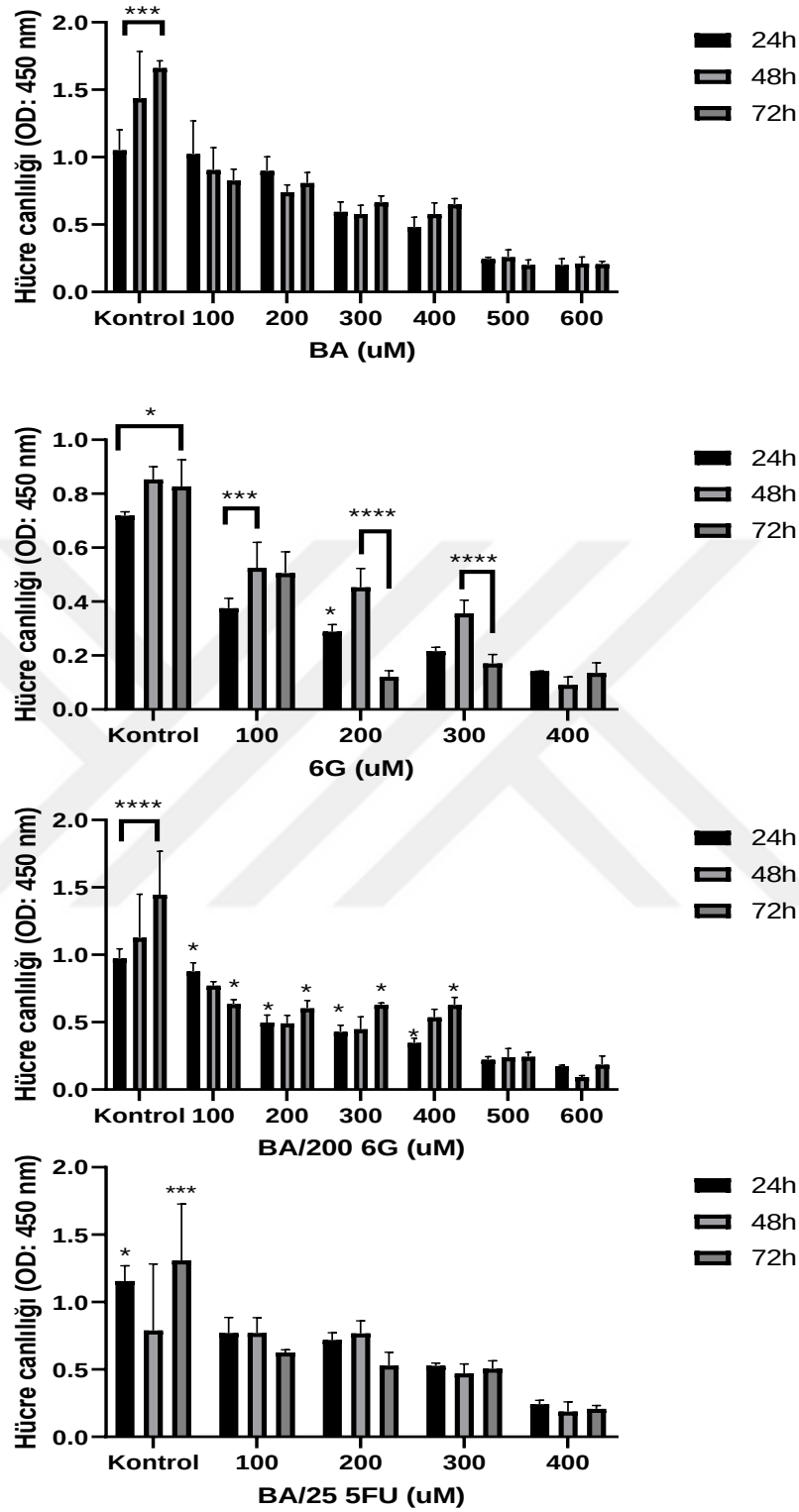
Şekil 4.4. A549 hücre hattından izole edilen CD326+/CD133+ AKKH sferik kültürünün invert mikroskop altında görüntüsü.

Lin vd. (2012) akciğer kanser kök hücre profillerinin belirlenmesine yönelik akış sitometrisini kullanarak yapmış olduğu çalışmalarda, zenginleştirilmiş hücrelerin yüksek oranda CD133+/CD326+ eksprese ettiğini, farklılaşma kapasitelerine, daha güçlü tümörijeniz, kök hücre ile ilişkili genlerin daha yüksek ekspresyonuna sahip olduğunu belirlemiştir. Bu alt popülasyonun ilkin tümör örneklerinde bulunup bulunmadığını doğrulamak için, CD133+/CD326+ hücrelerinin tümör kütlelerinde birlikte lokalize olduğunu tespit eden taze tümör örnekler üzerinde immüno Floresan yöntem kullanarak sonuçları doğrulamıştır.

4.2.Sitotoksik Etkinin WST-1 Testi ile Mitokondriyel Aktivite Yoluyla Belirlenmesi

BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığına etkisi farklı konsantrasyonlarda WST-1 tetrazolyum tuzu kullanılarak hücre gruplarında araştırılmıştır (Şekil 4. 5-8). Her bir konsantrasyon en az 4 kuyucuktaki hücrelerden elde edilen verilerin ortalama absorbans değerini göstermektedir. Buna göre, test maddelerinin muamelesi sonucunda hücre canlılığının zamana ve doza bağlı olarak azaldığı tüm hücre gruplarında görülmektedir (Şekil 4.5-9). BA/6G kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerin canlılığının düşük konsantrasyonlardan başlayarak kayda değer bir şekilde gerçekleştiği kaydedilmiştir.

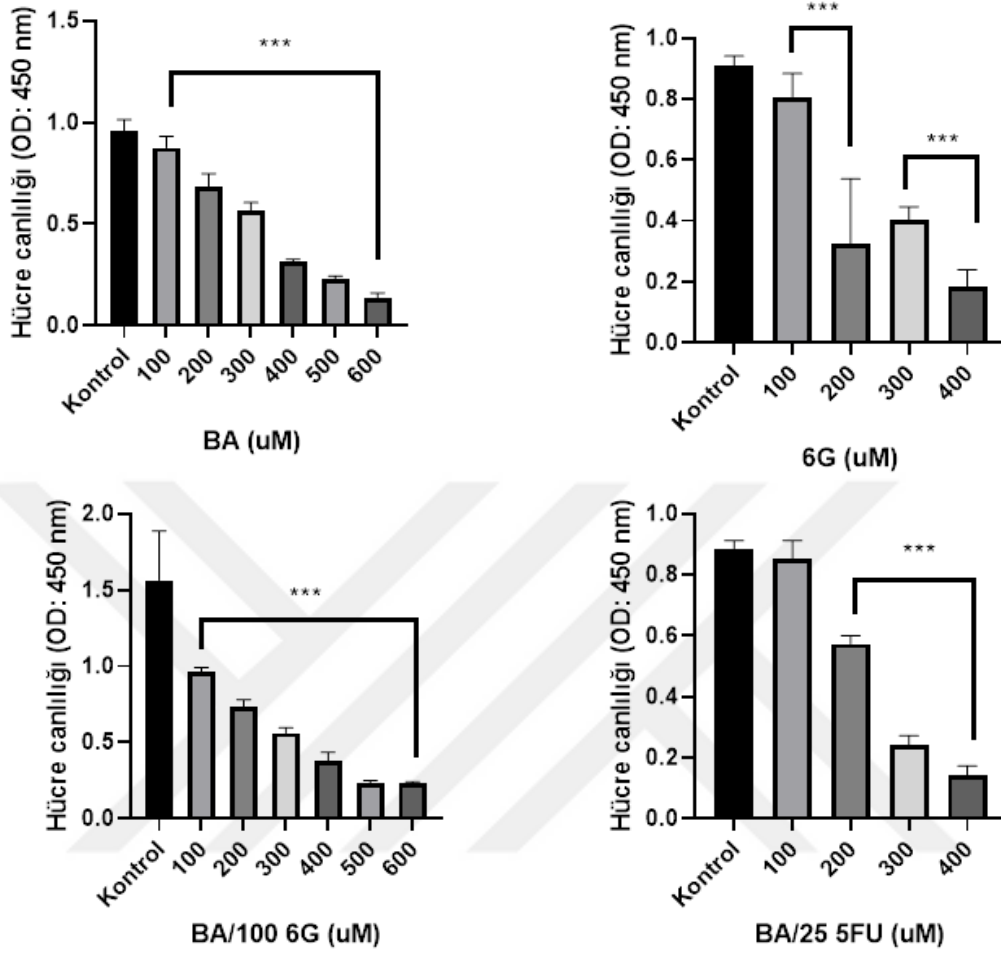
MKKH ve MCF-7 hücrelerinde 200 µM dozla birlikte test maddelerinin kayda değer etkisi ortaya konulmuştur (Şekil 4. 5-6). MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı olarak da test maddelerinin etkisinin arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.5). A549 hücrelerinde de benzer şekilde düşük konsantrasyonlarda test maddelerinin etkisi görülmektedir. AKKH hücrelerinin ise test maddelerine daha dirençli olduğu ve ortalama 300 µM dozla birlikte kayda değer etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.8). BA/200 µM 6G kombinasyonunda tüm hücre gruplarında etkinin arttığı, MCF-7 ve A549 hücrelerinde zamana olarak da etkinin katlandığı gösterilmiştir (Şekil 4.5 ve 7). BEAS-2B hücrelerinde de 100 µM dozla birlikte maddelerin sitotoksik etkinin başladığı, doza ve zamana bağlı olarak da etkinin devam ettiği tüm hücre gruplarında ortaya konulmuştur (Şekil 4.9).



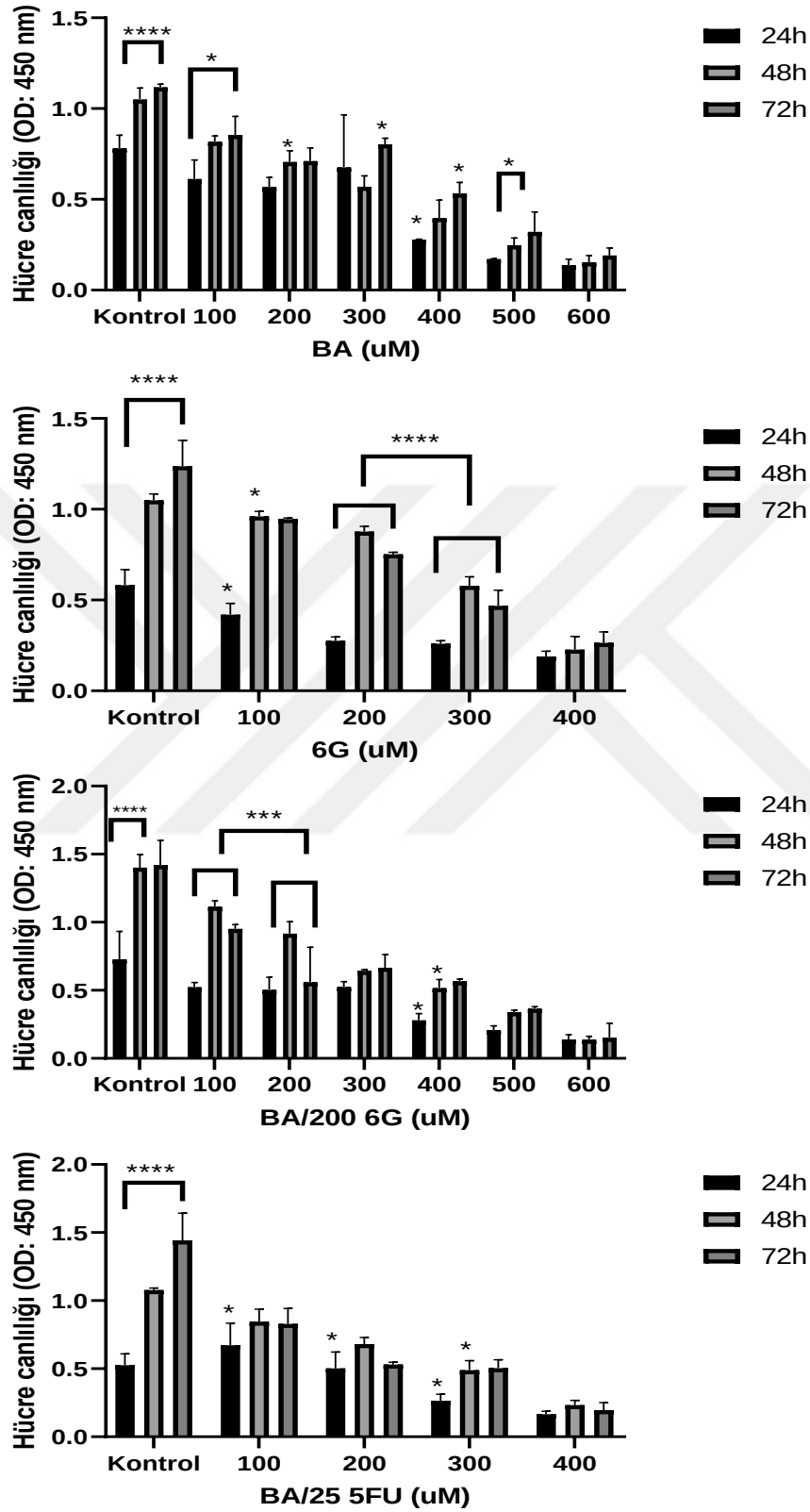
Şekil 4.5. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 testi ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$ ve (****) $p \leq 0.0001$ olarak değerlendirilmiştir.

Bulgularımıza benzer şekilde, BA'nın sitotoksik etkiye sahip olduğu son dönemde yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre, BA, HeLa, HT29, A549, MCF-7 ve FL (insan amniyon hücreleri) hücre hatlarında sitotoksik etkiye sahiptir (Karan vd., 2018). Buriani vd. (2017) yapmış olduğu bir çalışmada Pistacia türlerinden elde edilen uçucu yağların insan tümör hücre dizileri üzerindeki sitotoksik aktivitesi gösterilmiştir. Bu türlerin etken maddelerinden biri olan BA'nın sitotoksik etkiye sahip olduğu insan adenokarsinoma hücre hatlarında gösterilmiştir.

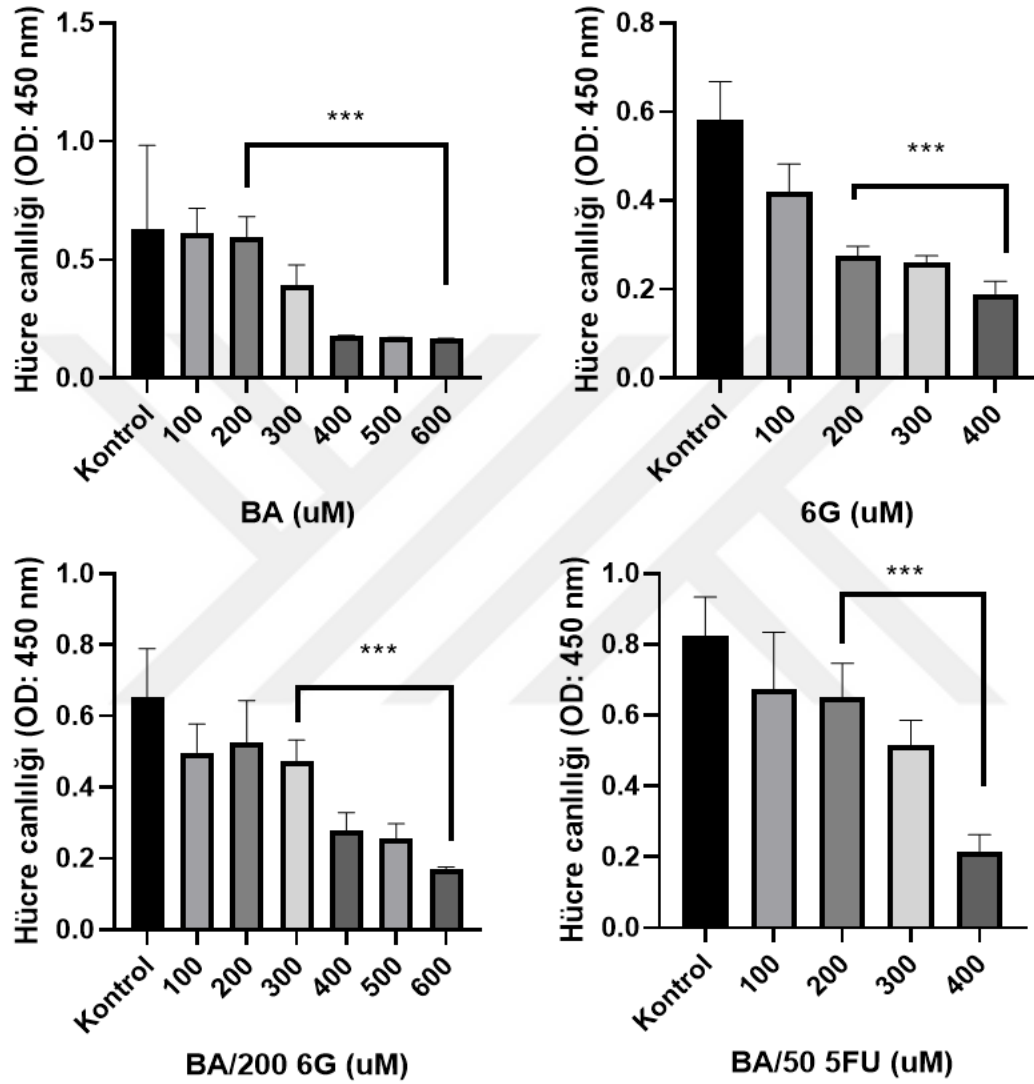
6-gingerolün meme ve akciğer kanseri dahil olmak üzere farklı kanser tiplerinde sitotoksik ve apoptotik aktiviteyle birlikte antikanser etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Wala vd., 2022; Kim vd., 2022; Belachew vd., 2021; Nipin vd., 2021; Poltronieri vd., 2014). Son dönemde, Nipin vd. (2021), 6-gingerolün kanser hücreleri üzerindeki etkisini ortaya koymak için MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu 48 saat boyunca incelemiş ve 6-gingerol tarafından konsantrasyona bağlı hücre proliferasyon inhibisyonunu göstermiştir. Sonuçlarımıza paralel olarak, Kim vd. (2022), akciğer kanser hücre hatlarında 6G'nin sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bir diğer çalışmada da, A549 hücre hattında 6G'nin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ortaya konulmuştur (Tsai vd., 2020).



Şekil 4.6. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 testi ile değerlendirilmesi. (***) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$ ve (****) $p \leq 0.0001$ olarak değerlendirilmiştir.



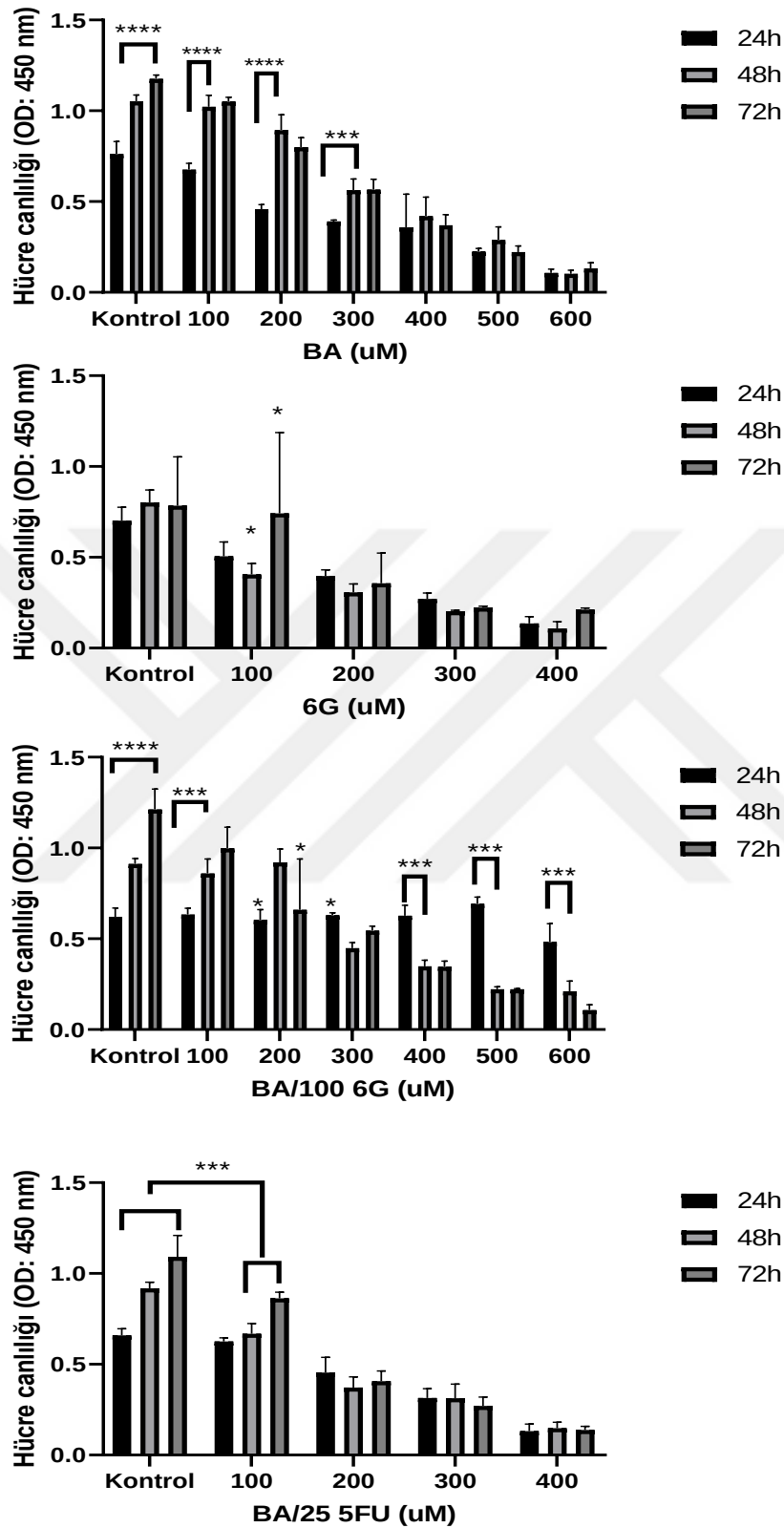
Şekil 4.7. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 testi ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$ ve (****) $p \leq 0.0001$ olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.8. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 testi ile değerlendirilmesi. (***) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$ ve (****) $p \leq 0.0001$ olarak değerlendirilmiştir.

6G'nin in vitro ve in vivo olarak çeşitli kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri hakkında çok sayıda araştırma yer almaktadır. İnsan promiyelositik lösemi (HL-60) hücre büyümesi üzerinde doza bağlı bloke edici etkiler gösterdiği bulgulanmıştır. 6G büyük akciğer kanseri hücre dizisine (COR-L23), rahim ağzı kanseri hücre dizisine (Hela) ve insan hepatoma G2 hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermiştir. Ek olarak, 6-gingerol insan akciğer kanseri hücrelerinde (H-1299), fare akciğer kanseri hücrelerinde (CL-13), insan kolon kanseri hücrelerinde (HCT-116 ve HT-29) ve farelerde yaygın olarak metabolize edildiği gösterilmiştir (Belachew vd. 2021 tarafından derlenmiştir).

Bu sonuçlara göre, MCF-7 hücreleri için yaklaşık olarak BA için 400 μ M, 6G için 200 μ M, BA/6G için 200/200 μ M ve BA/5-FU için 200/25 μ M dozları yaklaşık IC₅₀ değeri olarak belirlenmiş ve bu dozlar ile araştırmaya devam edilmesine karar verilmiştir. MKKH için yaklaşık olarak IC₅₀ değerleri BA için 300 μ M, 6G için 200 μ M, BA/6G için 100/100 μ M ve BA/5-FU için 200/25 μ M dozları olarak belirlenmiştir. A549 hücreleri için BA için 300 μ M, 6G için 200 μ M, BA/6G için 200/200 μ M ve BA/5-FU için 200/25 μ M dozları IC₅₀ değeri olarak seçilmiştir. AKKH hücreleri için BA için 450 μ M, 6G için 300 μ M, BA/6G için 200/200 μ M ve BA/5-FU için 200/50 μ M dozları belirlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ise BA için 300 μ M, 6G için 200 μ M, BA/6G için 200/100 μ M ve BA/5FU için 200/25 μ M olarak IC₅₀ değeri belirlenmiştir.

