

Fisetin'in Hücre Çoğalması ve Apoptoz Üzerindeki Etkisinin İnsan Glioblastoma
Multiforme (T98G) Hücre Dizisinde Araştırılması

Fulya Pak

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2016

Investigation of The Fisetin Effects on Glioma Cells Proliferation and Apoptosis

Fulya Pak

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

June 2016

Fisetin'in Hücre çoğalması ve Apoptoz Üzerindeki Etkisinin İnsan Glioblastoma
Multiforme (T98G) Hücre Dizisinde Araştırılması

Fulya Pak

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Pınar Öztopcu Vatan

Bu Tez BAP Tarafından \201319A112\ no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir

Haziran 2016

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Fulya Pak'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Fisetin’in Hücre Çoğalması ve Apoptoz Üzerindeki Etkisinin İnsan Glioblastoma Multiforme (T98G) Hücre Dizisinde Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ayşe Pınar Öztopcu Vatan

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Ayşe Pınar Öztopcu Vatan

Üye : Prof. Dr. Zerrin İncesu

Üye : Doç. Dr. Hakan Şentürk

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Ayşe Pınar Öztöpcü Vatan danışmanlığında hazırlamış olduğum “Fisetin’in Hücre Çoğalması ve Apoptoz Üzerindeki Etkisinin İnsan Glioblastoma Multiforme (T98G) Hücre Dizisinde Araştırılması” başlıklı YÜKSEK LİSANS 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. 01/06/2016

Fulya Pak
İmza

ÖZET

Primer beyin tümörlerinin büyük bir kısmı glial kaynaklıdır ve bunların en tehlikeli türü glioblastoma multiforme (GBM)'dir. Kemoterapide kullanılan ilaçların az sayıda olması ve kullanılan ilaçlara karşı kanserli hücrelerin direnç geliştirmesi tedaviyi oldukça zorlaştırmaktadır. Fisetin, bitkilerde yaygın olarak bulunan doğal bir flavonoid çeşittir. Yapılan araştırmalarda çeşitli kanser hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı ve farklı mekanizmalarla apoptotik hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada ilk olarak 1, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 μ M fisetin dozlarının T98G hücre morfolojisi üzerindeki etkileri ters ışık mikroskobu ile belirlenirken, hücre çoğalması üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile incelenmiştir. 24 ve 48 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla, 93 ve 75 μ M olarak hesaplanmıştır. Fisetinin normal hücreler üzerindeki morfolojik ve sitotoksik etkilerini belirlemek ve T98G hücreleri ile karşılaştırmak için BEAS-2B hücreleri kullanılmıştır. 24 ve 48 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 270 ve 90 μ M olarak hesaplanmıştır. Seçilen fisetin dozlarının her iki hücrede de, apoptotik fragmentasyonu nekrotik orana kıyasla daha fazla arttırdığı belirlenmiştir. T98G hücrelerinde 25 ve 50 μ M fisetin dozlarının apoptozla ilgili *KASPAZ 3*, *9*, *8* ve *BAX* genlerinin ifadesini artırırken, *BCL-2* ve *SURVIVIN* genlerinin ifadesini azalttığı gözlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ise *KASPAZ 3*, *9*, *8*, *BAX*, *BCL-2* ve *SURVIVIN* genlerinin ifadesini 50 μ M dozunda artırırken, 100 ve 200 μ M dozlarında azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca fisetinin T98G hücrelerinde yarattığı morfolojik değişiklikler TEM mikroskobuyla incelenmiştir.

Çalışmada, fisetinin glioma hücrelerinde doza ve zamana sitotoksik ve apoptotik bir etkiye sahip olduğu ilk kez belirlenmiştir. Ayrıca normal hücreler ile karşılaştırıldığında fisetinin sitotoksik ve apoptotik etkilerinin glioma hücrelerinde daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarının fisetinin ileride glioma tedavisinde kullanılabilir bir ilaç olarak geliştirilmesinde yapılacak olan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Glioma, fisetin, sitotoksikite, apoptoz, RT-PCR

SUMMARY

A large number of primary brain tumors are glial tumors and glioblastoma multiforme (GBM) is the most dangerous group of them. Cancer cells which develop resistance to chemotherapy drugs and a small number of used drugs cause difficulties on cancer therapy. Fisetin is a natural flavonoid. Previous studies have been reported that fisetin inhibit proliferation and induce apoptosis in several cancer types.

In our research, first we investigated the antiproliferative and morphology effects of 1, 50, 100, 200, 300, 400 and 500 μM doses of fisetin by inverted light microscope and MTT assay. The IC_{50} values of fisetin for 24 and 48 h are; 93 and 75 μM on T98G cells respectively. After BEAS-2B cells used to compare with morphological and T98G cells to the cytotoxic effects on normal cells of the fisetin. The IC_{50} values of fisetin for 24 and 48 h are; 270 and 90 μM on T98G cells respectively. Selected fisetin doses have increased DNA fragmentation on both cell lines, apoptotic was greater than necrotic fragmentation. We observed that the expression of apoptotic process related genes; *CASPASE 3*, 9, 8, *BAX* were increased while *BCL-2* and survivin was reduced by selected doses of 25 and 50 μM fisetin in T98G cell lines. We observed that the expression of genes; *CASPASE 3*, 9, 8, *BAX*, *BCL-2* and *SURVIVIN* were increase the dose of 50 μM , it was found to decrease from 100 and 200 μM doses of fisetin in BEAS-2B cell line. Finally, it is observed that alterations of T98G cell morphology treated with fisetin by transmission electron microscopy (TEM).