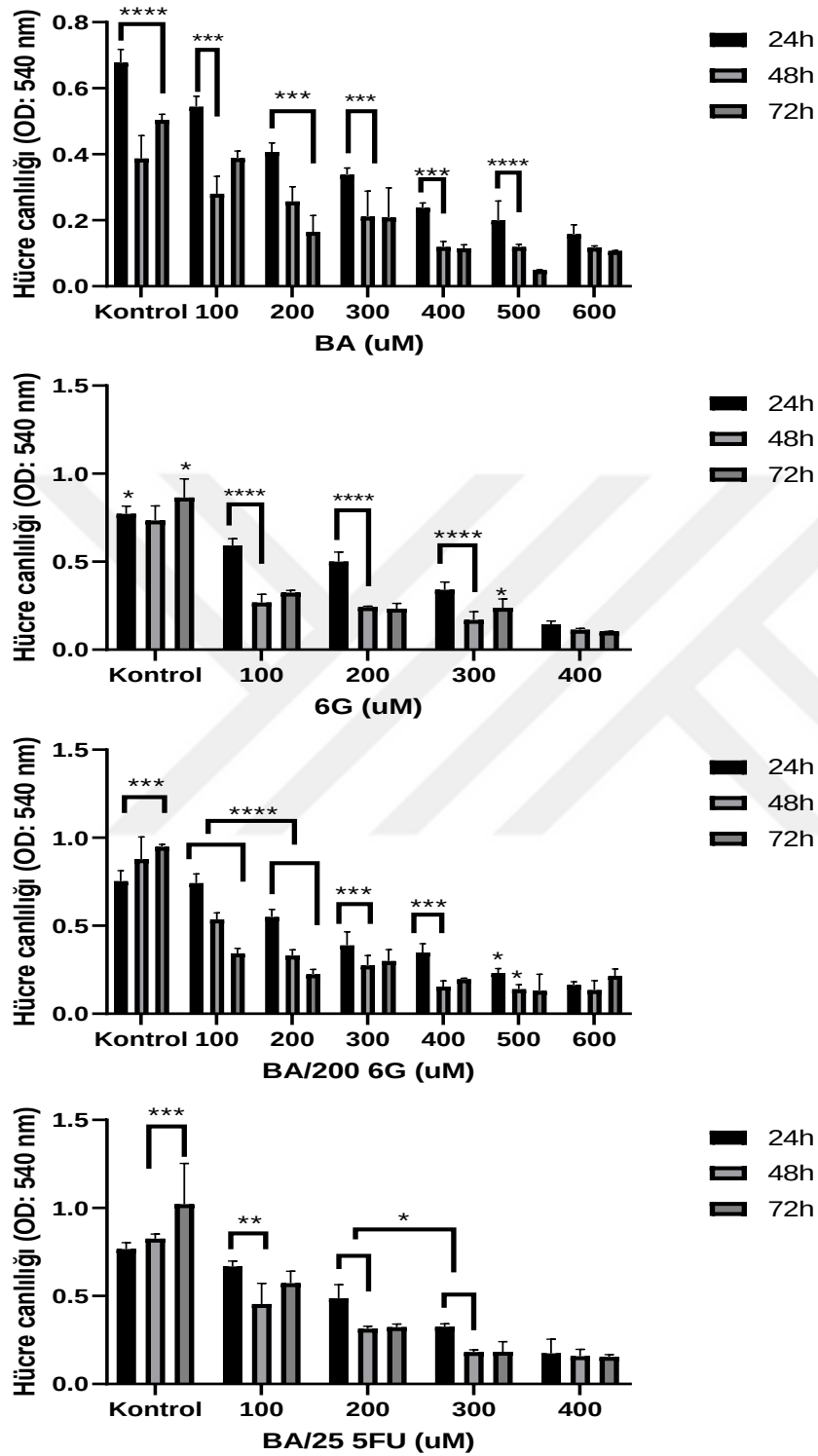


Şekil 4.9. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA hücre canlılığı üzerine etkisinin WST-1 testi ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ ve (****) $p \leq 0,0001$ olarak değerlendirilmiştir.

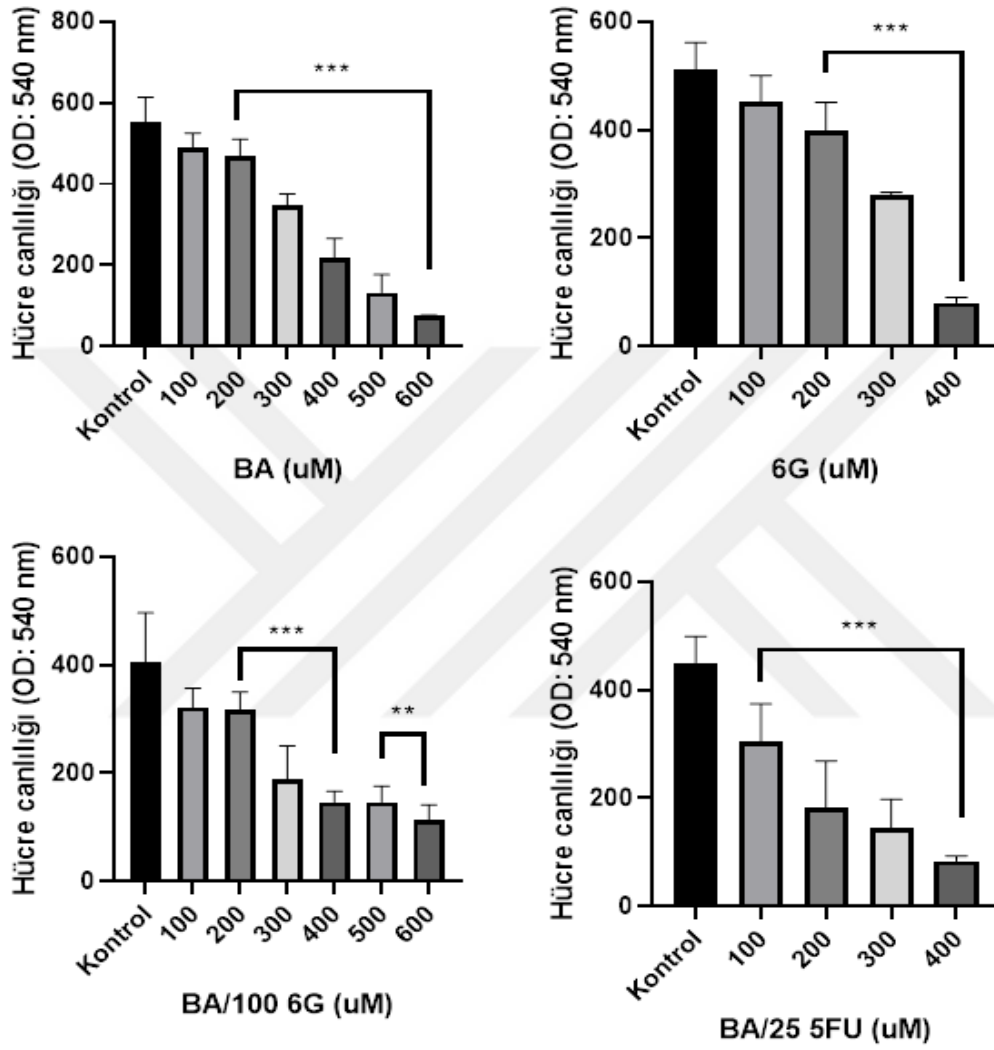
4.3.Sitotoksik Etkinin Nötral Kırmızısı Analizi ile Lizozomal Aktivite Yoluyla Belirlenmesi

BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre grupları üzerindeki sitotoksik etkisi nötral kırmızısı testi ile de doza ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır (Şekil 4.9-12). Doza ve zamana bağlı olarak da sitotoksik etkinin devam ettiği ve en yüksek dozla birlikte hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı ortaya konulmuştur. Nötral kırmızısı alımı ile de maddelerin sitotoksik etkiye sahip olduğu ve 48 ile 72 saat inkübasyon süresi sonunda da artan dozla birlikte korelatif olarak azaldığı belirlenmiştir. Sonuçlarımıza paralel olarak, Karan vd. (2018) BA'nın sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Lima vd. (2018), meme ve akciğer kanseri dahil olmak üzere farklı kanser tiplerinde 6G'nin sitotoksik ve apoptotik aktiviteyle birlikte antikanser etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Son yıllarda, tek başına veya yaygın olarak kullanılan terapi ile kombinasyon halinde, kemoterapinin olumsuz etkileri riskini azaltabilen ve aynı zamanda kanser önleyici etkilerini artırabilen doğal kaynaklı ajanlara çok dikkat edilmiştir. Bu amaçla, 6G kullanılmaktadır. 6G, zencefilde bulunan fenolik bir fitokimyasaldır ve farmakolojik olarak en aktif bileşiklerinden biridir. Çok sayıda çalışma, 6G'nin sitotoksik etkisinin yanı sıra antioksidan, antienflamatuar, antiplatelet, antimikrobiyal (Covid-19 gibi virüsler dahil) ve antikanser özellikleri sergilediğini göstermiştir (Wala vd., 2022; Belachew vd.,2021; Nipin vd., 2021).

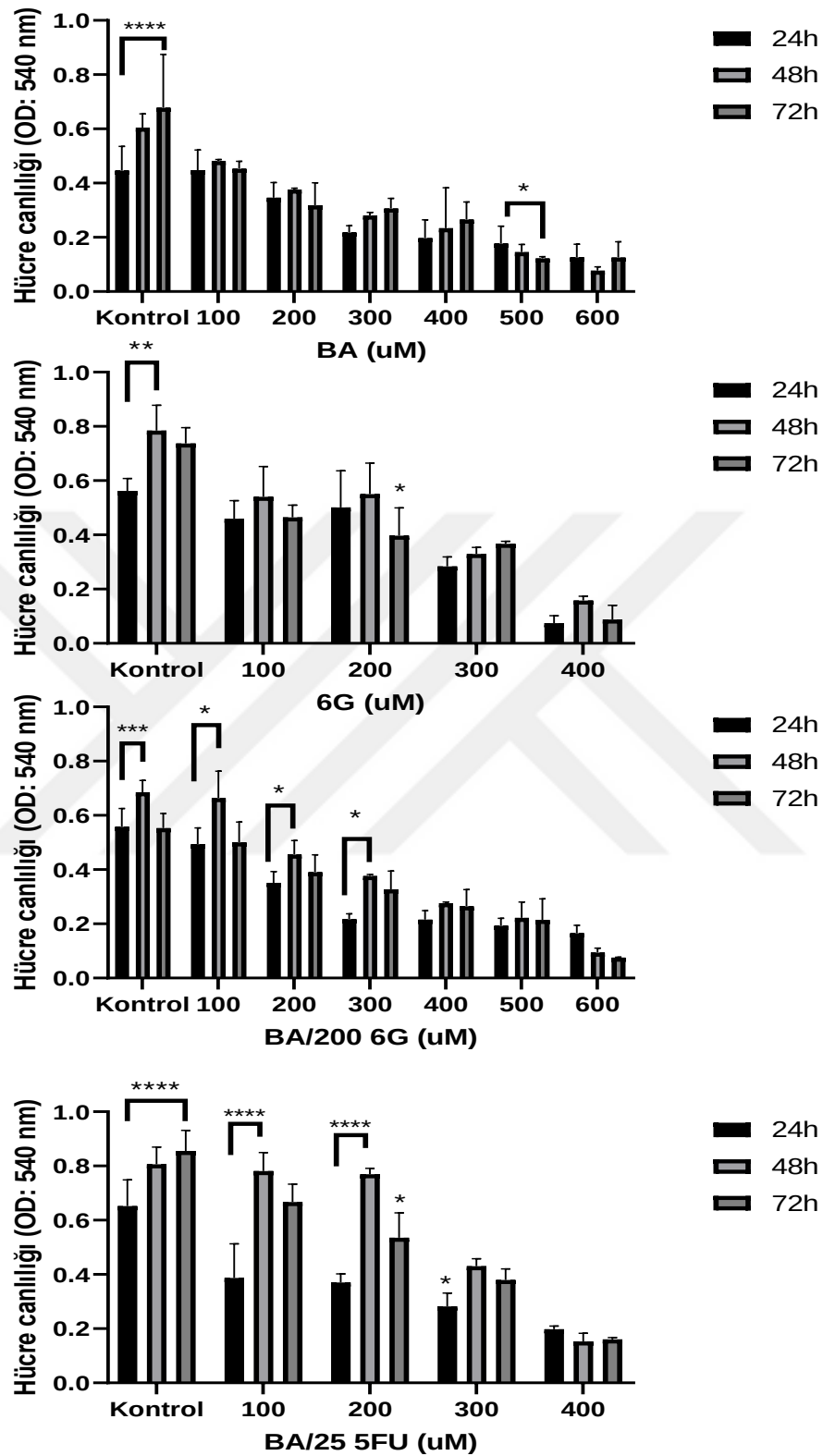
İki maddenin kombinatif etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Ancak son dönemde yapılan çalışmalar, 6G'nin farklı doğal aktif bileşenlerle ve kemoterapötiklerle birlikte preventif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Cispatin, 5-FU, paklitaksel, wortmannin ve rapamycin gibi ilaçlarla ve quersetin, shogaol ve kurkumin gibi doğal aktif bileşenlerle olan sinerjik etkisi de gösterilmiştir (Zhang vd., 2017; Shao vd., 2016). Ayrıca, 6G ve aspirin sentezlenerek pro-ilaç olarak kullanılmış ve gastropreventif olup antikanser aktiviteye sahip olduğu in vivo olarak gösterilmiştir (Zhu vd., 2017). Ayrıca, 6G sıklıkla maruz kaldığımız dokuz nihai kimyasal kanserojenin doğal bir temizleyicisi olarak incelenmiştir; glisidamit (akrilamidin nihai kanserojeni), stiren oksit, aflatoksin B1 ekso-8,9-epoksit, β -propiolakton, etilen oksit, propilen oksit, 2-siyanoetilen oksit, kloroetilen oksit ve vinil karbamat epoksit. Buna göre, 6G'nin antikanserojenik özelliklerinin yanı sıra yeni kemoprofilaktik diyet takviyelerinin geliştirilmesi için deneysel ve klinik çalışmalar için sağlam bir temel oluşturduğu ortaya konulmuştur (Furlan ve Bren, 2020).



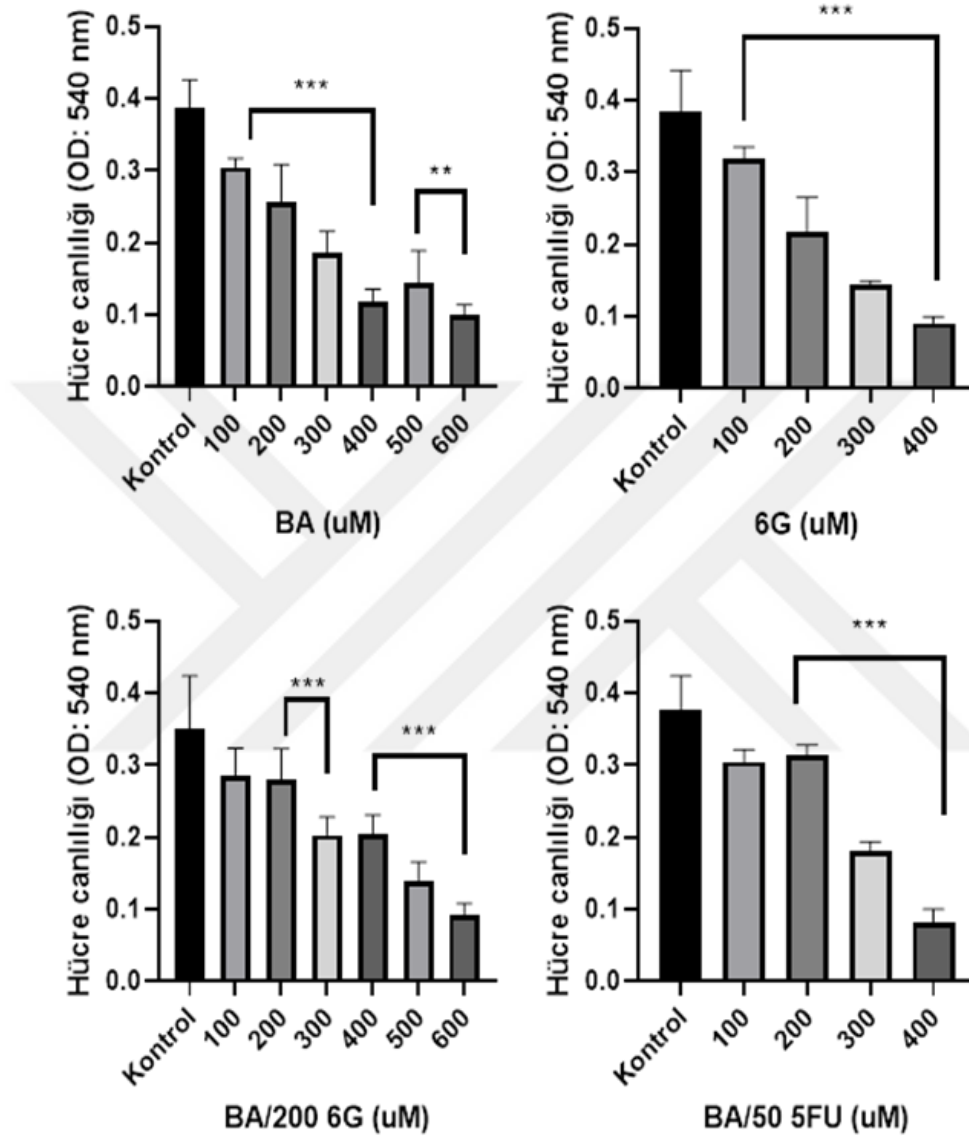
Şekil 4.10. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin Nötral kırmızısı alımı ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ ve (****) $p \leq 0,0001$ olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.11. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin Nötral kırmızısı alımı ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ ve (****) $p \leq 0,0001$ olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.12. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin Nötral kırmızısı alımı ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0.01$, (***) $p \leq 0.001$ ve (****) $p \leq 0.0001$ olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.13. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G ve 5-FU/BA'nın hücre canlılığı üzerine etkisinin Nötral kırmızısı alımı ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ ve (****) $p \leq 0,0001$ olarak değerlendirilmiştir.

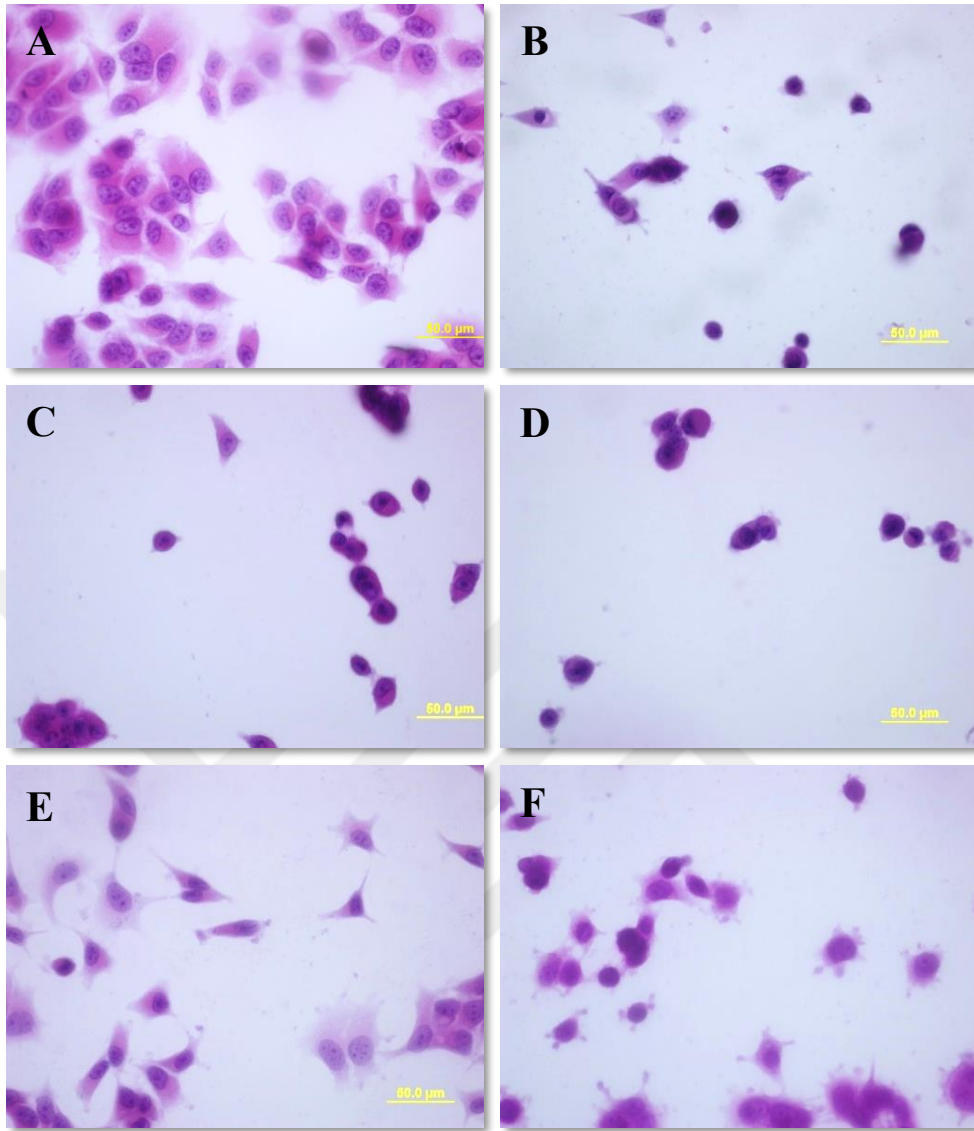
4.4.Hücre Morfolojisinin H&E Boyama ile İncelenmesi

H&E boyama yöntemi ile BA, 6G, BA/6G, 5FU/BA ve 5FU'nun hücre morfolojisi üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Şekil 4.13-17). Tüm hücre gruplarında kontrol hücreleri normal bir sitoplazmaya ve çekirdeğe sahiptir (Şekil 4. 13A, 14A, 15A ve 16A). Test

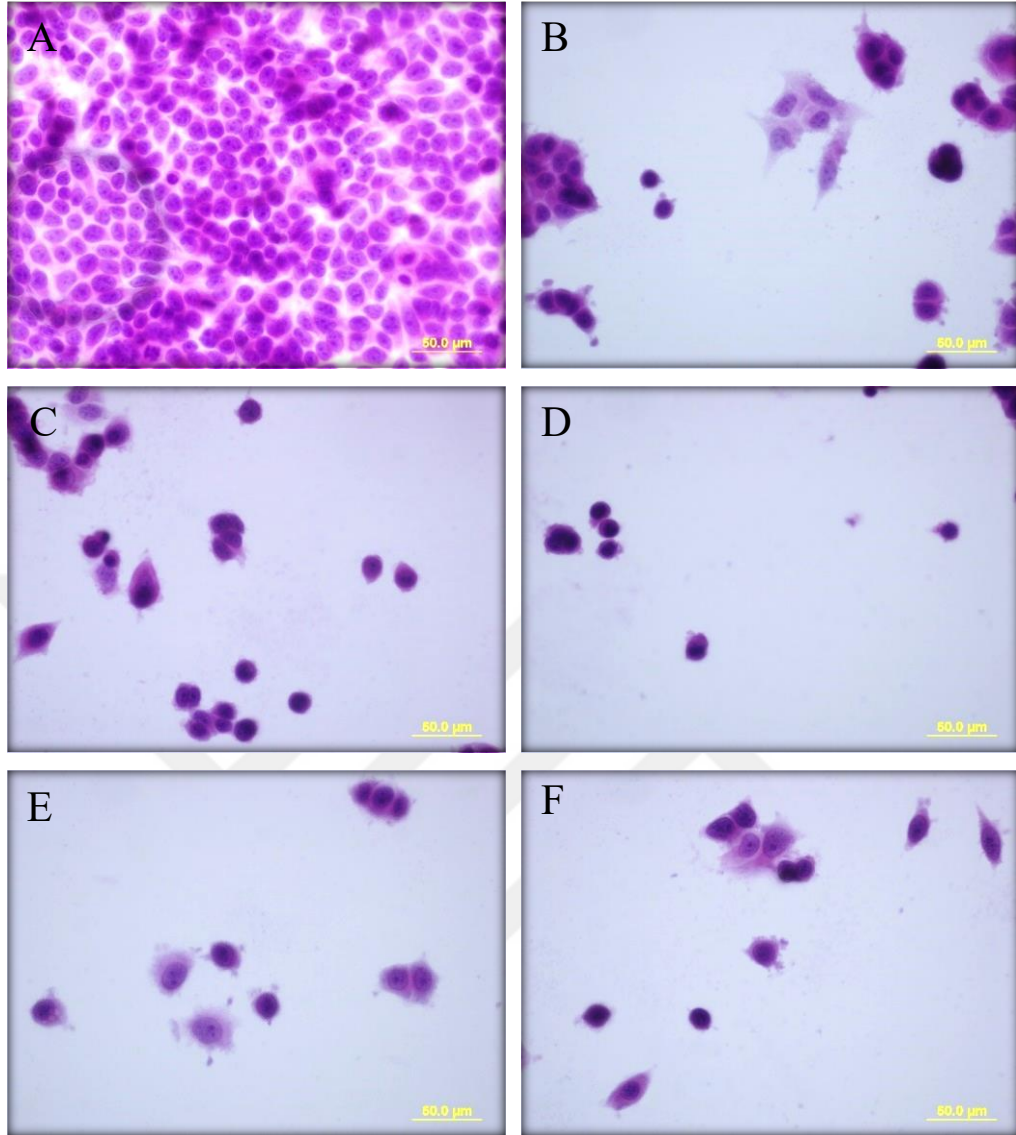
maddelerine maruz kalan hücrelerin morfolojisinde ise kayda değer değişiklikler meydana gelmiştir (Şekil 4.13B-F, 14B-F, 15B-F, 16B-F).

Buna göre, BA, 6G ve BA/6G kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerde apoptotik blebbing ile birlikte nükleer kondensasyon yoğun olarak görülmüştür. Ayrıca, test maddesi ile hücrelerin muamelesi sonucunda kontrol gruptaki hücrelere kıyasla hücre sayısında önemli ölçüde düşüş olduğu meydana gelmiştir. MKKH ve MCF-7 hücrelerinde (Şekil 4.13 ve 14) benzer morfolojik değişiklikler görülmekle birlikte hücresel büzülme, apoptotik blebbing ve nükleer kondensasyon A549 ve AKKH hücrelerine oranla daha yoğun şekilde gözlemlenmiştir. AKKH ve A549 hücrelerinde (Şekil 4.15 ve 16) ise özellikle BA ile muamele sonrasında hücrelerde uzama, nükleer kondensasyona oranla daha yoğun olarak görülmüştür. Aynı zamanda sağlıklı akciğer hücresi olan BEAS-2B hücreleri (Şekil 4.17) üzerinde BA test maddesinin benzer bir etkiye sahip olduğu ve nükleer kondensasyon gibi etkilerin daha az görüldüğü ortaya konulmuştur. Pozitif kontrol maddesi olarak 5-FU ve 5FU/BA ile tedavi edilen hücrelerde de benzer karakteristikler gözlemlenirken, farklı olarak özellikle AKKH ve A549 hücrelerinde büyük oranda hücre sitoplazması ve membran yapısındaki değişiklikler görülmektedir (Şekil 4.15 ve 16E-F).

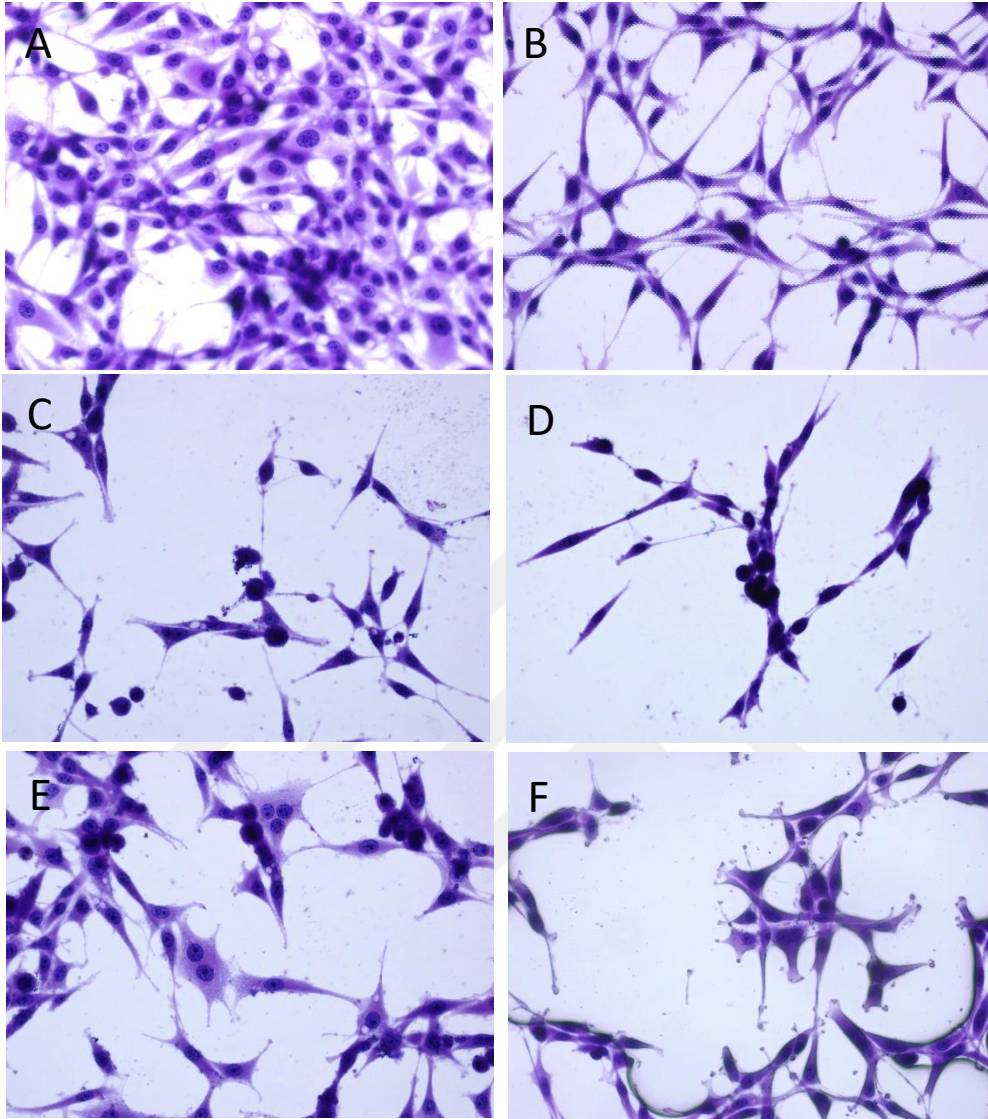
Karan vd. (2018) gerçekleştirmiş olduğu bir araştırma, MCF-7 ve A549 hücrelerinin de yer aldığı farklı hücre hatlarında BA'nın etkisi invert mikroskop ile görüntülenmiştir. BA'nın 50 ug/mL dozunda hücrelerin morfolojisinde önemli ölçüde değişikliklere sebep olduğu ve HeLa ile HT29 hücrelerinde hücresel uzama gibi morfolojik değişimlerin olduğu bu çalışmada da görülmektedir. 6G ve 5FU'nun apoptotik etkiyi gösteren morfolojik karakteristikleri ortaya koyan birçok çalışma bulunmaktadır (Nipin vd., 2021; Baliga vd., 2011; Poltronieri vd., 2014; Lima vd., 2018'de derlenmiştir). Akciğer kanser hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmaya göre de ters faz kontrast mikroskobu kullanarak 6-gingerol ile tedavi edilen hücrelerin morfolojisinde çok sayıda değişiklik gözlemlenmiştir. 6G tedavisi, kontrol hücrelerinin morfolojisine kıyasla morfolojik değişikliklere neden olmuş ve akciğer kanserli hücrelerde ciddi şekilde morfolojik deformasyona sebep olmuştur. Hücre hacminde bir azalma ve plazma zarında da kararsızlaşma olduğu tespit edilmiştir (Kim vd., 2022). Bu çalışmalarla ortaya konulan sonuçlar bulgularımızı desteklemektedir.



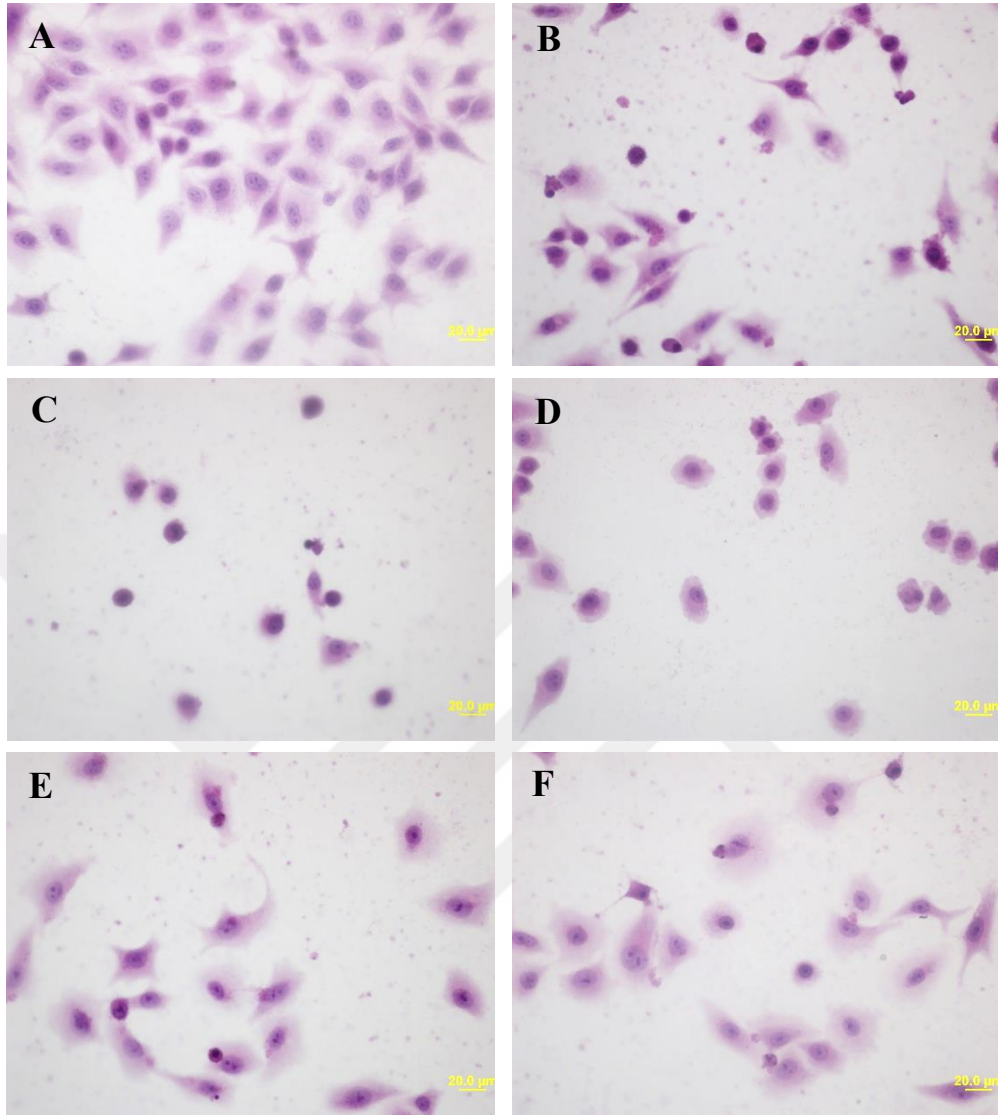
Şekil 4.14. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki morfolojik etkisinin H&E boyaması ile gösterilmesi. A: Kontrol, B: 400 μ M BA, C: 200 μ M 6G, D: 200 μ M 6G/200 μ M BA E: 25 μ M 5-FU/ 200 μ M BA, F: 25 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



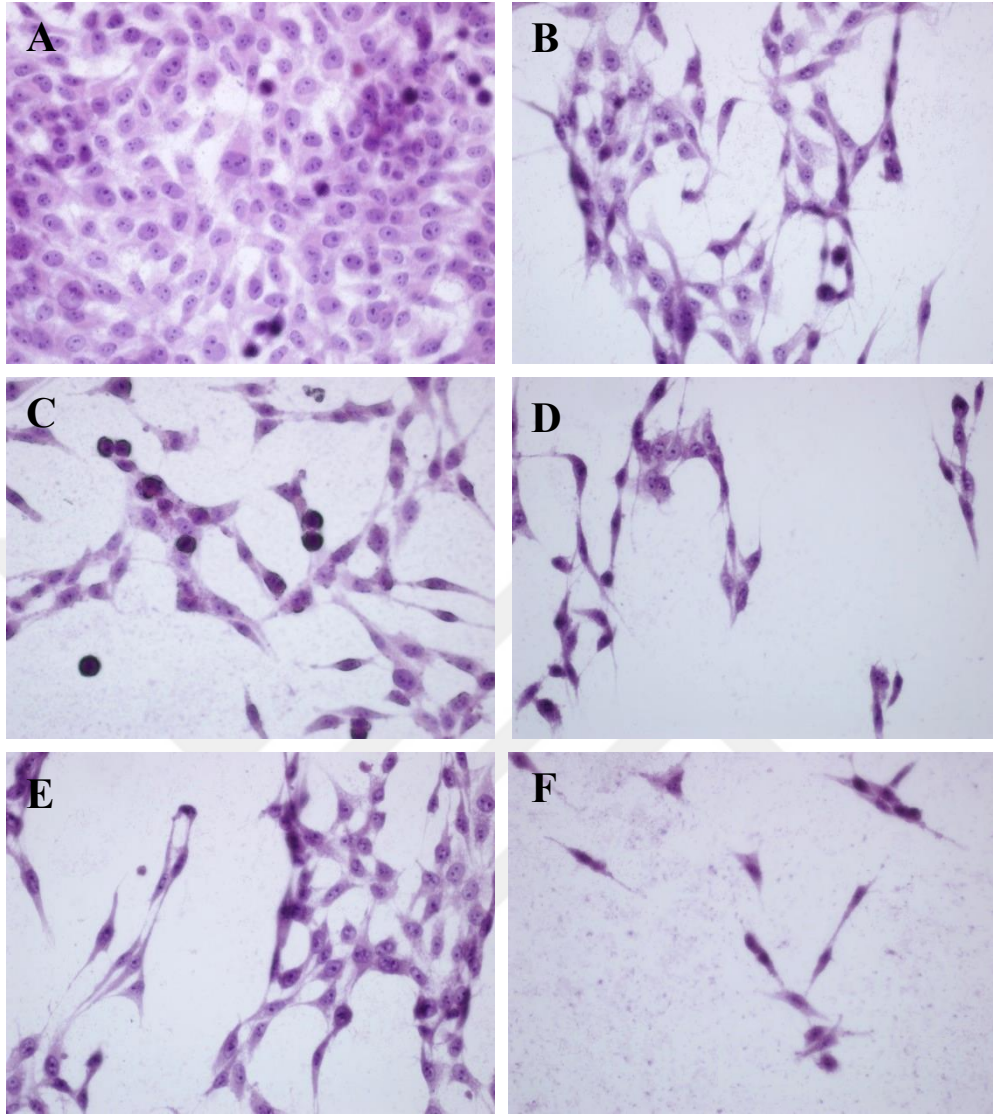
Şekil 4.15. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki morfolojik etkisinin H&E boyaması ile gösterilmesi. A: Kontrol, B: 200 μ M BA, C: 100 μ M 6G, D: 100 μ M 6G/100 μ M BA E: 25 μ M 5-FU/ 100 μ M BA, F: 25 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



Şekil 4.16. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki morfolojik etkisinin H&E boyaması ile gösterilmesi. A: Kontrol, B: 300 µM BA, C: 200 µM 6G, D: 200 µM 6G/200 µM BA E: 25 µM 5-FU/ 200 µM BA, F: 25 µM 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



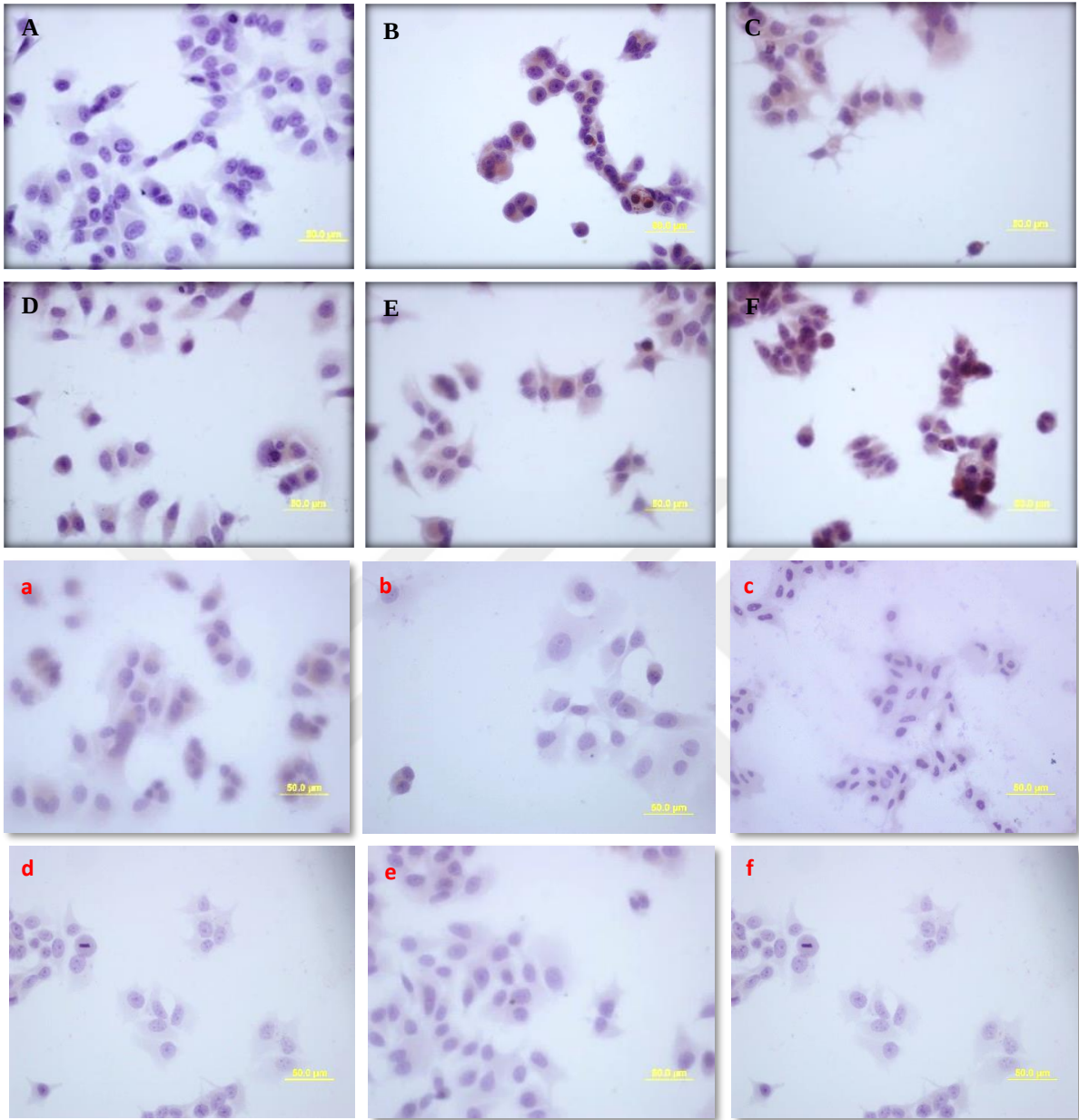
Şekil 4.17. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki morfolojik etkisinin H&E boyaması ile gösterilmesi. A: Kontrol, B: 450 μ M BA, C: 300 μ M 6G, D: 200 μ M 6G/200 μ M BA E: 50 μ M 5-FU/ 200 μ M BA, F: 50 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



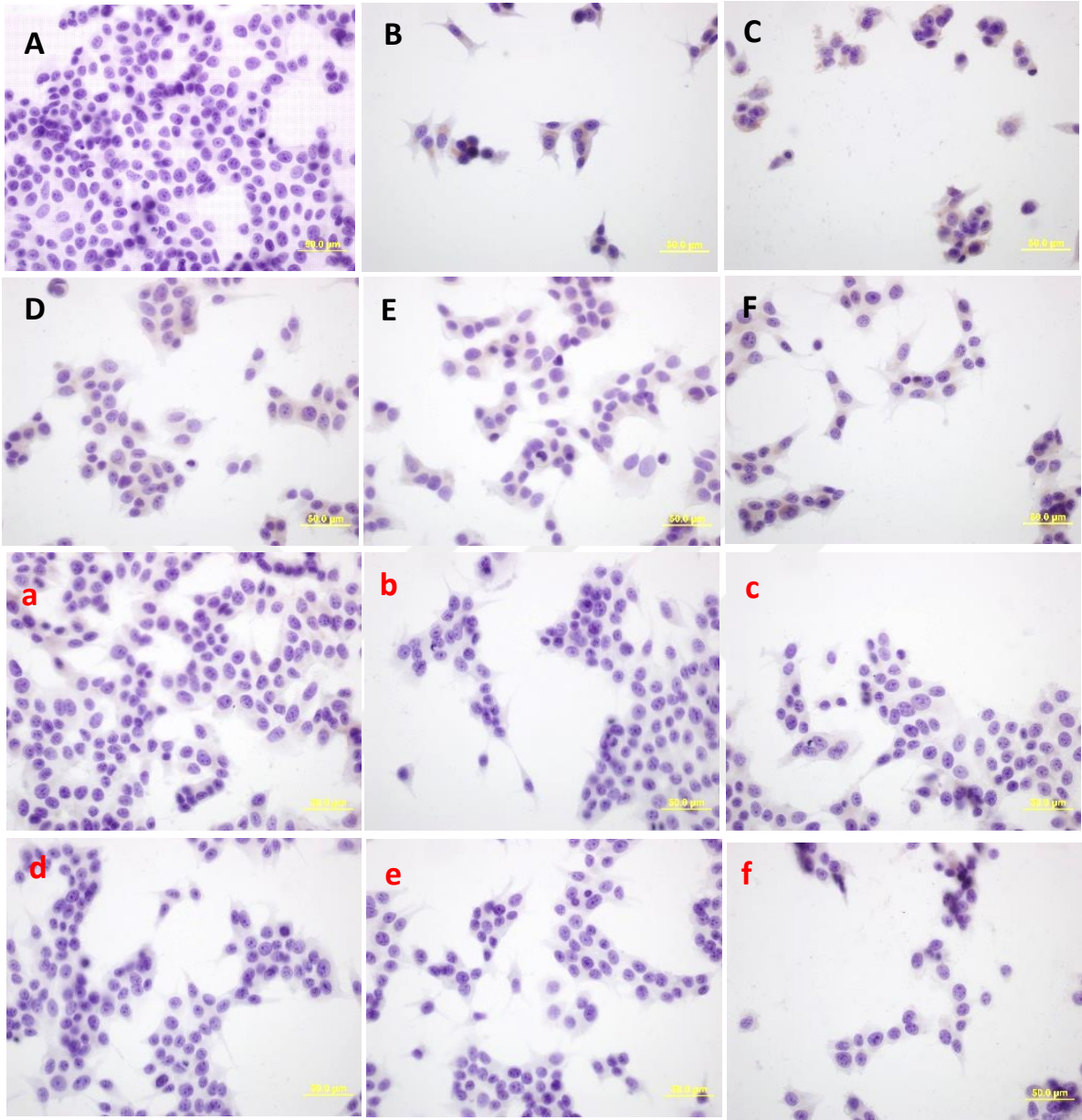
Şekil 4.18. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki morfolojik etkisinin H&E boyaması ile gösterilmesi. A: Kontrol, B: 300 µM BA, C: 200 µM 6G, D: 100 µM 6G/200 µM BA E: 25 µM 5-FU/ 200 µM BA, F: 25 µM 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).

4.5. Apoptotik Belirteçlerin İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

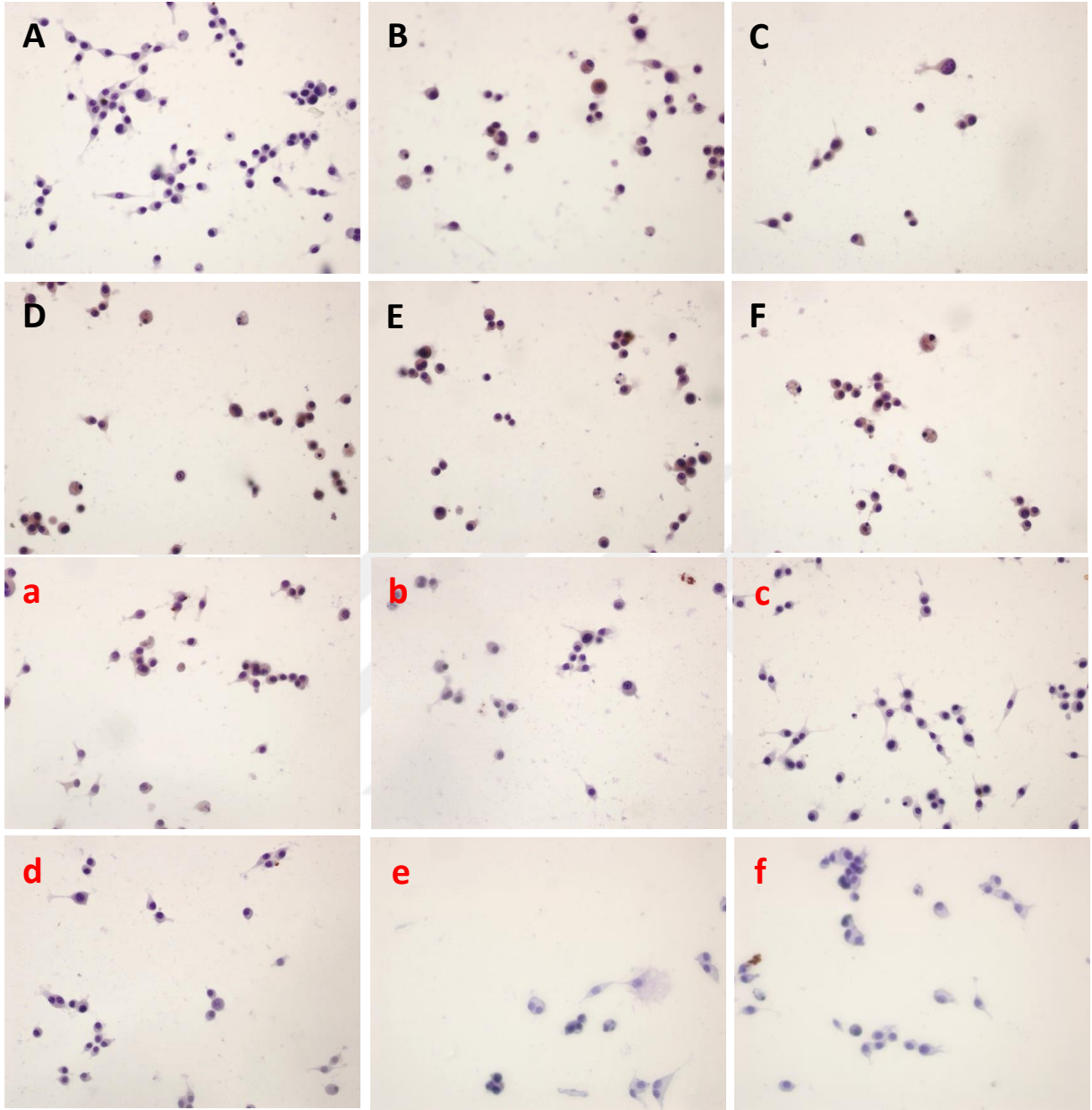
BA, 6G, BA/6G, 5FU/BA ve 5FU test maddelerinin hücre grupları üzerindeki apoptotik etkisi Bax (pro-apoptotik) ve Bcl-2 (Anti-apoptotik) protein ifadesindeki değişikliklere göre immünohistokimyasal olarak araştırılmıştır (Şekil 4.18-22).



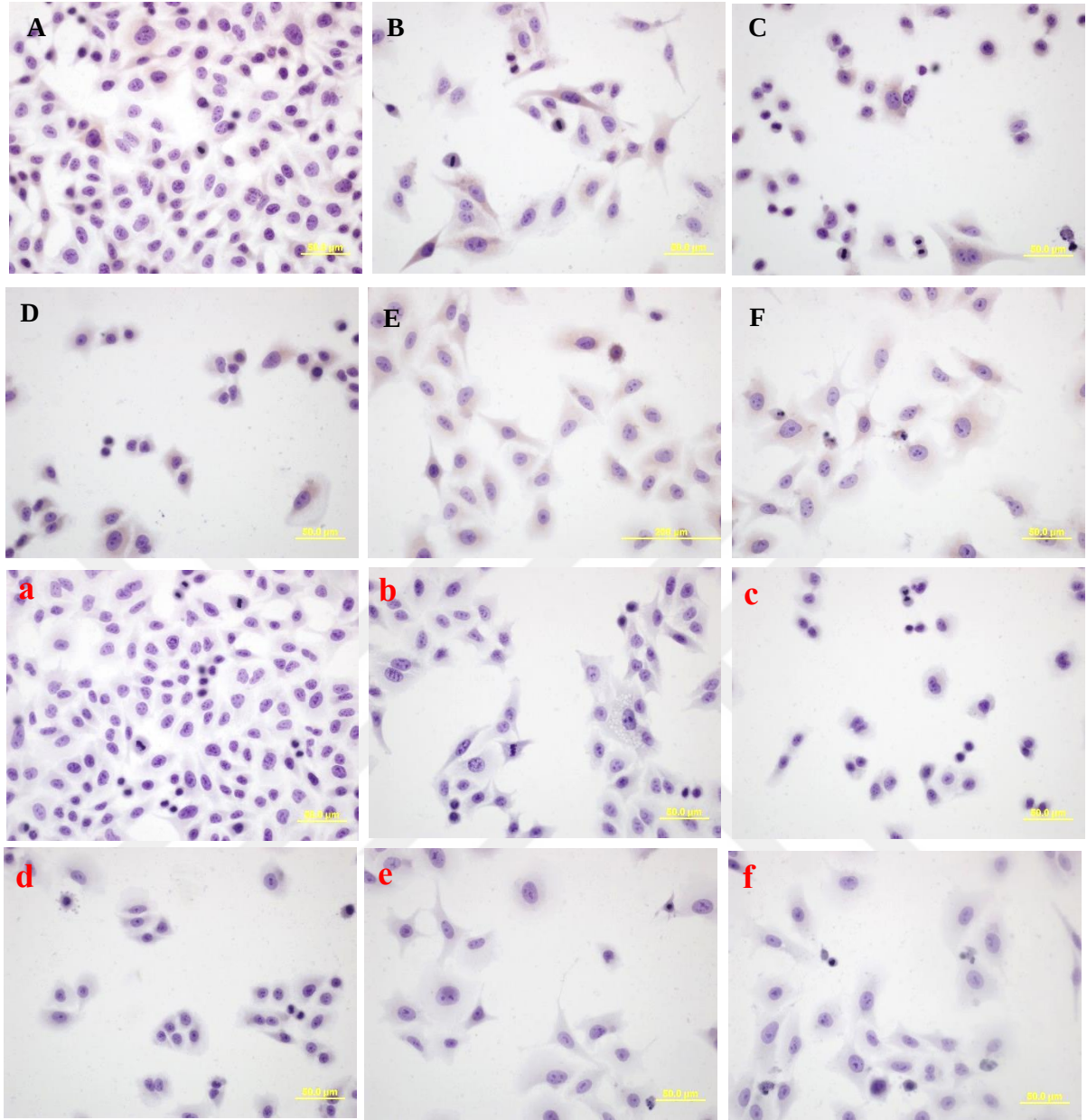
Şekil 4.19. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin Bax ve Bcl-2 belirtecini kullanarak immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi. A: Kontrol, B: 400 µM BA, C: 200 µM 6G, D: 200 µM 6G/200 µM BA E: 25 µM 5-FU/ 200 µM BA, F: 25 µM 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



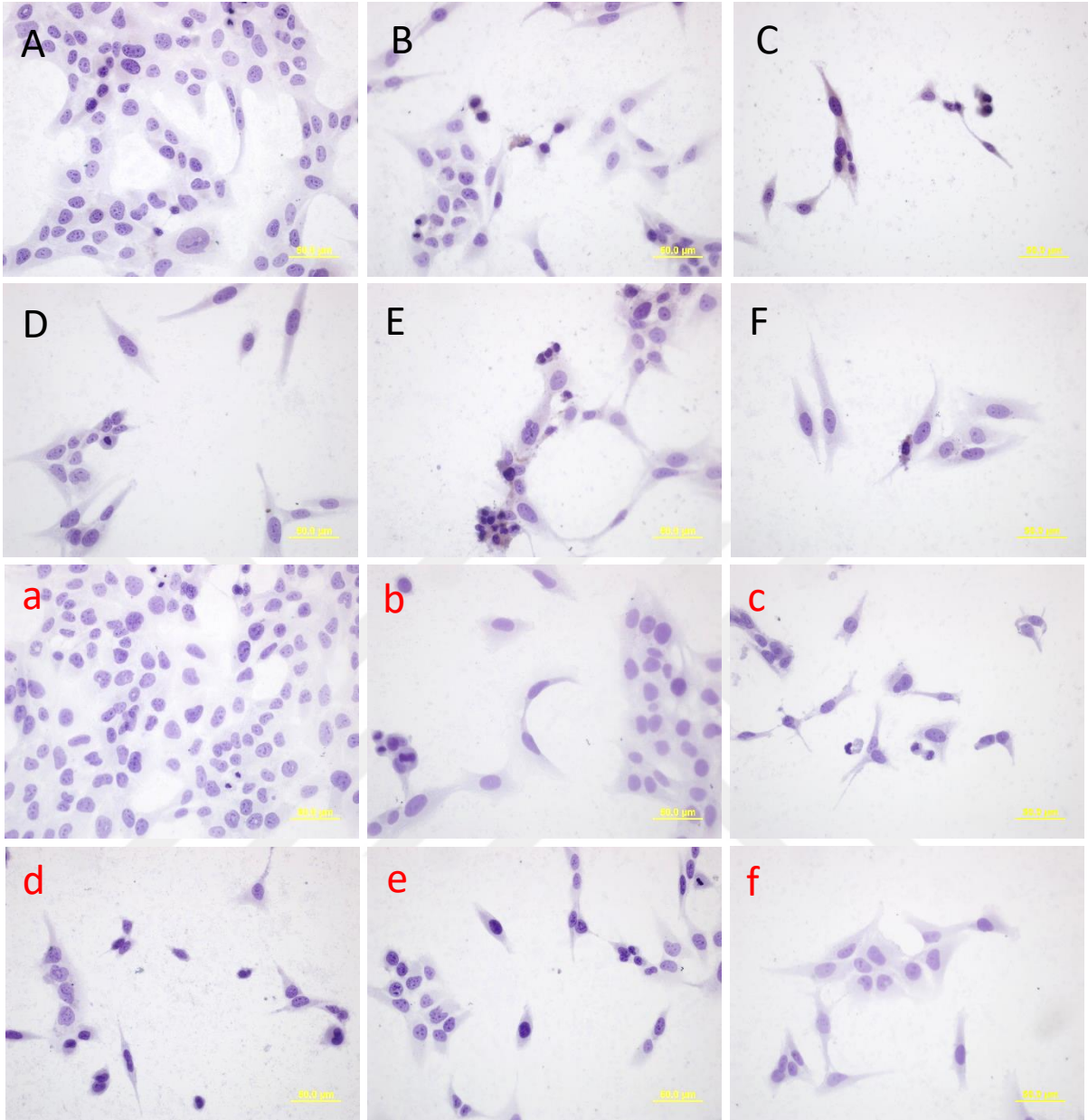
Şekil 4.20. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin Bax ve Bcl-2 belirtecini kullanarak immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi. A: Kontrol, B: 200 μ M BA, C: 100 μ M 6G, D: 100 μ M 6G/100 μ M BA E: 25 μ M 5-FU/ 100 μ M BA, F: 25 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



Şekil 4.21. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin Bax ve Bcl-2 belirtecini kullanarak immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi. A: Kontrol, B: 300 μ M BA, C: 200 μ M 6G, D: 200 μ M 6G/200 μ M BA E: 25 μ M 5-FU/ 200 μ M BA, F: 25 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



Şekil 4.22. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin Bax ve Bcl-2 belirtecini kullanarak immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi. A: Kontrol, B: 450 μ M BA, C: 300 μ M 6G, D: 200 μ M 6G/200 μ M BA E: 50 μ M 5-FU/ 200 μ M BA, F: 50 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



Şekil 4.23. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin Bax ve Bcl-2 belirtecini kullanarak immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirilmesi. A: Kontrol, B: 300 μ M BA, C: 200 μ M 6G, D: 100 μ M 6G/200 μ M BA E: 25 μ M 5-FU/ 200 μ M BA, F: 25 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).

Bu sonuçlara göre, test maddelerinin hücre grupları ile muamelesi sonrasında apoptotik belirteç proteini olan Bax ifadesinin kontrole (Şekil 4. 18 ve 22A) göre artarken, anti-apoptotik belirteç proteini olan Bcl-2 ifadesinin kontrole (Şekil 4. 18a ve 22a) göre azaldığı hücre sitoplazmasında görülmektedir. Bunun yanı sıra, pozitif kontrol olan 5-FU ile hücrelerin muamelesi ile de benzer sonuç ortaya konulmuştur (Şekil 4. 18 ve 22Ff). Tüm

test maddelerinde MKKH ve MCF-7 hücrelerinde Bax protein ifadesinin AKKH ve A549 hücrelerine oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, AKKH ve A549 hücrelerinde nükleer kondensasyon daha yoğun olarak görülmüş ve hücrenin büzülmesi sebebiyle hücre sitoplazmasının daha az olmasına dayalı olarak Bax proteinin ifadesi daha yoğun olarak gözlemlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ise Bax ve Bcl-2 proteinin ifadesi daha az görülmüştür.

6G'ün apoptotik ve sitotoksik etkisi birçok çalışma ile gösterilmiştir (Wala vd., 2022; Nipin vd., 2021; Belachew vd., 2021; Baliga vd., 2011; Poltronieri vd., 2014; Lima vd., 2018'de derlenmiştir). 6G intrinsik apoptozu indüklediğinden, apoptoz sırasında mitokondrinin rolü de ayrıca değerlendirilmiştir. MCF-7 hücrelerinin 6G ile muamelesi sonucu mitokondriyal membran potansiyelinin kaybıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu durumun Bax ifadesindeki bir artışa ve Bcl-2 ifadesindeki bir azalmaya bağlı olarak mitokondri zarındaki bütünlük kaybını gösterdiği ortaya konulmuştur. Bax'ın salınması ve Bcl-2'nin inhibisyonu, kaspaz 9 aktivasyonu yoluyla intrinsik apoptozu işaret ettiği sitokrom c'nin salınması ile mitokondriyal membranda gözeneklerin oluşturulduğu göstermiştir. MCF-7 hücrelerinde sitokrom c proteini seviyeleri, 6G tedavisinin ardından önemli ölçüde yükseldiği belirlenmiştir (Nipin vd., 2021). BA'nın immunositokimyasal yolla etkisi ilk defa bu çalışma kapsamında araştırılarak ortaya konulmuştur.

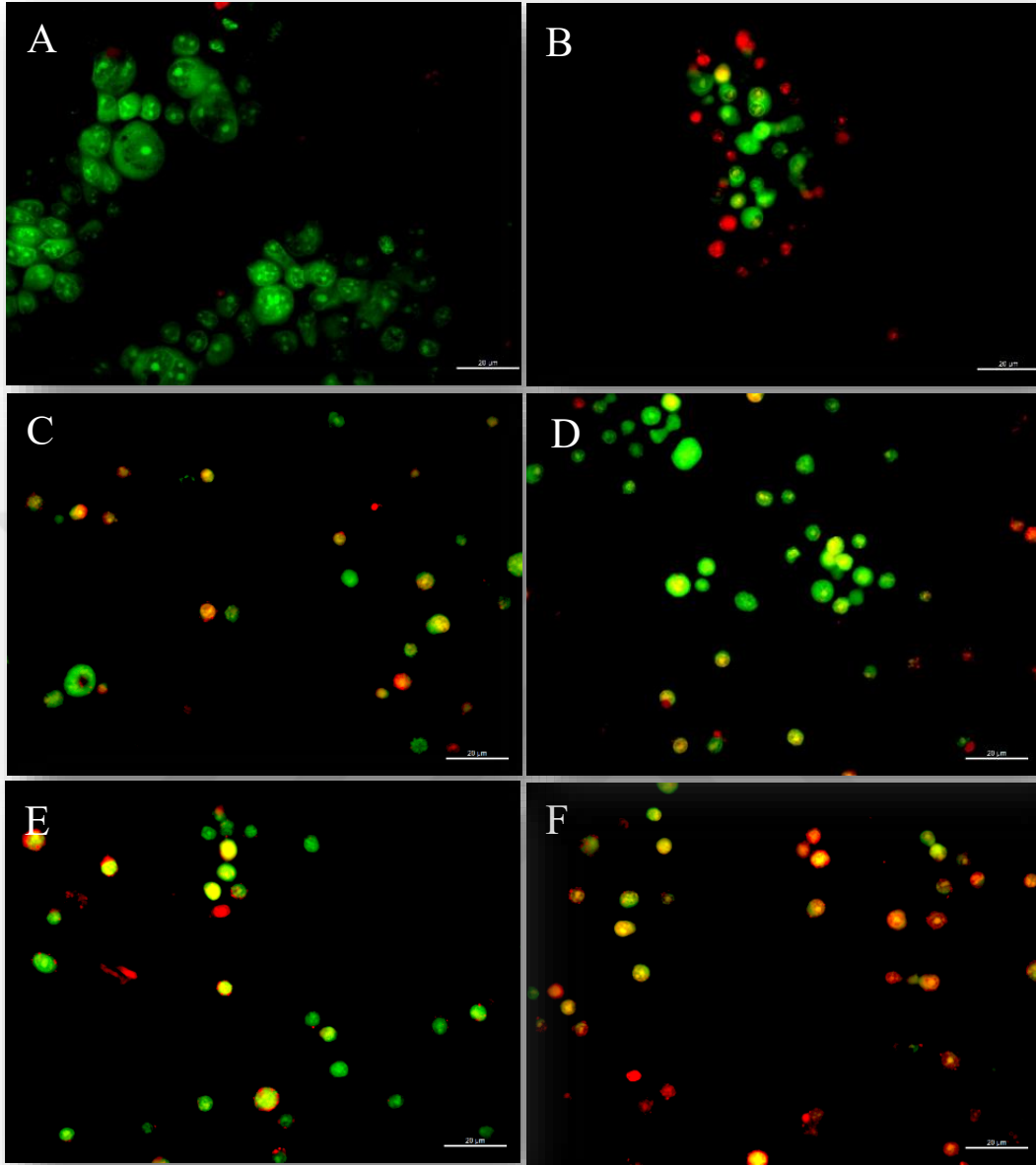
4.6.Apoptotik Etkinin AO/EB Yöntemi ile Belirlenmesi

BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU ile muamele edilen hücre gruplarındaki apoptotik morfoloji AO/EB boyama yöntemiyle flüoresan mikroskop altında fotoğraflanmıştır. Hücre canlılık testlerinin sonuçlarına göre belirlenen dozlar, hücrelerde olası apoptotik morfolojiyi araştırmak için kullanılmıştır (Şekil 4.23-27). Bu yöntemle göre, erken apoptotik canlı hücreler yoğunlaşmış veya fragmente olmuş kromatine sahip parlak yeşil renkte görülmektedir. Geç apoptotik ölü hücreler yoğunlaşmış kromatine sahip parlak turuncu veya kırmızı renktedir Normal çekirdeğe sahip olan nekrotik veya ölü hücreler parlak turuncu renkte olmaktadır. Normal koşullar altındaki hücreler kromatini homojen olarak dağılmış ve homojen yeşil renge sahip hücrelerdir.

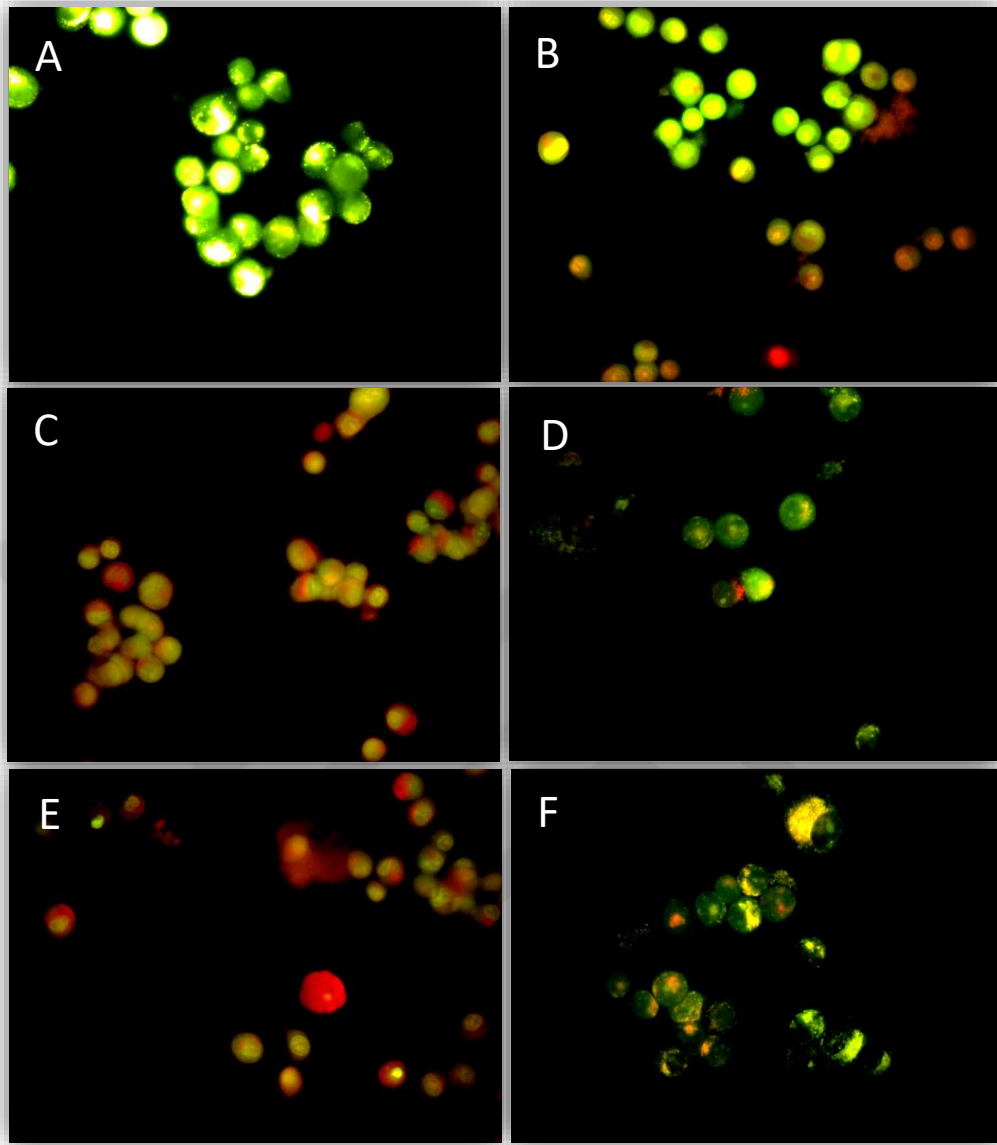
Şekil 4.23-27'de görüldüğü gibi tüm hücre gruplarında test maddelerin etkisi görülmektedir. Buna göre, BA ve 6G ile muamele edilen MKKH, MCF-7 ve A549 hücrelerinde geç apoptotik hücreler yoğun olarak görülmektedir. Test maddelerinin bu hücre

gruplarında daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. AKKH hücrelerinde ise geç apoptotik hücreler daha az oranda görülmesi sebebiyle test maddelerine karşı dirençli olduğu düşünülmüştür (Şekil 4.26B-F). BA/6G kombinasyonu sonucunda ise erken apoptotik hücrelerin ve yer yer nekrotik hücrelerin arttığı görülmüştür. 6G'nin kemopreventif etkisi birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Bu sonuç 6G'nin kemopreventif etkisinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Pozitif kontrolde ise erken ve geç apoptotik hücreler dengeli şekilde görülürken, BA ile pozitif kontrolün muamelesi sonucunda ölen hücre sayısının arttığı gösterilmiştir. Bu etkinin özellikle MKKH ve MCF-7 hücrelerinde olduğu Şekil 4.23-24E'de görülmektedir.

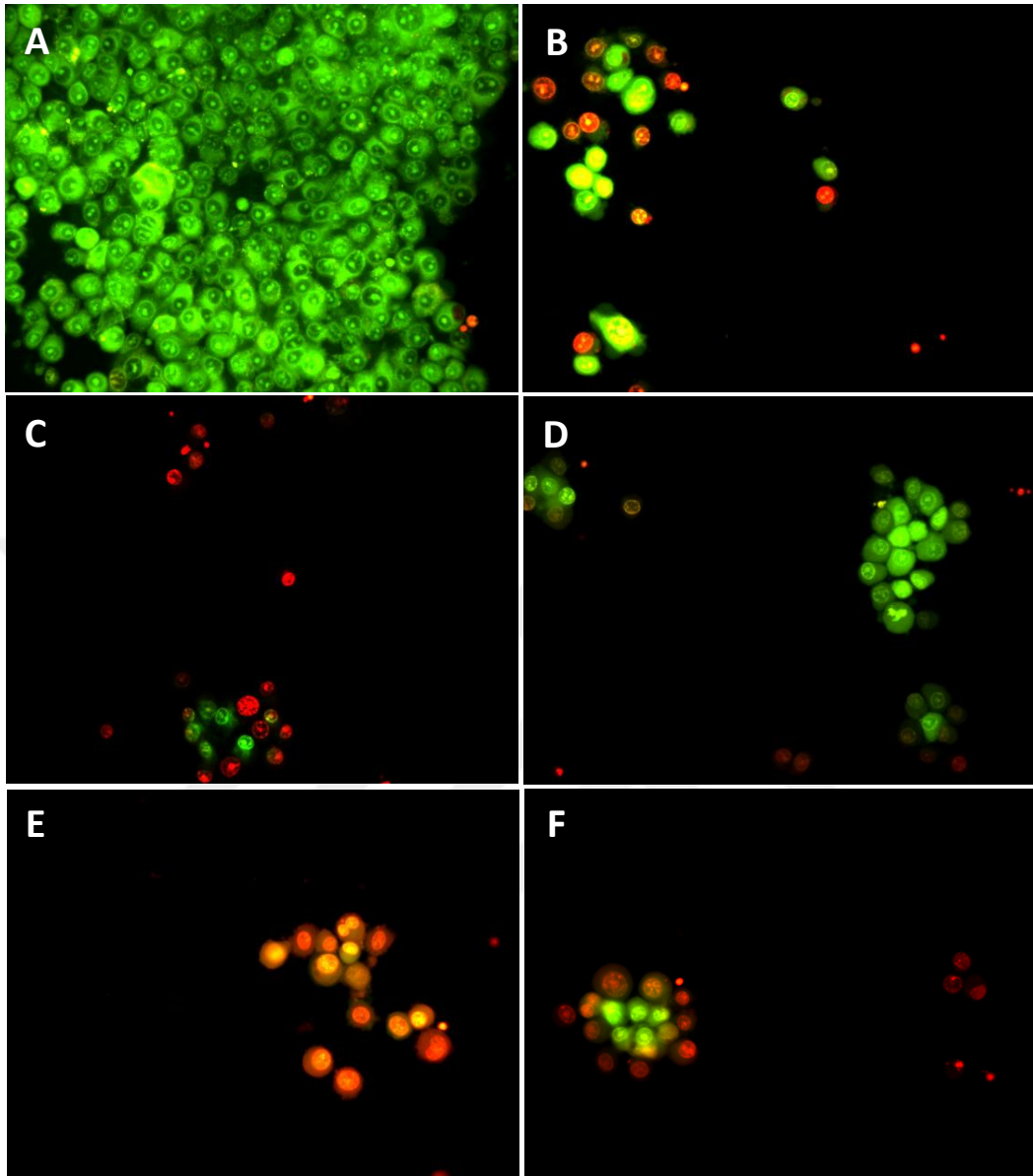
AO/EB yöntemi ile de apoptotik karakteristikleri gösteren test maddelerinin muamelesi sonucunda hücre yapısındaki değişimler tüm hücre gruplarında gösterilmiştir. Sonuçlarımıza paralel olarak son dönemde yapılan çalışmalar, 6G ve BA'nın apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Karan vd., 2018; Nipin vd., 2021). 6G tedavisi ile Bax/Bcl-2'nin düzenlenmesi ve p53 ekspresyonunun artışı ile apoptozun indüklendiği ortaya konulmuştur.



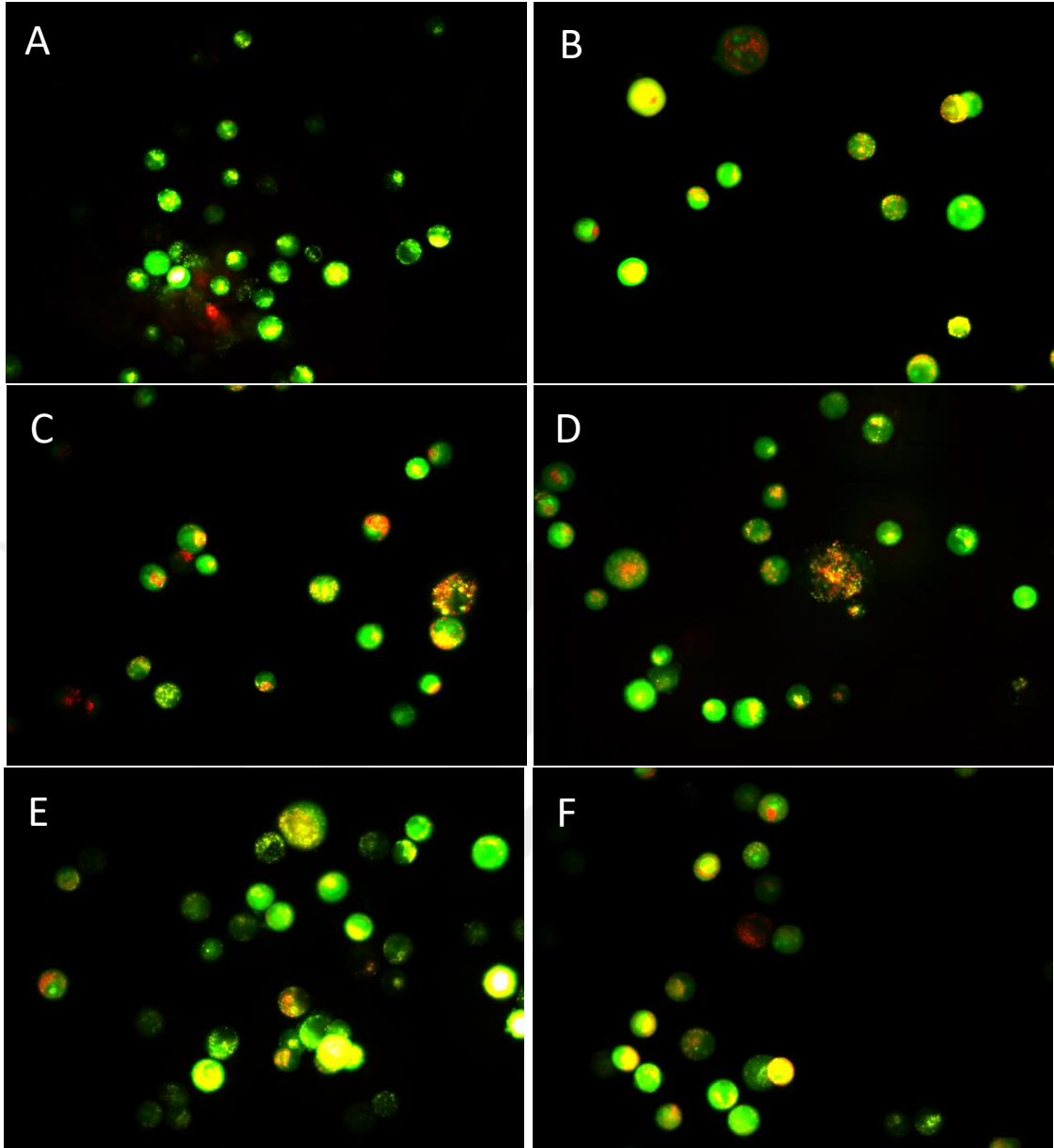
Şekil 4.24. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin AO/EB yöntemi ile görüntülenmesi. A: Kontrol, B: 400 μ M BA, C: 200 μ M 6G, D: 200 μ M 6G/200 μ M BA E: 25 μ M 5-FU/ 200 μ M BA, F: 25 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



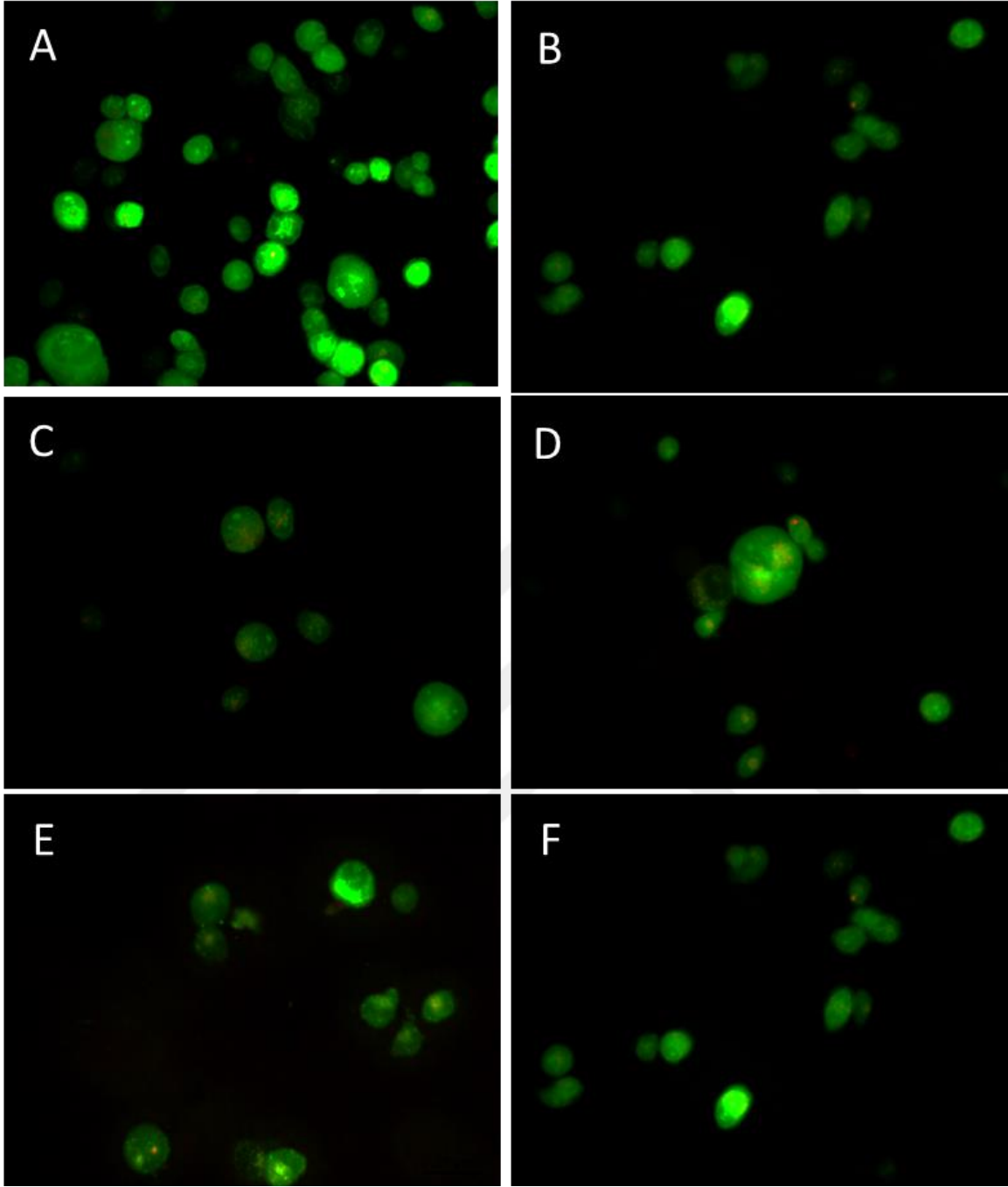
Şekil 4.25. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin AO/EB yöntemi ile görüntülenmesi. A: Kontrol, B: 200 μ M BA, C: 100 μ M 6G, D: 100 μ M 6G/100 μ M BA E: 25 μ M 5-FU/ 100 μ M BA, F: 25 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



Şekil 4.26. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin AO/EB yöntemi ile görüntülenmesi. (A: Kontrol, B: 300 μ M BA, C: 200 μ M 6G, D: 200 μ M 6G/200 μ M BA E: 25 μ M 5-FU/ 200 μ M BA, F: 25 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



Şekil 4.27. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin AO/EB yöntemi ile görüntülenmesi. A: Kontrol, B: 450 μ M BA, C: 300 μ M 6G, D: 200 μ M 6G/200 μ M BA E: 50 μ M 5-FU/ 200 μ M BA, F: 50 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).



Şekil 4.28. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun hücre üzerindeki etkisinin AO/EB yöntemi ile görüntülenmesi. A: Kontrol, B: 300 μ M BA, C: 200 μ M 6G, D: 100 μ M 6G/200 μ M BA E: 25 μ M 5-FU/ 200 μ M BA, F: 25 μ M 5-FU (40X objektif ile görüntülenmiştir).

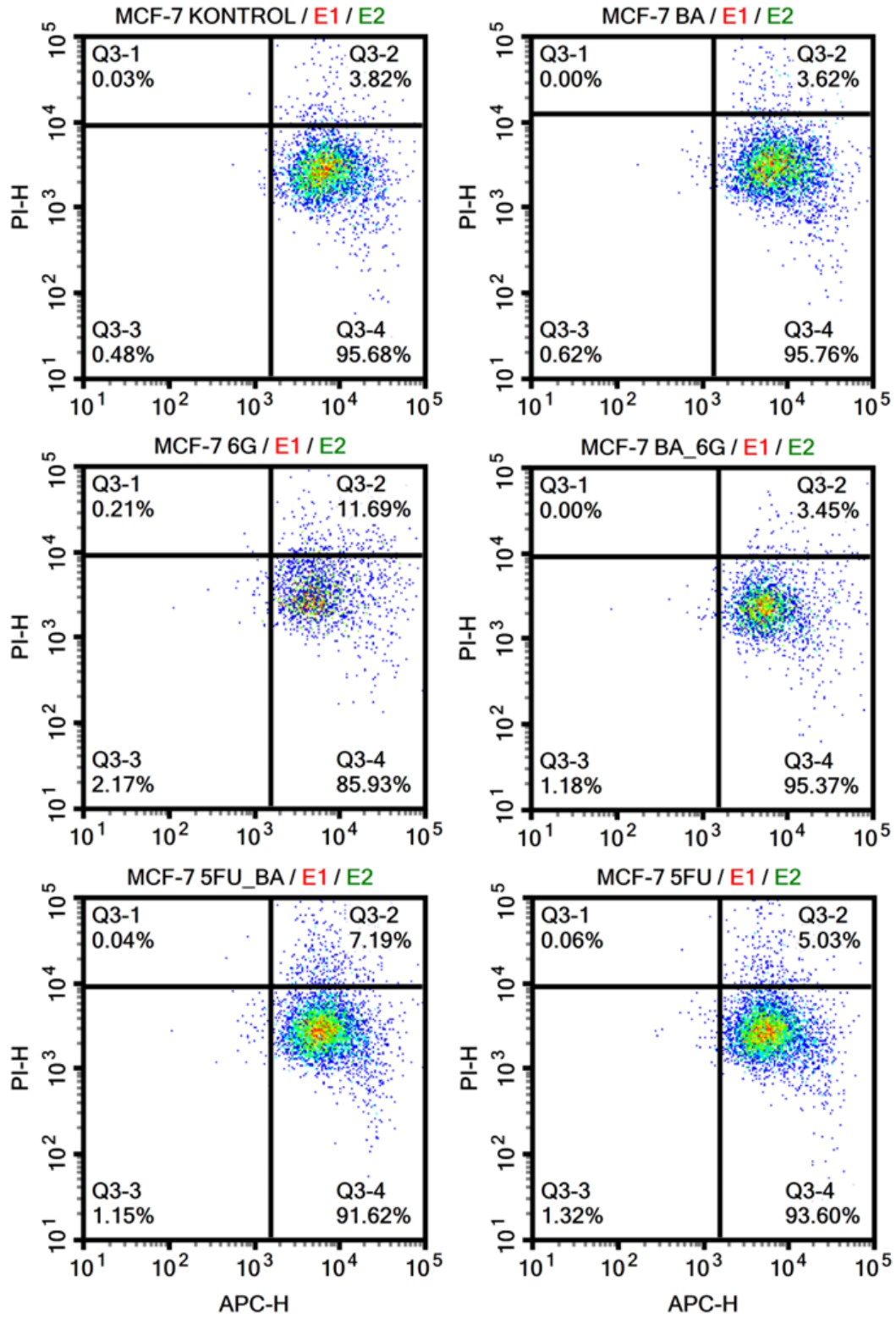
4.7. Apoptotik Etkinin Anneksin V/PI Yöntemi ile Belirlenmesi

BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU maddelerinin hücreler üzerindeki apoptotik etkisi Anneksin V/PI yöntemi kullanılarak da araştırılmıştır (Şekil 4.28-32). Sitotoksiste

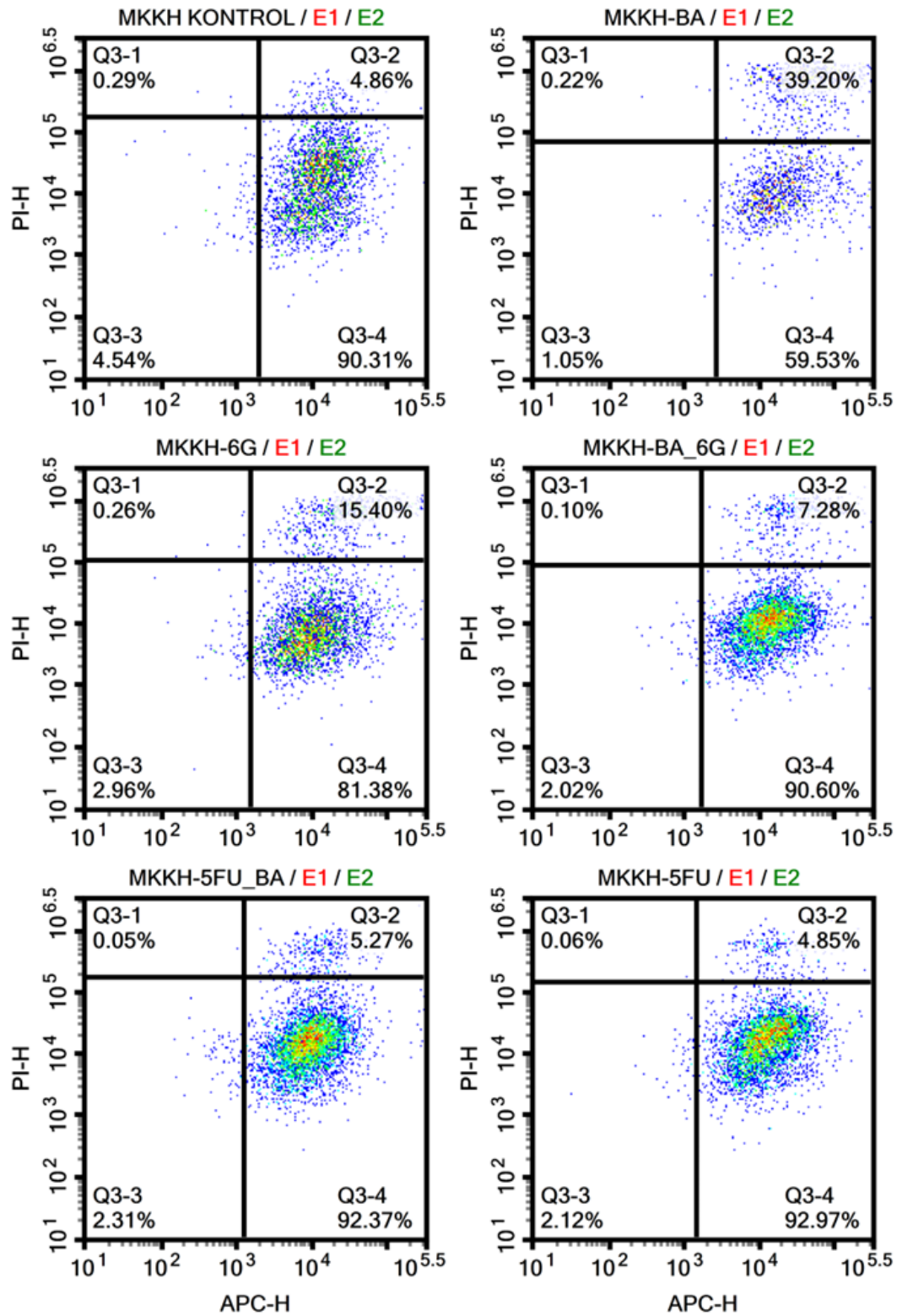
sonuçlarına göre belirlenen ve morfolojik araştırmalarda kullanılan dozlarla çalışılmıştır. Erken apoptoz (sağ alt kadrant) ve geç apoptoz (üst sağ kadrant), grafiklerde açıkça görülmektedir. “Singlet” baz alınarak yapılan analizde negatif kontrol hücreleri de kullanılmıştır ve Annexin V/PI ile boyanmış olan hücreler kadrantın sağ altında yer almaktadır.

Buna göre, Şekil 4.29’da görüldüğü gibi MKKH üzerinde BA ve 6G’nin %39 ila %15 oranında apoptotik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. MCF-7 hücrelerinde 6G ve 5FU/BA maddelerinde %11 ila %7 oranında apoptotik aktivite kaydedilmiştir (Şekil 4.28). AKKH ve A549 hücrelerinde ortalama %5-7 oranında geç apoptotik hücre oranı belirlenmiştir (Şekil 4.30 ve 31). BEAS-2B hücrelerinde 6G ve BA/6G kombinasyonunda %24 ila %36 oranında apoptotik yolla hücre ölümünün gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.32).

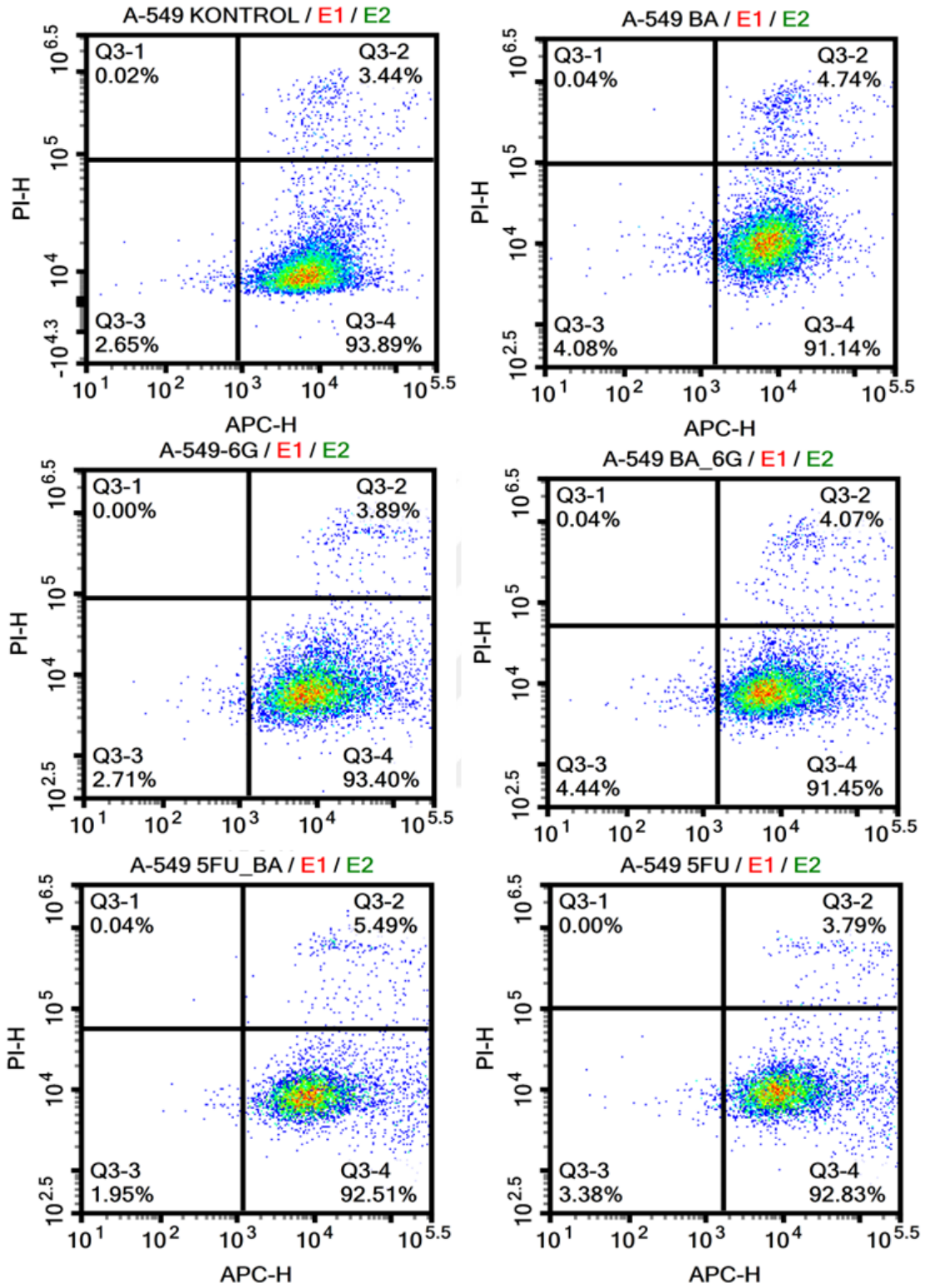
6G ve BA’nın tüm hücre gruplarında apoptotik etkiye sahip olduğu Annexin V/PI yöntemi ile de gösterilmiştir. Ancak A549 kontrol hücrelerinin farklı bir kadranda yerleştiği görülmektedir. Hücrelerin pasaj sayısından ötürü böyle bir sonuç elde edildiği düşünülmektedir. Deneyler birbirinden bağımsız olarak en az 3 kez tekrarlanmıştır. 6G’nin aynı yöntemle apoptotik etkisi son zamanlarda yapılan bir çalışma ile de gösterilmiştir (Nipin vd., 2021). 6G’nin akciğer kanserli hücre hatlarında da apoptotik etkiye sahip olduğu moleküler bir çalışma ile de son dönemde gösterilmiştir (Kim vd., 2022).



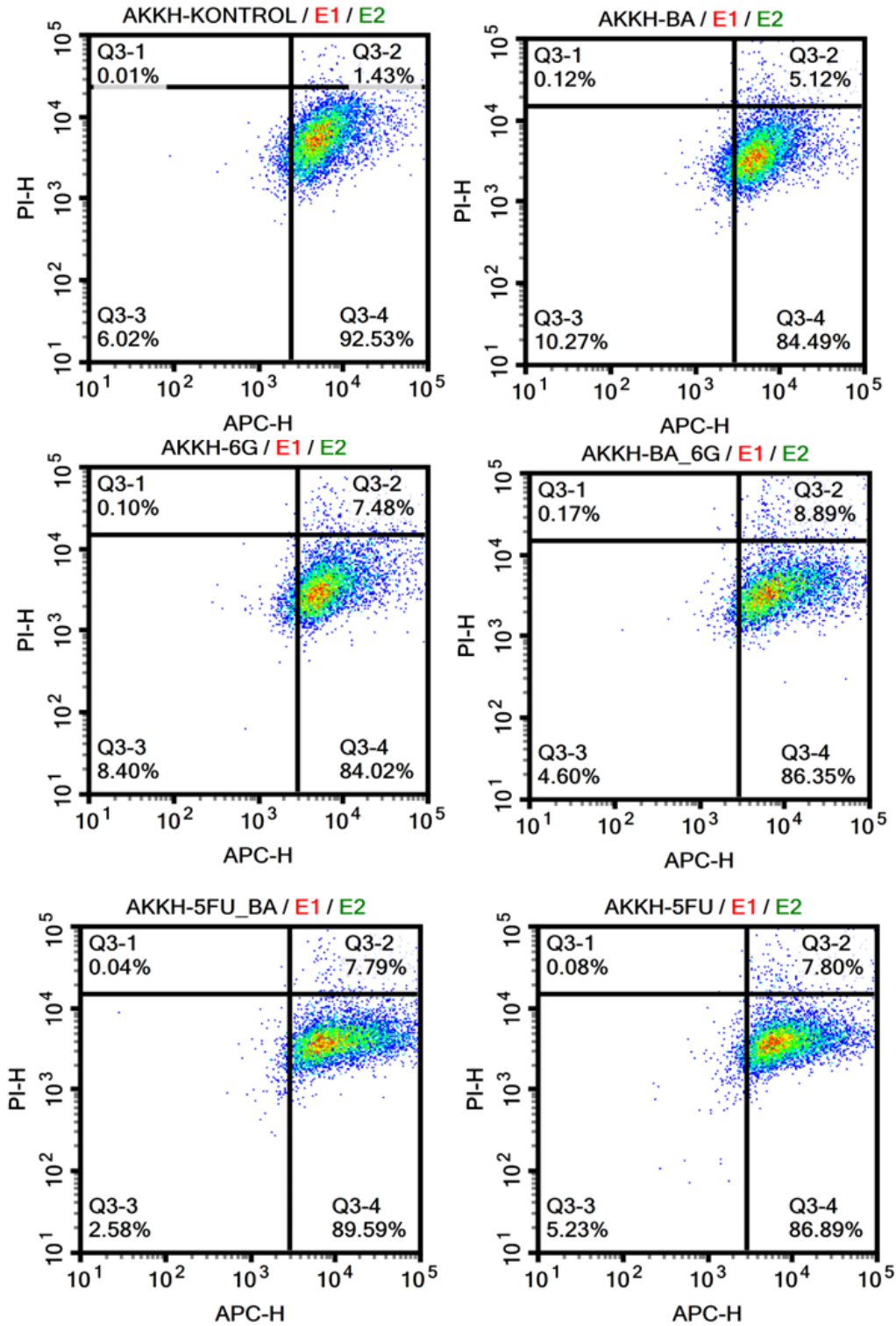
Şekil 4.29. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun apoptotik etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile değerlendirilmesi.



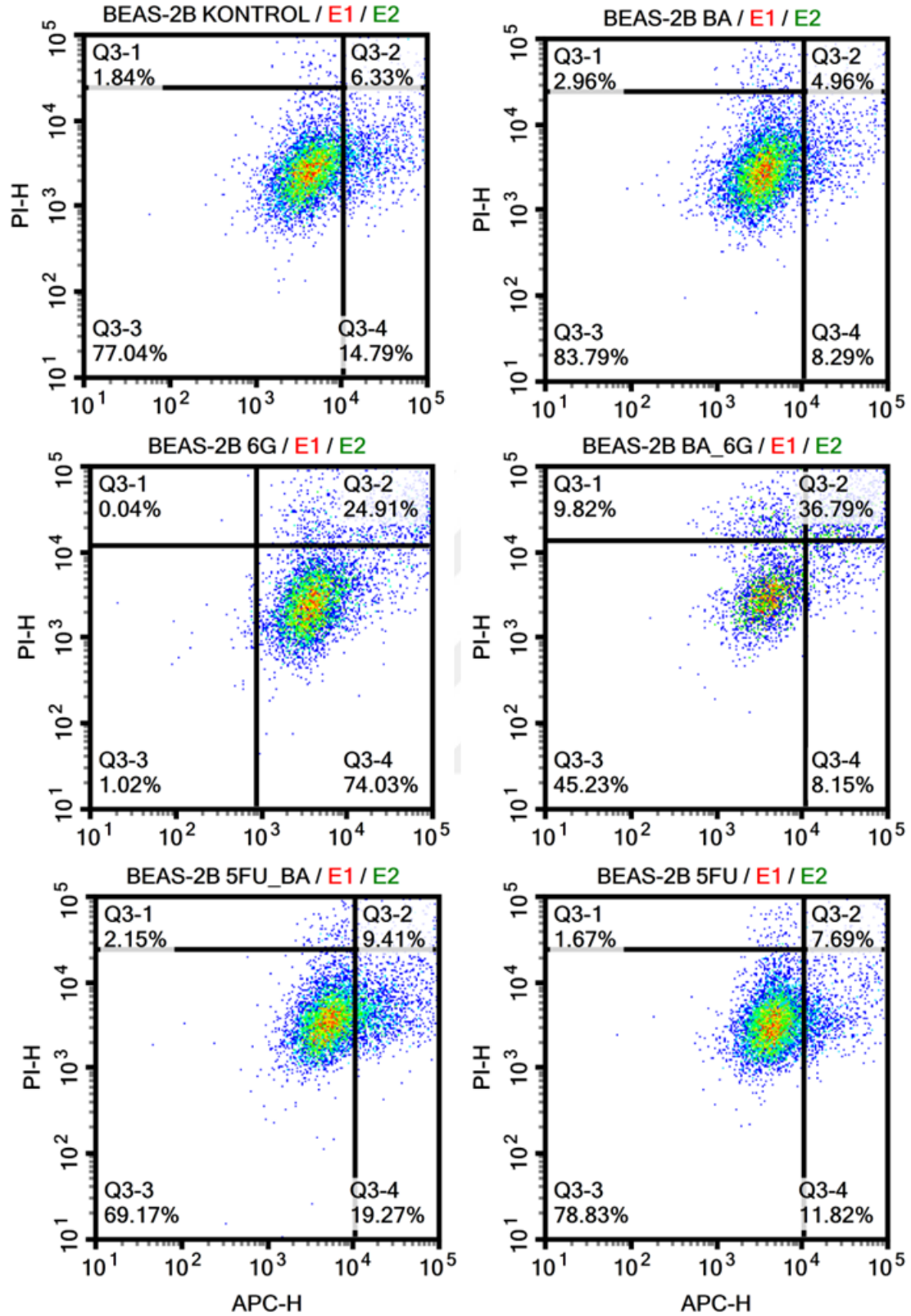
Şekil 4.30. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun apoptotik etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile değerlendirilmesi.



Şekil 4.31. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun apoptotik etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile değerlendirilmesi.



Şekil 4.32. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun apoptotik etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile değerlendirilmesi.



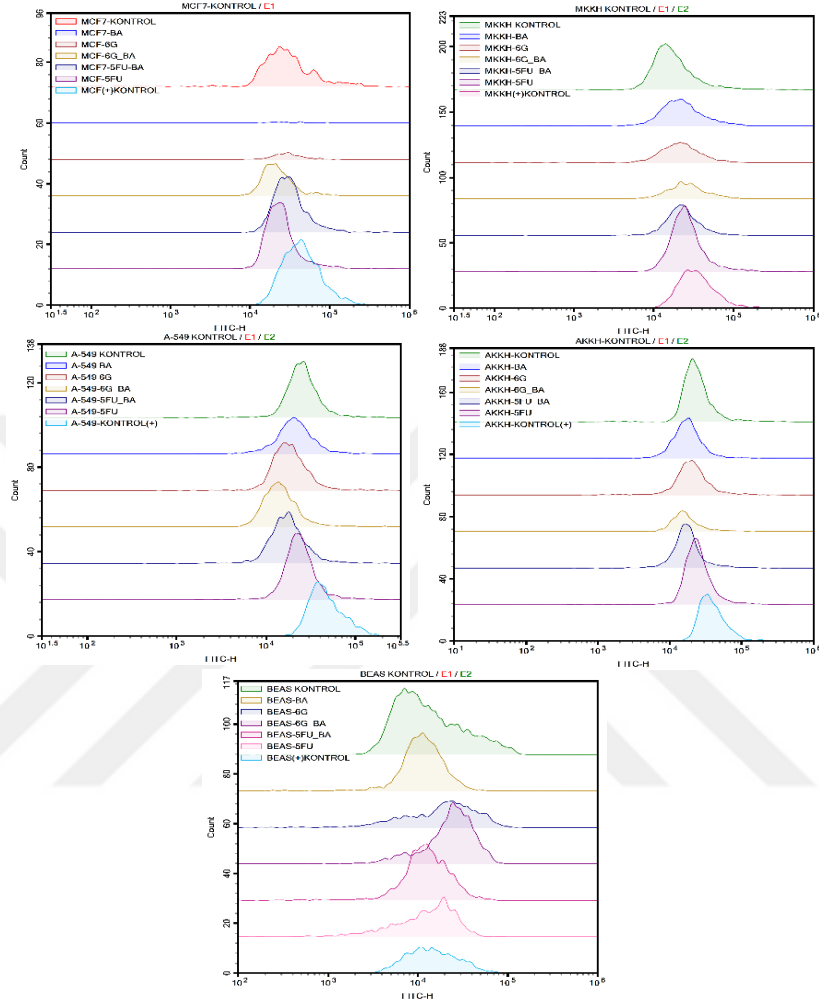
Şekil 4.33. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun apoptotik etkisinin Anneksin V/PI yöntemi ile değerlendirilmesi.

6G'nin antitümör etkisi, hücre döngüsü regülasyonu, anjiyogenez inhibisyonu ve apoptoz aktivasyonu dahil olmak üzere neoplastik hücrelerin çeşitli metabolik yollarını etkileyerek ortaya koyduğu belirlenmiştir. 6G'ün hücre bölünmesi sırasında G1 ve G2 fazlarının uygun seyri için gerekli olan protein biyosentezi sırasında translasyonu inhibe ederek hücre döngüsünü etkilediği gözlenmiştir. Pro-apoptotik etki, diğerleri arasında, yumurtalık kanseri hücre dizileri SKOV-3 üzerinde ve bir fare cilt kanseri modelinde gösterilmiştir. Her iki durumda da p53 protein ifadesindeki değişiklikler fark edilmiştir. Ek olarak, 6-gingerol, anjiyogenezi inhibe ederek ve hücre motilitesini azaltarak metastaz riskini azaltmaktadır (Wala vd., 2022; Belachew vd., 2021; Furlan ve Bren 2020). Son zamanlarda, 6-gingerolün anti-tümör aktivitesi, hücre döngüsü durması, ROS üretimi ve p53'e bağlı intrinsik apoptozun aktivasyonu ile meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) de gösterilmiştir (Nipin vd., 2021). Bir diğer çalışma, akciğer kanserli hücre hatlarında 6G tedavisinin, p21'in RNA ekspresyonunu artırarak ve siklin D1'i devre dışı bırakarak hücre döngüsü durmasına neden olduğunu göstermiştir. Hücre döngüsü durmasının, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve kanserin ilerlemesini kontrol eden ana mekanizma olduğu bilinmektedir. Böylece 6G tedavisi akciğer kanserli hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ve antikanser etkisini ortaya koyduğu belirlenmiştir (Kim vd., 2021). Diğer taraftan, *Zingiber officinale* ekstraktları ve 6-gingerolün farklı kanser tiplerinde antikanser etkiye ve koruyucu etkiye de sahip oldukları bilinmektedir. Bu etkilerini Nrf2, p38/MAPK, p65/NF- κ B, TNF- α , ERK1/2, SAPK/JNK, ROS/NF- κ B/COX-2, caspases-3, -9, and p53 gibi bazı sinyal yolları ve önemli mediatörler aracılığıyla gösterdikleri ortaya konulmuştur (Baliga vd., 2011; Poltronieri vd., 2014; Lima vd., 2018'de derlenmiştir). BA ile 6G'ün kombinatif etkisi ile BA'nın apoptotik etkisi ilk defa bu tez çalışması ile ortaya konulmuştur.

4.8.Oksidatif Stresin ROS Aktivitesi Yoluyla Belirlenmesi

BA, 6G, BA/6G, 5-FU ve 5-FU/BA'nın hücre gruplarında oksidatif strese neden olup olmadığı intraselüler ROS seviyesi ölçülerek araştırılmıştır. Eksperimental/pozitif kontrol olarak ROS kitinde bulunan ROS-inducer kullanılarak ROS uyarılmıştır. Buna göre, tüm hücre gruplarının pozitif kontrolün solunda ışıma verdiği Şekil 4. 33'de görülmektedir. BEAS-2B hücrelerinde ROS aktivitesi görülmemiştir. AKKH ve A549 hücrelerinde ROS seviyesinin uyarıldığı ortaya konulmuştur. MKKH ve MCF-7 hücrelerinde ise kontrol ile

pozitif kontrol arasında ancak pozitif kontrolün solunda ve kontrole daha yakın bir seviyede ışıma görüldüğünden test maddelerinin ROS seviyesini uyardığı görülmektedir.



Şekil 4.34. Hücre gruplarında BA, 6G, BA/6G, 5-FU ve 5-FU/BA etkisinin intraselüler ROS seviyesinin akış sitometrik olarak değerlendirilmesi.

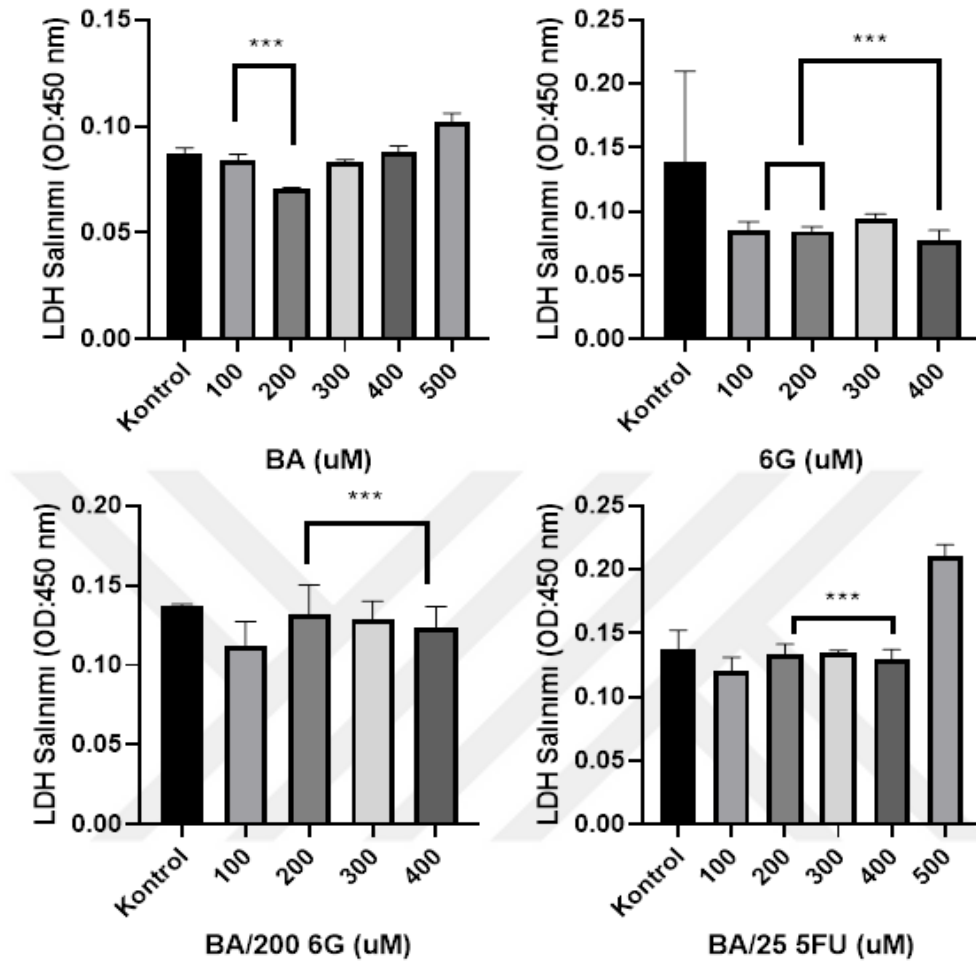
Reaktif oksijen türlerinin (ROS), DNA hasar yanıtı mekanizmasına yol açan DNA hasarını indükledikleri için kanserde kritik bir rolü olduğu belirlenmiştir. Genel olarak, uzun süreli stres hem hücrel hem de mitokondriyal seviyelerde ROS'un indüklenmesine yol açarak çift zincirli DNA kırılmalarına ve heterozigotluk veya genomik kararsızlık kaybına neden olmaktadır (Yang vd., 2017; Srivinas vd., 2018; Nipin vd., 2021). Sonuçlarımıza benzer şekilde, 200 μ M 6G'nin hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücrelerinde hücrel ROS seviyelerini önemli ölçüde uyarıldığı ortaya konulmuştur. ROS seviyelerinin 6-gingerol ile bu artışı, mitokondri hücrel ROS'un ana kaynağı olduğu için mitokondride

ROS indüksiyonunu gösterebilir. Mitokondriyal ROS'un akış sitometrisi analizi, her iki meme kanseri hücre hattında 200 μ M 6-gingerol ile tedaviyi takiben ROS seviyelerinde benzer bir artış göstermiştir. Ayrıca 6-gingerolün ROS indüksiyonunda rolünü açıkça gösteren iNOS ekspresyon seviyelerinde önemli ölçüde artışı aynı çalışmada gösterilmiştir (Nipin vd., 2021). Bu sonuçlar 6G'nin meme kanseri hücrelerine karşı antikanser aktivitesine sahip olabileceğini göstermiştir. BA'nın da 6G ile benzer şekilde ROS aktivitesine sahip olduğu bulgularımızda yer almaktadır. Dolayısıyla, BA'nında 6G gibi meme kanseri hücrelerine karşı antikanser aktivitesine sahip olabileceği düşünülmektedir. Bir başka çalışmada Nan vd. (2020) 6G, nükleus pulposus kaynaklı mezenkimal kök hücre canlılığı ve hücre içi reaktif oksijen türleri seviyesinde hidrojen peroksit kaynaklı azalmayı hafiflettiği belirlenmiştir. BA'nın ROS aktivitesi ve 6G ile olan kombinatif etkisi ilk kez bu çalışmada tanımlanmıştır.

Bir diğer araştırmada A549 hücre hattında, 6G tedavisi ile ROS seviyesinin arttığı ortaya konulmuştur. Bu da büyümenin inhibisyonuna ve apoptozun indüklenmesine sebep olmaktadır. Yine aynı çalışmada, 6G, USP14 ekspresyonunu baskılayarak, ROS ve Fe²⁺ içeriğini artırarak otofajiye bağlı ferroptozu iyileştirdiği gösterilmiştir (Tsai vd., 2020).

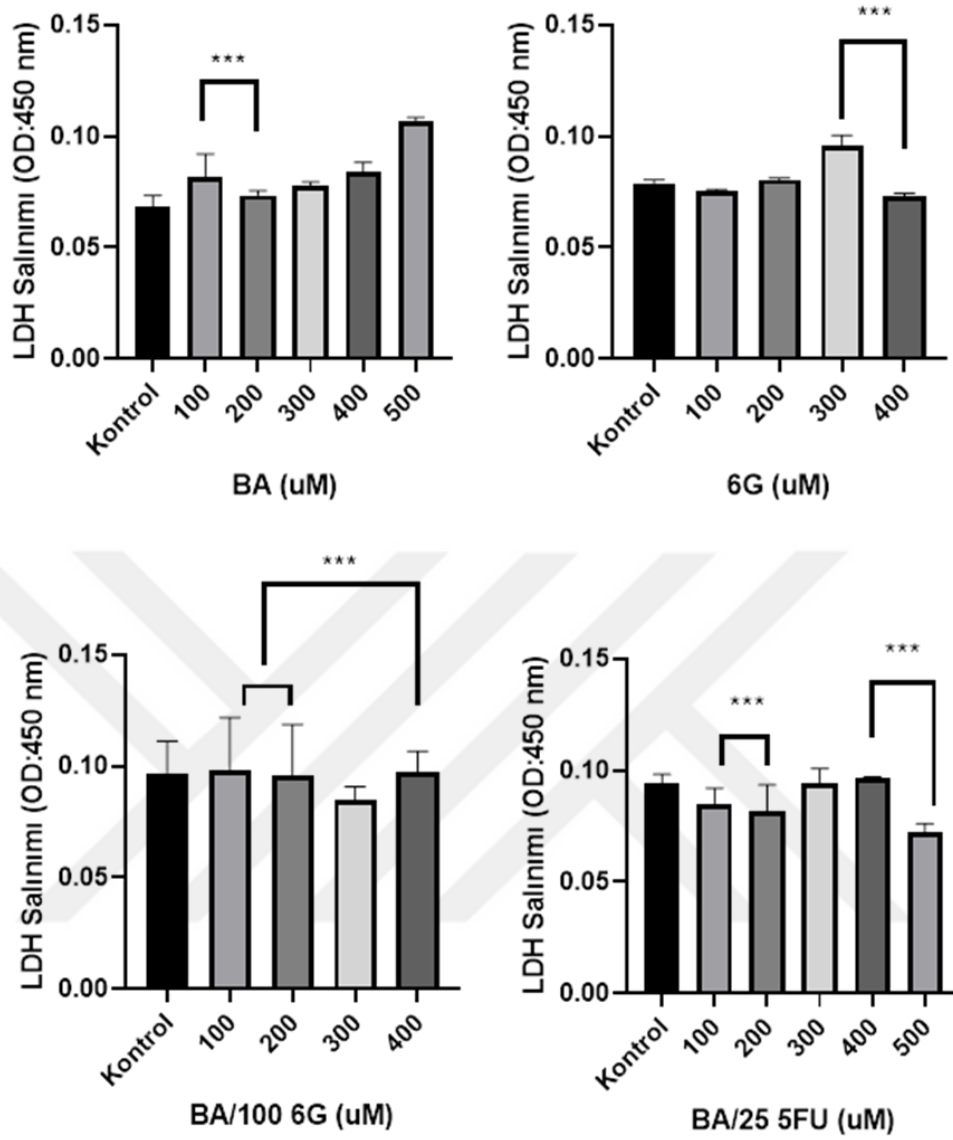
4.9.Hücre Nekrozunun LDH Analizi ile Belirlenmesi

LDH yöntemi ile BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun nekrotik etkisi araştırılmıştır (Şekil 4.33-37). Test maddelerinin artan konsantrasyonuyla birlikte LDH salınımının gerçekleştiği Şekil 18'de görülmektedir. Şekil 4.34-37'de görüldüğü gibi test maddelerinin muamelesi ile birlikte doza bağlı olarak LDH salınımı büyük oranda kontrole yakın seviyede gerçekleşmektedir. Tüm hücre gruplarında düşük konsantrasyonlarda LDH aktivitesi hiç gözlemlenmezken, yüksek konsantrasyonlarda da kayda değer bir aktivite belirlenmemiştir.

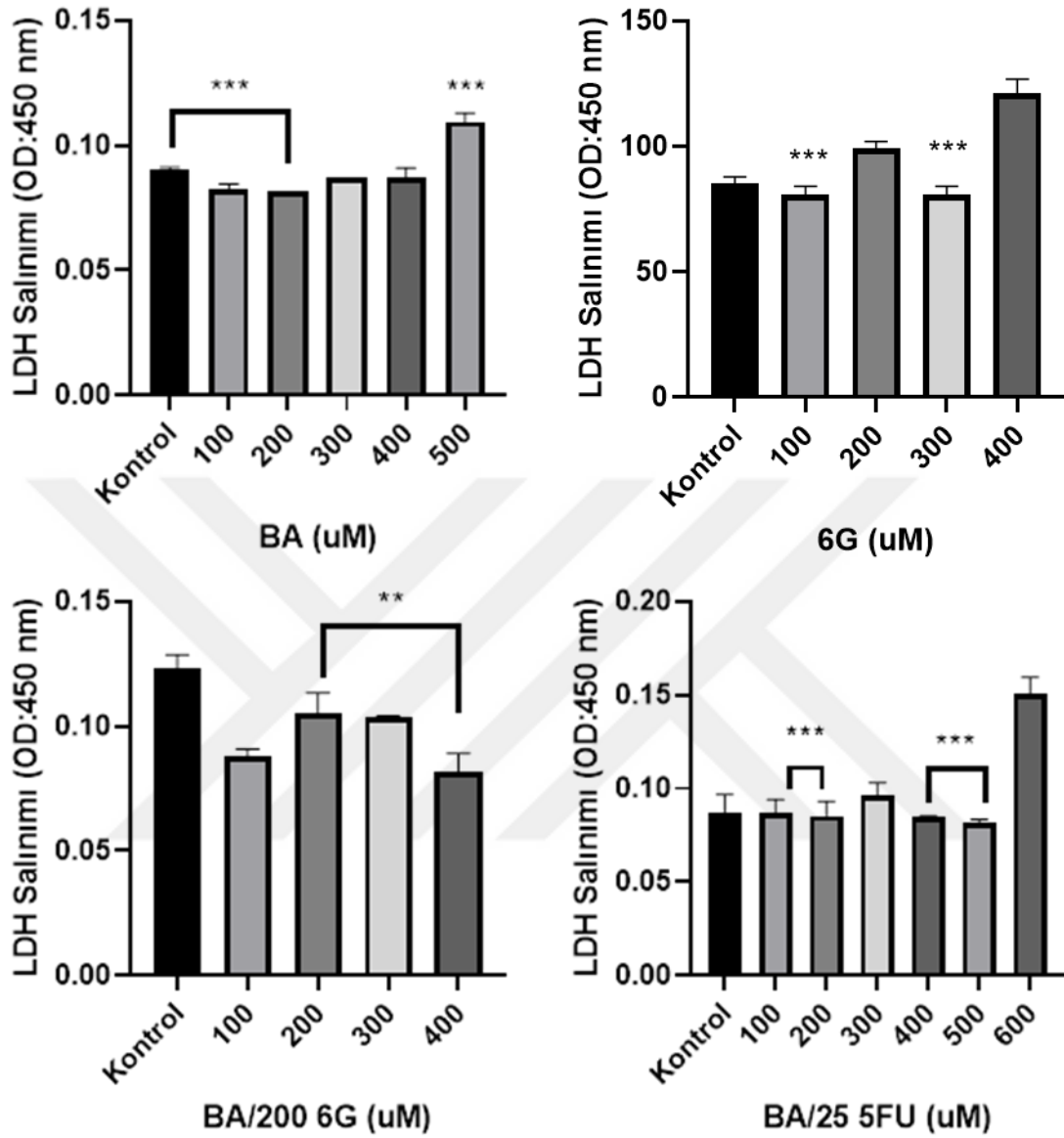


Şekil 4.35. MCF-7 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun etkisinin LDH yöntemi ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ ve (****) $p \leq 0,0001$ olarak değerlendirilmiştir.

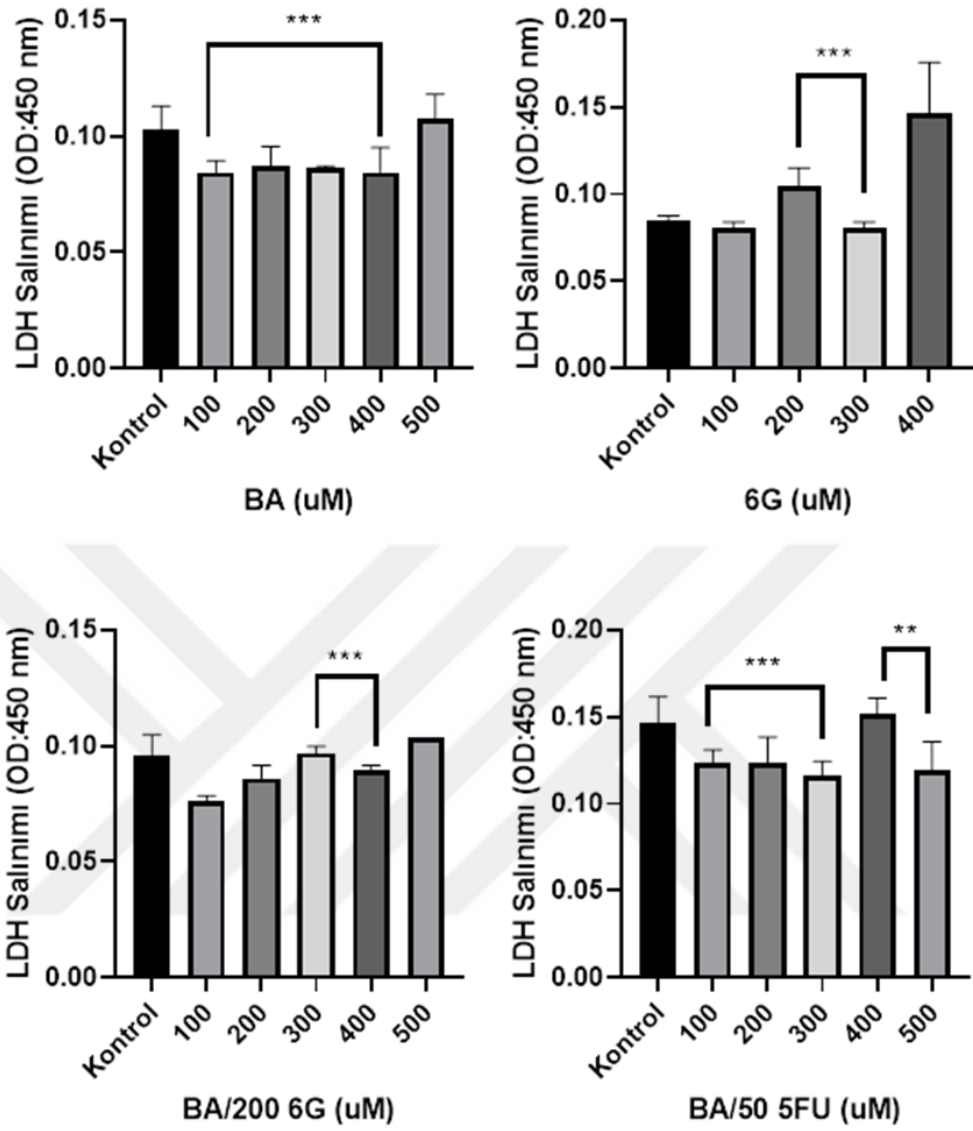
Son dönemde yapılan bir çalışmaya göre, hücre canlılığının hipoksi ile indüklenen kardiyomiyosit H9c2 hücrelerinde doza bağlı bir şekilde 6G tarafından desteklendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, hipoksi ile indüklenen LDH salınımı, apoptoz ve otofaji, PI3K, AKT ve mTOR'un fosforilasyonunu uyarak 6G ön-tedavisi ile inhibe edilmiştir. Karan vd. (2018) farklı hücre hatlarının BA ile muamelesi sonucunda ortaya konulan sitotoksik etki LDH analizi ile gerçekleştirilmiştir. BA ve 6G'nin kombinatif etkisine yönelik herhangi bir literatür bilgisi yer almamaktadır. Sonuçlarımıza göre, BA nekrotik aktivite göstermezken BA/6G muamelesi ile 6G'nin kısmi nekrotik aktivitesinin BA tarafından baskılanmış olabileceği düşünülmektedir.



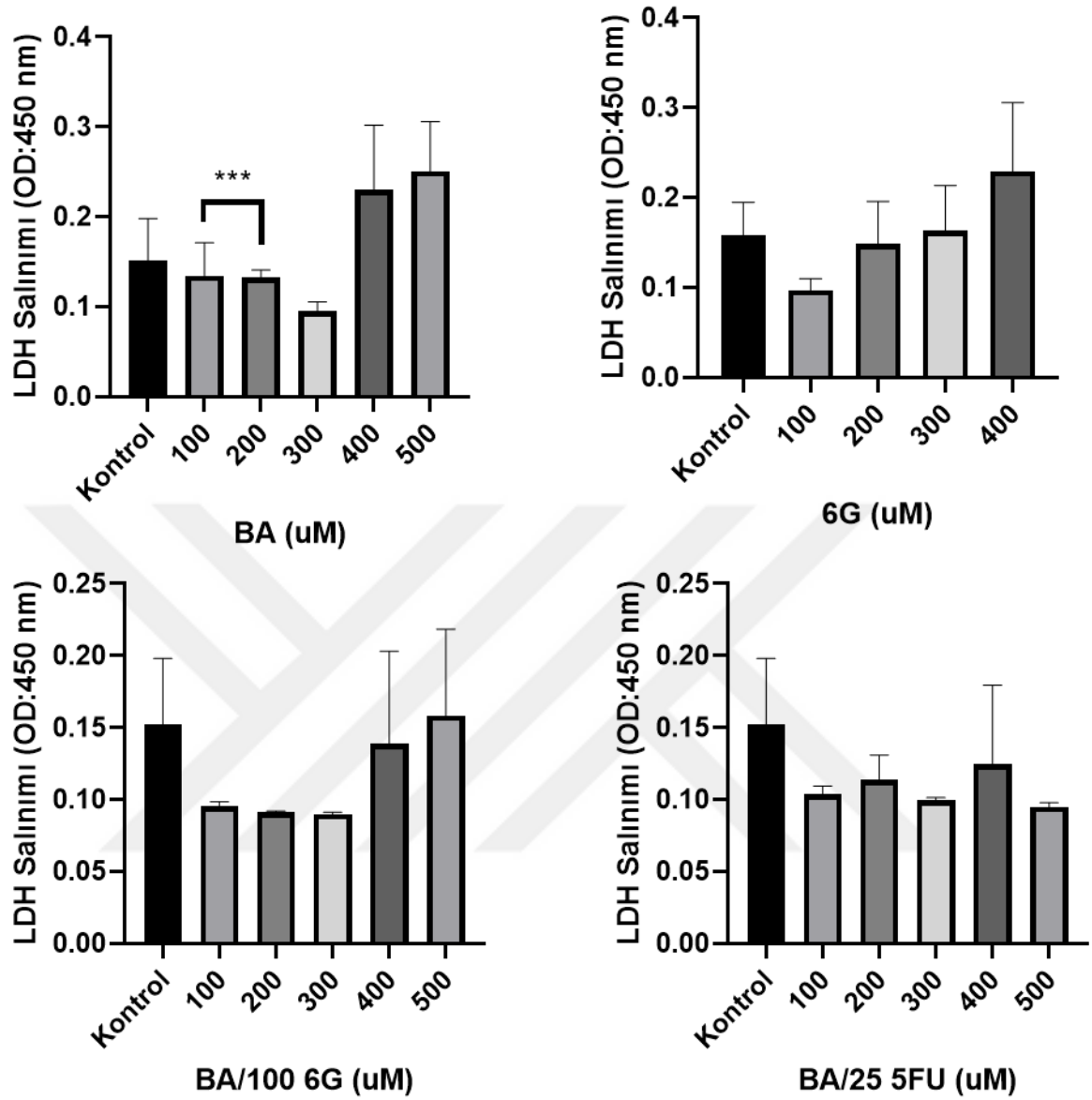
Şekil 4.36. MKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun etkisinin LDH yöntemi ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ ve (****) $p \leq 0,0001$ olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.37. A549 hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun etkisinin LDH yöntemi ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ ve (****) $p \leq 0,0001$ olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.38. AKKH hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun etkisinin LDH yöntemi ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ ve (****) $p \leq 0,0001$ olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.39. BEAS-2B hücrelerinde BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun etkisinin LDH yöntemi ile değerlendirilmesi. Anlamlılık değeri (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$ ve (****) $p \leq 0,0001$ olarak değerlendirilmiştir.

4.10. RT²-PCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Profillerinin Değerlendirilmesi

MKKH hücrelerinde BAX, BCL-2, TGF β 1, TGF β 3, WNT2 ve BMP2 genleri ile AKKH hücrelerinde BAX, BCL-2, TGF β 1, TGF β 3, WNT2, BMP2 ve ITGA5 genlerinin ifadesine BA, 6G ve BA/6G maddelerinin etkisi RT²-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmanın

temeli test maddelerinin kanser kök hücrelerindeki etkisinin araştırılmasına dayandığından araştırma sadece kanser kök hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve test maddeleri ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen RNA örneğinden RT²-PCR yapılmıştır. Şekil 4.38 ve 39'da gösterildiği gibi çoklu sütun grafiği ile 1 kat değişimler göz önüne alınarak yapılmıştır. Kontroldeki gen ifade katlanması 1 kabul edilerek kontrole göre gen ifade seviyesindeki değişimler gösterilmiştir.

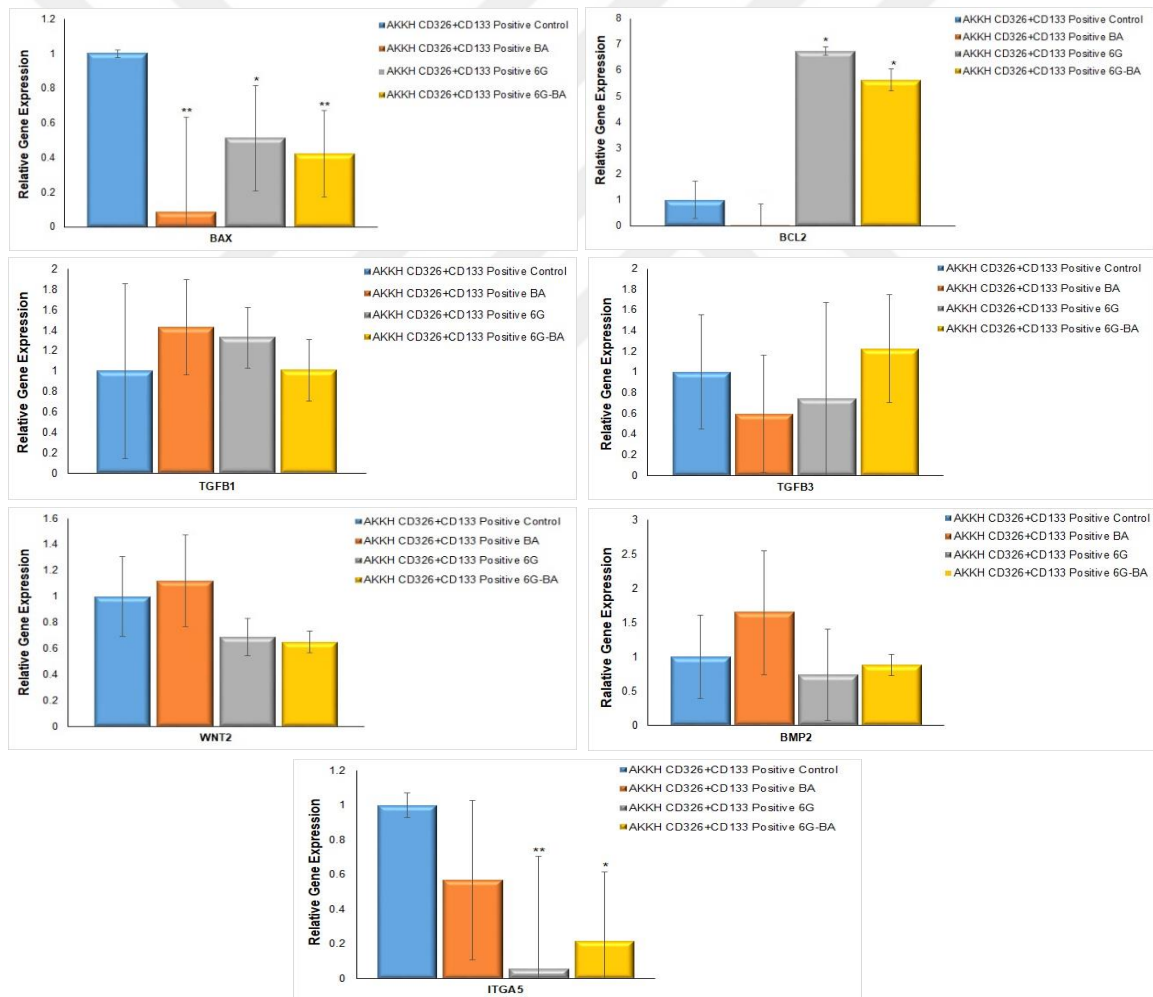
Şekil 4.39'da görüldüğü gibi AKKH hücrelerinde BA muamelesi sonucu BAX geninin ifadesi kontrole göre azalırken 6G ve BA/6G kombinasyonunda BA maddesine göre ifadesi artmıştır. BCL2 geninin BA maddesinin muamelesi sonucundaki ifadesi kontrole göre azalırken 6G ve BA/6G kombinasyonunun ifadesi kontrole göre önemli ölçüde artmıştır. Apoptotik marker genlerinin bu sonucu BA'nın apoptotik etkisini ortaya koymaktadır. 6G ve BA/6G kombinasyonunda BCL2'nin önemli derecedeki katlanma değişikliği anti-apoptotik bir aktivite göstermiş olduğunu düşündürmekte ve BA'nın apoptotik etkisi ile birlikte, kombinasyonla birlikte bu ifadenin azaldığı görülmüştür.

AKKH hücrelerinde TGB1'in kontrole göre ifadesi tüm test maddelerinde artmış ve BA ile muamelesinde diğer test maddelerine oranla önemli ölçüde artış göstermiştir. BA/6G kombinasyonunda ise kontrole yakın bir seviyede artış meydana gelmiştir. TGB3 geninin ifadesi ise kontrole göre BA'da azalmış, 6G'de BA maddesine oranla artmış ve BA/6G kombinasyonunda ise kontrole göre artmıştır.

WNT2 geninin AKKH hücrelerinin BA ile muamelesi sonucundaki ifadesi kontrole göre artarken, 6G ve BA/6G kombinasyonu ile ifadesi kontrole azalmıştır. BMP2 geninin ifadesi BA muamelesiyle önemli ölçüde artmış, 6G'de kontrole göre azalmış ve BA/6G kombinasyonunda ise kontrole yakın bir seviyede olduğu görülmüştür.

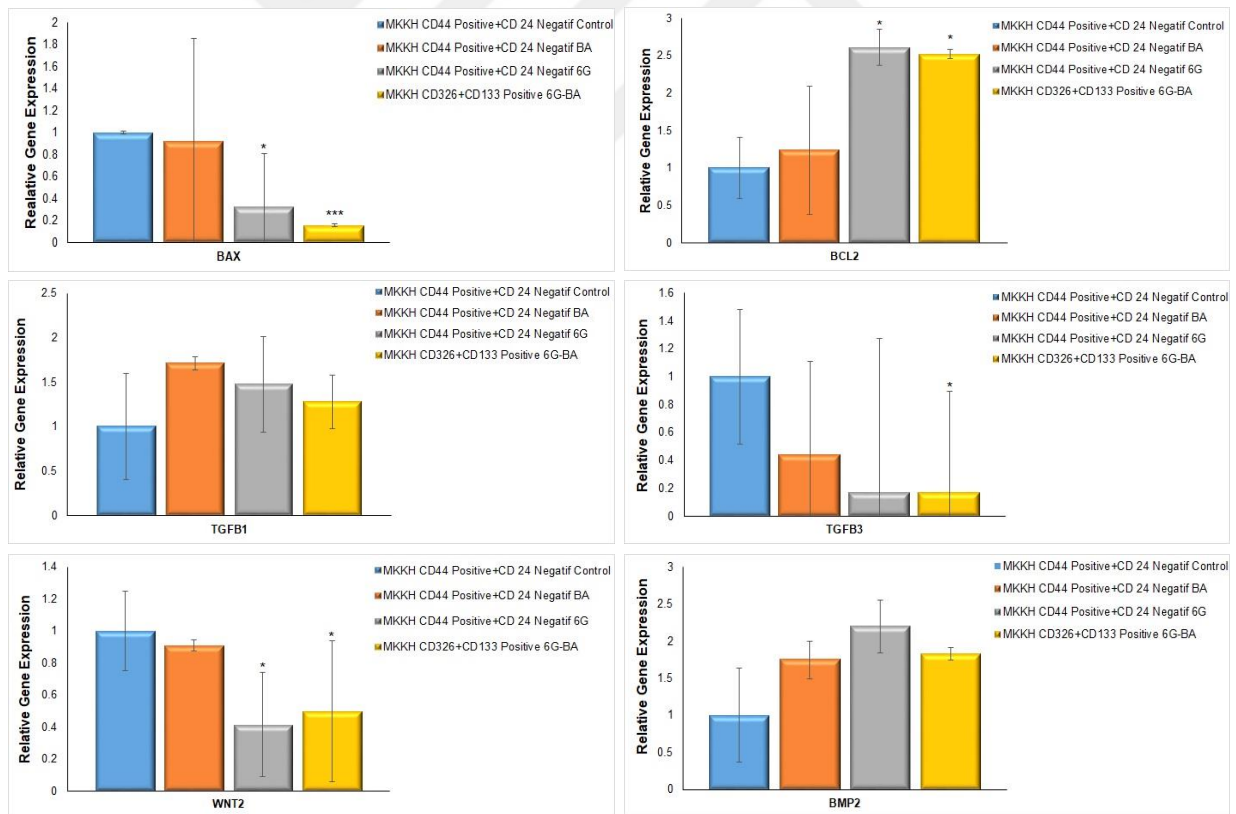
AKKH hücrelerinde BA'nın etkisi ITGA5 geni üzerinden de araştırılmıştır. BA'nın etkisi ile gerek kanserli gerekse sağlıklı akciğer hücreleri üzerinde hücresel uzama morfolojik araştırmalar sonucunda ortaya konulduğundan, bu nedenle sadece bu hücreler üzerinden ITGA5 geni ayrıca araştırılmıştır. Nitekim, BA etkisi ile ITGA5 gen ifadesinin kontrole göre azaldığı grafikte görülmektedir. 6G'nin etkisi ile bu etkinin daha da arttığı ve BA/6G kombinasyonu ile birlikte azalan etkinin arttığı ortaya konulmuştur. ITGA5, integrin

adezyon molekölü ailesinin bir üyesidir ve kanser metastazı ve onkogenezi ile ilişkilidir. Bununla birlikte, az sayıda çalışma, tümör immün mikroçevresi ile gliomalarda ITGA5 ekspresyon seviyesi arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. ITGA5'in tümör invazyonu, tümör ilerlemesi ve kemoterapi direnci ile derin bir bağlantısı bulunmaktadır. ITGA5'in küçük hücreli dışı akciğer kanserinde ve meme kanseri kemik metastazında prognostik kullanımı olduğu gösterilmiştir (Li vd., 2022). ITGA5'in kanser proliferasyonu, migrasyon, invazyon ve metastaz için gerekli olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca ITGA5'in kanser hücresi köklülüğünü ve kemoterapi direncini koruduğu gösterilmiştir (Zhu vd., 2021). Buna göre, AKKH hücrelerinde test maddelerinin muamelesi ile ITGA5 geninin ifadesi baskılanmıştır.



Şekil 4.40. BA, 6G ve BA/6G maddelerinin AKKH hücreleri üzerindeki etkisinin gen ifade seviyesi 1 kat ve üzeri değişen BAX, BCL-2, TGFB1, TGFB3, WNT2, BMP2 ve ITGA5 genlerinin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak gösterilmesi.

Şekil 4.40’da görüldüğü gibi MKKH hücrelerinde BA’nın etkisi ile BAX geninin ifadesi kontrole yakın bir seviyededir. 6G ve BA/6G kombinasyonunun MKKH hücreleri üzerindeki etkisi ile BAX ifadesi azalmıştır. BCL2 geninin ifadesi ise buna paralel olarak tüm test maddelerinde kontrole göre artmış, 6G ve BA/6G etkisi ile BCL-2 gen ifadesi gerek BA’ya gerekse kontrole göre önemli ölçüde artış göstermiştir. AKKH hücrelerinde BA’nın etkisi ile BCL-2’nin ifadesi neredeyse gözlemlenmezken MKKH hücrelerinde ifade olmuştur. AKKH hücrelerinde 6G ve BA/6G’nin etkisi ile meydana gelen katlanma değişikliği MKKH hücrelerine oranla neredeyse 3 kat olarak görülmektedir. Her iki hücre grubundaki bu değişimin 6G etkisiyle olduğu grafikler karşılaştırıldığında görülmektedir. Diğer taraftan, apoptotik belirteçlerinde protein ifadesi immunositokimyasal olarak da araştırılmıştır. AKKH ve MKKH hücrelerinde de BCL-2 mRNA ekspresyon seviyesinin artması diğer bulgularımızla paralellik göstermektedir. Ancak BCL-2 ifadesinin artışıyla hücrelerin korunduğu görülmektedir.



Şekil 4.41. BA, 6G ve BA/6G maddelerinin MKKH hücreleri üzerindeki etkisinin gen ifade seviyesi 1 kat ve üzeri değişen BAX, BCL-2, TGFβ1, TGFβ3, WNT2 ve BMP2 genlerinin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak gösterilmesi.

Bax, Bcl-2'nin önemli bir homologu ve apoptozun promotörüdür. Hücrelerin apoptoz uyaranlarına duyarlılığının, Bcl-2/Bax ve diğer Bcl-2 homologlarının oranı ile yakından ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Bcl-2 ifadesi fazla olduğunda hücreler korunur. Bununla birlikte, Bax ifadesi fazla olduğunda ve Bax homodimerleri baskın olduğunda, hücreler apoptoza duyarlıdır (Sharifi vd., 2014).

TGF β 1 geninin MKKH hücrelerindeki ifadesi de araştırılmıştır. MKKH hücreleri ile muamele edilen tüm test maddelerinde bu genin ifadesinin kontrole göre arttığı grafikte görülmektedir. AKKH ve MKKH hücrelerinde TGF β 1 geninin ifadesi yaklaşık olarak benzer bir sonuç ortaya koymuştur. TGF β 1, çeşitli fizyolojik ve immün düzenleyici fonksiyonlar sergileyen bir pleiotropik sitokindir. Birden fazla hücre tipi üzerindeki etkisi, sayısız biyolojik sürecin düzenlenmesi için kritiktir ve ancak hem TGF β 1 ekspresyonunun hem de aktivitesinin düzensizliği kanserde sıklıkla gözlenir ve kanser ilerlemesinin çeşitli yönlerine katkıda bulunur. Büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler, apoptotik hücreler ile etkileşim ve TGF β 1'in kendisini içeren çeşitli uyaranlar tarafından yönlendirilebilir. TGF β 1 geninin transkripsiyonel aktivasyonu, RAS/MAPK, PI3K veya PKC sinyal yollarından ve androjen reseptörünün yanı sıra AP-1, NF κ b, Sp1 ve STAT3 transkripsiyon faktörlerinin hepsine sahip sinyal aracılığıyla aracılık etmektedir. Bu gen içindeki promotör elementlere bağlandığı ve ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Hargadon vd., 2016; Qi vd., 2008).

Diğer taraftan, TGF β 3 geninin ifadesi ise kontrole göre tüm test maddelerinde azalmaktadır. Hücrelerin 6G ile muamelesi ile önemli ölçüde azalan etkinin arttığı grafikte görülmektedir. Bu genin azalan ifadesinin MKKH hücrelerinde AKKH hücrelerine oranla daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca, BA/6G kombinasyonu ile muamele edilen AKKH hücrelerinde kontrole göre TGF β 3 ifadesi artmış ve ancak MKKH hücrelerinde önemli ölçüde azalmıştır. Üstelik AKKH hücrelerinde görülen katlanma değişikliği kontrole yakın bir seviyedeysen MKKH hücrelerinde kontrole göre büyük oranda azalmıştır. TGF β 3 geni, proteinlerin TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü-beta) süper ailesinden salgılanan bir ligandını kodlamaktadır. Bu ailenin ligandları, gen ekspresyonunu düzenleyen SMAD ailesi transkripsiyon faktörlerinin alınmasına ve aktivasyonuna yol açan çeşitli TGF- β reseptörlerini bağlamaktadır. TGF β 3'ün deri, meme, ağız ve mide mukozası dahil olmak üzere bir dizi dokuda tümör oluşumuna karşı gerçekten koruyucu bir rol oynayabileceğini

göstermiştir. Yüksek TGF β 3 ekspresyonu seviyeleri, bu sitokini tümörjenez ile ilişkilendirmiştir (Laverty vd., 2009). Dolayısıyla test maddelerinin antikanser aktiviteye sahip olduğunu, kanser kök hücrelerinde tedavi edici etkiyle birlikte bu genin ifadesini baskıladığını bulgularımızda ortaya koyuyoruz.

MKKH hücrelerinde WNT2 geninin ifadesi BA ile muamele sonrasında kontrole göre önemli ölçüde değişmezken, 6G ve BA/6G ile muamele sonrasında ifadesi azalmıştır. AKKH hücrelerinde de benzer bir sonuç elde edilmiştir. BA'nın etkisi WNT2 ifadesi kontrole göre AKKH hücrelerinde nispi olarak artmıştır. Bu genin ifadesi 6G ve BA/6G'nin etkisi ile MKKH hücrelerinde AKKH hücrelerine oranla daha azalmıştır. Ayrıca AKKH hücrelerinde 6G ve BA/6G'nin etkisiyle WNT2 geninin katlanma değişikliği yakın seviyede iken MKKH hücrelerinde 6G'nin etkisinin WNT2 ifadesini daha da azalttığı görülmektedir. WNT2, plasental vaskülarizasyonda pro-anjiyojenik bir faktör olarak görev yapmaktadır. Ayrıca karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerinde (EC'ler) ve diğer EC'lerde anjiyogenezi arttırmaktadır. Artan WNT2 ekspresyonu, birçok karsinomda saptanmıştır ve tümör progresyonuna işaret etmektedir. İnsan kolorektal kanserinde (CRC), WNT2, kanserle ilişkili fibroblastlarda (CAF'ler) seçici olarak yükselir, bu da artan istila ve metastaza yol açmaktadır (Unterleuthner vd., 2020). Sonuçlarımıza göre, WNT2 ifadesinin azalmış olması, test maddelerinin kanser kök hücrelerindeki tedavi edici etkisini ortaya koymaktadır.

BMP2 geninin MKKH hücrelerindeki test maddelerinin etkisi ile kontrole göre arttığı grafikte görülmektedir. BA'nın etkisi ile 1.5 kattan daha fazla katlanma değişikliği görülürken, 6G etkisi ile 2 kattan fazla katlanma değişikliği ortaya konulmuştur. BA/6G'nin ise ortalama BA ile benzer oranda katlanma değişikliğine sahip olduğu görülmektedir. BA'nın etkisi AKKH hücrelerinde ve MKKH hücrelerinde benzer oranda görünmektedir. Ancak 6G ve BA/6G'nin etkisi iki hücre grubunda da önemli ölçüde farklılık göstermiştir. AKKH hücrelerinde BMP2 geninin ifadesi kontrole göre azalırken MKKH hücrelerinde ise tam tersine önemli ölçüde artmıştır. Transforming büyüme faktörü β ailesine ait olan kemik morfogenetik proteini (BMP), 1965 yılında Urist tarafından keşfedilmiştir. BMP2'nin tümör oluşumunda ve kanserin ilerlemesinde rol oynadığı ortaya konulmuştur. Ancak, BMP2 sinyalizasyonunun karsinom gelişimindeki işlevleri tartışmalıdır. BMP2/4 sinyalinin aktivasyonu, kendi kendini yenilemeyi engelleyebilir, ancak kolon kanserinde kanser kök hücrelerinin farklılaşmasını arttırabilmekte ve kolon kanseri hücrelerinin kemoterapiye

duyarlılığını daha da arttırabildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, BMP'ler ayrıca kanserli hücrelerin epitelialden mezenkimal geçişini (EMT) indükleyebilir ve bu da kanserin büyümesinin ve metastazının artmasına neden olmaktadır. Diğer taraftan, BMP sinyali, meme kanseri, prostat kanseri ve pankreas kanserinde de yüksek oranda eksprese edilmektedir ve bu tümörlerin malign ilerlemesi ile yakından ilişkilidir (Wu vd., 2020). Buna göre, BMP2 gen ifadesi test maddeleri tarafından MKKH hücrelerinde belirli bir oranda baskılanabilmektedir. AKKH hücreleri ise test maddelerinin tedavisine yanıt vermiş ve bu genin ifadesini, özellikle 6G, önemli ölçüde baskılamıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğal aktif bileşenlerden elde edilen yeni farmasötik ürünler son yıllarda kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında, ülkemizde endemik olarak da bulunan *Inula* türlerinin ana bileşenlerinden biri olan bornil asetatın (BA) antikanser etkisi ve 6- gingerol (6G) ile olan sinerjik etkisi A549 hücre hattı ve A549 hücrelerinden izole edilen akciğer kanser kök hücreleri (AKKH) ile MCF-7 hücre hattı ve MCF-7 hücrelerinden izole edilen kanser kök hücrelerinde (MKKH) araştırılmıştır. Bu amaçla; sitotoksik etki, oksidatif stres, apoptotik etki, hücre morfolojisindeki değişiklikler ortaya konulmuştur. Ardından immünohistokimyasal incelemeler (anti-apoptotik belirteçler) gerçekleştirilmiştir. Apoptotik etki hem flüoresan boyama hem de akış sitometrik yöntemlerle desteklenerek incelenmiştir. BA'nın apoptotik etkisi ve 6G ile kombinasyonu, bu tez çalışması kapsamında ilk defa araştırılmıştır.

Sitotoksik etki WST-1 ve NR yöntemleriyle araştırılmıştır. Buna göre 6G, BA, 6G/BA, 5-FU, 5-FU/BA'nın AKKH, A549, MCF-7 ve MKKH'nin canlılığı üzerindeki etkisi doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Hücre canlılığı doz artışıyla birlikte test maddelerinde azalmaktadır. Ayrıca, iki maddenin kombinasyonu gerçekleştirildiğinde sitotoksik etkinin arttığı tüm hücre gruplarında ortaya konulmuştur. Sitotoksikite sonuçlarına göre IC50 değerleri belirlenmiş ve ardından ileri biyokimyasal araştırmalara devam edilmiştir. Yapılan LDH analizine göre, hücre gruplarında test maddelerinin nekrotik hücre ölümünün hücreler üzerinde aktif olmadığı dolayısıyla sitotoksik etkiyi farklı hücre ölüm modu ile gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Hücre morfolojisi ile yaptığımız çalışmalar da bu sonuçları doğrulamaktadır. Morfolojik araştırmalarda ise test maddelerinin etkisi ile test maddeleri ile muamele edilen tüm hücre gruplarında, nükleer kondensasyon, hücresel büzülme, vakuolizasyon ve apoptotik blebbing gibi göze çarpan hücresel değişiklikler gözlemlendiğinden apoptotik aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, test maddesi ile hücrelerin muamelesi sonucunda kontrol gruptaki hücrelere kıyasla hücre sayısında önemli ölçüde düşüş olduğu dolayısıyla sitotoksik etkinin de apoptotik yolla gerçekleştiği düşünülmektedir. Hücre ölümünün nekrotik olarak gerçekleşmiyor olması apoptotik aktivitenin yüksek olabileceğini düşündürmektedir ve dolayısıyla antikanser ajanı olarak kullanılabilirliği konusunda adımlar atılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, Bax ve Bcl-2 apoptotik belirteçleri ile yapılan immünohistokimyasal

çalışmalarda da Bax protein ifadesinin artması ve Bcl-2 ifadesinin azalması, apoptotik etkinin olduğunu göstermektedir. AO/EB yöntemi ve Anneksin V/PI yöntemleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda benzer bir sonuca işaret ederek test maddelerinin apoptotik aktivite yoluyla etki ettiğini göstermektedir. Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda test maddeleri sitotoksik etkiye sahiptir ve apoptozu indüklemektedir.

Fonksiyonel bisiklik bir monoterpen olan bornil asetatın yalnızca antioksidan, anti-inflamatuar ve sitotoksik etkileri gösterilmiştir. BA'nın HeLa, HT29, A549, MCF-7 ve FL (insan amniyon hücreleri) hücre hatlarında sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösteren tek bir çalışma bulunmaktadır (Karan vd., 2018). Yakın zamanda yapılmış bu çalışmada, LDH ve BrdU analizi yapılmış ve hücre morfolojisindeki değişiklikler ters faz mikroskopla fotoğraflanarak gösterilmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara paralel sonuçlar bu çalışma ile de ortaya konulmuştur.

Buna göre, bornil asetat ile 6-gingerolün sinerjik etkisinin olması muhtemel görüldüğünden çalışma kapsamında iki maddenin sinerjik etkisi de araştırılmıştır. Yaptığımız araştırmalara göre, 6G ile BA kombinasyonunun MCF-7 ve MKKH üzerinde daha etkin rol oynadığı ortaya konulmuştur. Her iki maddenin kombinatif etkisi ilk defa bu tez çalışması kapsamında ortaya konulmuştur. İki maddenin kombinatif etkisi ile apoptotik aktivitesi artmakta ve sitotoksik etki daha düşük dozdan itibaren ortaya çıkmaktadır. MKKH ve AKKH ile yapılan çalışmalar bu tez kapsamında ilk defa gerçekleştirilmiştir. MKKH ve AKKH üzerinde maddelerin daha düşük dozdan itibaren etkin role sahip olduğu ve hücre hatlarına oranla apoptotik aktivitenin daha da arttığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, BA, 6G, BA/6G, 5-FU/BA ve 5-FU'nun A549 ve A549 hücrelerinden izole edilen AKKH, MCF-7 hücrelerinde ve bu hücre hattından izole edilen MKKH üzerinde apoptotik ve sitotoksik etkiye sahiptir. Üstelik, nekrotik aktivitenin düşük olduğu tespit edilmiştir. 6G ve BA'nın MKKH ve AKKH üzerinde daha düşük dozda etkin role sahip olması oldukça önem arz etmektedir. Dolayısıyla, bu tez kapsamında, BA kanser kök hücrelerinde de etkin role sahip yeni antikanser ajanı olarak bildirilmektedir. Bu konudaki araştırmalar derinleştirilerek, moleküler düzeydeki yöntemlerle desteklenerek derinleştirilmelidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P., Li, Y. 2018. "Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance", *Cancer Treat Rev.*, 69, 152-163.
- Baliga, M.S., Haniadka, R., Pereira, M.M., D'Souza, J.J., Pallaty, P.L., Bhat, H.P., Popuri, S. 2011." Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51, 499-523.
- Balunas, M.J. ve Kinghorn, A.D. 2005. "Drug discovery from medicinal plants", *Life Sci.*, 78, 431–441.
- Bonofiglio, D., Giordano, C., De Amicis, F., Lanzino, M., Andò, S. 2016. "Natural Products as Promising Antitumoral Agents in Breast Cancer: Mechanisms of Action and Molecular Targets", *Mini Rev Med Chem.*, 16, 596-604.
- Butti, R., Gunasekaran, V.P., Kumar, T.V.S., Banerjee, P., Kundu, G.C.. 2019. "Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications", *Int J Biochem Cell Biol.*, 107, 38-52.
- Cianciosi, D., Varela-Lopez, A., Forbes-Hernandez T.Y., Gasparrini, M., Afrin, S., Reboredo-Rodriguez, P., Zhang, J., Quiles, J.L., Nabavi, S.F., Battino, M., Giampieri, F. 2018. "Targeting molecular pathways in cancer stem cells by natural bioactive compounds", *Pharmacological Res.*, 135, 150-165.
- Gadioli, I.L., Cunha M.S.B., de Carvalho M.V.O., Costa A.M., Pineli L.L.O. 2018. "A systematic review on phenolic compounds in Passiflora plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine", *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 58,5.
- Ghasemi, F., Sarabi, P.Z., Athari, S.S., Esmailzadeh, A. 2019. "Therapeutics strategies against cancer stem cell in breast cancer", 109, 76-81.
- Hermawan, A. ve Putri, H. 2018. "Current report of natural product development against breast cancer stem cells", *Int J Biochem Cell Biol.*, 104, 114-132.
- Hu, Y., Wang, S., Wu, X., Zhang, J., Chen, R., Chen, M., Wang, Y., 2013. "Chinese herbal medicine-derived compounds for cancer therapy: A focus on hepatocellular carcinoma", *J. Ethnopharmacol.* 149, 601–612.
- Ibrahim, A. S., Sobh, M. A., Eid, H. M., Salem, A., Elbelasi, H. H., El-Naggar, M. H., AbdelBar, F. M., Sheashaa, H., Sobh, M. A., & Badria, F. A. (2014). Gingerol-derivatives: emerging new therapy against human drug-resistant MCF-7. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(10), 9941–9948. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2248-7>
- Johnson, S.B., Park, H.S., Gross, C.P., Yu, J.B., 2018. "Use of Alternative Medicine for Cancer and Its Impact on Survival", *J. Natl. Cancer Inst.*, 110, 121–124.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Karan, T., Yildiz, I., Aydin, A., Erenler, R. 2018. "Inhibition of Various Cancer Cells Proliferation of Bornyl Acetate and Essential Oil from *Inula graveolens* (Linnaeus) Desf.", *Rec. Nat. Prod.*, 12, 273-283.
- Ko, E-Y. ve Moon, A. 2015. "Natural Products for Chemoprevention of Breast Cancer", *Journal of Cancer Prevention*, 20, 223-231.
- Kuete, V., Ngnintedo, D., Fotso, G.W., Karaosmanoğlu, O, Ngadjui, B.T., Keumedjio, F., Yeboah, S.O., Andrae-Marobela, K., Sivas, H. 2018. "Cytotoxicity of seputhecarpan D, thonningiol and 12 other phytochemicals from African flora towards human carcinoma cells", *BMC Complement Altern Med.*, 18, 36.
- Li, X., Wang, X., Xie, C., Zhu, J., Meng, Y., Chen, Y., Li, Y., Jiang, Y., Yang, X., Wang, S., 2018. "Sonic hedgehog and Wnt/ β -catenin pathways mediate curcumin inhibition of breast cancer stem cells", *Anticancer Drugs*, 29 (3), 208–215.
- Lima, R.M.T., Dos Reis A.C., de Menezes A.P.M., Santos, J.V.O., Filho, J.W.G.O., Ferreira, J.R.O., de Alencar, M.V.O.B., da Mata, A.M.O.F., Khan, I.N., Islam, A., Uddin, S.J., Ali, E.S., Islam, M.T., Tripathi, S., Mishra, S.K., Mubarak, M.S., Melo-Cavalcante, A.A.C. 2018. "Protective and therapeutic potential of ginger (*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: A comprehensive review", *Phytother Res.*, 32, 1885-1907.
- Liu, H-T. ve Hoa, Y-S. 2018. "Anticancer effect of curcumin on breast cancer and stem cells", *FSHW*, 7, 134–137.
- Manatunga, D. C., de Silva, R. M., de Silva, K., Wijeratne, D. T., Malavige, G. N., & Williams, G. (2018). Fabrication of 6-gingerol, doxorubicin and alginate hydroxyapatite into a bio-compatible formulation: enhanced anti-proliferative effect on breast and liver cancer cells. *Chemistry Central journal*, 12(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0482-6>
- Manure, J.Y., Naikwade, N.S., Shivaji, S., Sangli, N., 2018. "A Review on : Plants as Anticancer ", 6, 40–49.
- Mitra, S. ve Dash, R. 2018. "Natural Products for the Management and Prevention of Breast Cancer", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 23.
- Nalla, L.V., Kalia, K., Khairnar, A. 2019. "Self-renewal signaling pathways in breast cancer stem cells.", *Int J Biochem Cell Biol.*, 107, 140-153.
- Rajesh, E., Sankari, L. S., Malathi, L., Krupaa, J. R. 2015. "Naturally occurring products in cancer therapy", *J Pharm Bioallied Sci.*, 7, S181-3.
- Shao, Y., Yu, Y., Li, C., Yu, J., Zong, R., Pei, C. 2016. "Synergistic effect of Quercetin and 6-gingerol treatment in streptozotocin induced type 2 diabetic rats and poloxamer P-407 induced hyperlipidemia", *RSC Adv.*, 6, 12235-42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Shao, Y., Yu, Y., Li, C., Yu, J., Zong, R., Pei, C. 2016. "Synergistic effect of Quercetin and 6-gingerol treatment in streptozotocin induced type 2 diabetic rats and poloxamer P-407 induced hyperlipidemia", *RSC Adv.*, 6, 12235-42.
- Siegel, R., Miller, K.D., Ahmedin, J., 2019. "Cancer Statistics", *Ca Cáncer J.* 67, 7–30.
- Stadler, C., Rexhepaj, E., Singan, V.R., Murphy, R.F., Pepperkok, R., Uhlén, M., Simpson, J.C., Lundberg, E. 2013. "Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells", *Nat Methods.*, 4, 315-23.
- Sun, Y., Zhao, Y., An, S., Chen, J., 2018. "ScienceDirect The theory development of traditional Chinese medicine constitution : A review", *J. Tradit. Chinese Med. Sci.*, 6.
- Tan, A.S. ve Berridge, M.V. 2000. "Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents", *Journal of Immunological Methods*, 238, 59-68.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 76, 4350-4.
- Türkiye kanser istatistikleri, Türkiye birleşik veri tabanı, 2017, https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR._uzuuun.pdf Son erişim tarihi: 09.03.2019.
- Wanchai., A., Jane, A.M., Bob, S.R. 2018. "The Value of Complementary and Alternative Medicine for Women with Breast Cancer", *Alternative and Complementary Therapies*, 24, 2.
- West, H.J., 2018. "Complementary and alternative medicine in cancer care", *JAMA Oncol.* 4, 139.
- Woo, Y., Oh, J., Kim, J.-S., 2017. "Suppression of Nrf2 activity by chestnut leaf extract increases chemosensitivity of breast cancer stem cells to paclitaxel", *Nutrients* 9 (7), 760.
- World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü), 2019 yılı kanser verileri, <http://www.who.int/cancer/en/> , Erişim tarihi: 09.03.2019.
- Zakaria, Z., Gan, S.H., Mohamed, M., 2018. "In vitro studies of Asian medicinal plants with potential activity against breast cancer", 6, 49–55.
- Zhang, F., Zhang, J.G., Qu, J., Zhang, Q., Prasad, C., Wei, Z.J. 2017. "Assessment of anti-cancerous potential of 6-gingerol (Tongling White Ginger) and its synergy with drugs on human cervical adenocarcinoma cells", *Food Chem Toxicol.*, 109, 910-922.
- Zhu, Y., Wang, F., Zhao, Y., Wang, P., Sang, S. 2017. "Gastroprotective [6]-Gingerol Aspirinate as a Novel Chemopreventive Prodrug of Aspirin for Colon Cancer", *Sci. Rep.*, 7, 40119.