Consequently, depending on dose and time of fisetin in T98G cells were determined first to be stronger cytotoxic and apoptotic effects than normal cells. The results in the treatment of glioma cancer, we believe that it will lead to *in vivo* and *in vitro* studies, which will be held in the future.

Keywords: Glioma, fisetin, cytotoxicity, apoptosis, RT-PCR

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini, yardımlarını ve deneyimlerini benden esirgemeyen, ilerlediğim bu yolda beni her türlü konuda aydınlatan değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gerek laboratuvar çalışmalarım sırasında gerekse eğitim alanında kendimi geliştirmem de büyük katkıları olan saygın hocalarım Prof. Dr. Mediha CANBEK, Prof. Dr. Selda KABADERE, Doç. Dr. Müge SAYITOĞLU, Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU, Doç. Dr. Onur KOYUNCU, Doç. Dr. Hakan ŞENTÜRK, Doç. Dr. İlknur DAĞ, Yrd. Doç. Dr. Gökhan KUŞ, Uzman Dr. Bükay YENİCE GÜRSU, Uzman Tayfun ŞENGEL' e ve beni yetiştiren bölümümün tüm hocalarına teşekkürü borç bilirim.

Çalışmamda 201319A112 nolu projeyle gereken finansal desteği sağlayan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu'na teşekkür ederim.

Laboratuvar ortamında çalışmalarım sırasında desteklerini benden eksik etmeyen ve iyi kötü her anımda yanımda olan arkadaşlarım Merve YILDIZ, Dr. Başak DURMUŞ, Melek GÜNİNDİ KORKUT, Emine UYARBAŞLAR İNAN, Dr. Ahmet ÖZEN, Dr. Özgül ÖZALP KINACI, Dr. Çağrı ÖNER, Yasemin YAZ, Sinem GÜR SOY, Işıl BOZ, Nihal KESGİN YILDIZ ve Hira UĞURLUGÜNGÖR'e teşekkür ederim.

Son olarak ise tüm hayatım boyunca bana her türlü maddi ve manevi desteklerini sağlayan, yaşamımın her anında sevgilerini benden hiç eksik etmeyen annem Hülya PAK, babam Aslan PAK'a, uzaklarda olsa da hep kalbimde olan anneannem Naciye YARDIMCI'ya, tüm aileme ve sevdiklerime teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Sinir Sistemi Morfolojisi	3
2.1.1. Nöron	3
2.1.2. Glia (Nöroglia).....	4
2.2. Hücre Döngüsü	7
2.2.1. Hücre döngüsünün kontrol noktaları.....	8
2.2.2. Hücre döngüsünün kontrol edilmesinden sorumlu olan moleküller	9
2.3. Hücre Ölümü.....	9
2.3.1. Nekroz	10
2.3.2. Apoptoz	10
2.3.3. Otofaji	13
2.4. Sinir Sistemi Tümörleri	14
2.5. Glioblastoma multiforme (GBM)	16
2.6. Fisetin.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler	20
3.2. Deneylerde Kullanılan Hücre Hatları	22
3.3. Hücrelerin Kültüre Alınması	22
3.4. Hücre Serilerinin Pasajlanması	22
3.5. Hücrelerin Sayımı	23
3.6. Hücrelerin Ekilmesi	23
3.7. İlaç Dozlarının Hazırlanması	24

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.8. Hücrelerin Ters Işık Mikroskobu İle Morfolojik Görüntülenmesi	25
3.9. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Hücre Çoğalmasının Belirlenmesi (MTT)	25
3.10. DNA Fragmantasyonunun ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi	27
3.11. Hücre Kültüründen Total RNA'nın Elde Edilmesi.....	28
3.11.1. RNA kalite tayini	29
3.12. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	30
3.13. Gen Anlatım Düzeylerinin Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi İle Belirlenmesi.....	30
3.14. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) İle Hücrelerin Görüntülenmesi.....	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
4.1. Fisetinin T98G ve BEAS-2B Hücre Dizileri Üzerindeki Morfolojik Etkilerinin Belirlenmesi	34
4.2. Fisetinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri.....	37
4.3. Fisetinin T98G ve BEAS-2B Hücre Dizileri Üzerindeki Apoptotik ve Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi.....	42
4.4. Gen Anlatım Düzeylerinin Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi İle Hesaplanması.....	44
4.5. Fisetinin Hücresel Etkilerinin T98G Hücrelerinde TEM İle İncelenmesi.....	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sinir hücresi.....	4
2.2. Glia hücrelerinin şematize görünümü a: Protoplazmik astrosit b: Fibröz astrosit: Mikroglia d: Oligodendroglia	5
2.3. Hücre döngüsü ve aşamaları.....	7
2.4. Apoptoz uyarımında iç ve dış yolak işleyiş mekanizmaları	12
2.5. Glioblastoma multiforme gelişmiş bir beynin kesit görüntüsü	17
2.6. Temozolomid ve karmustin (BCNU) ilaçlarının organik yapısı	17
2.7. Flavonoid iskeleti	18
2.8. Fisetinin organik yapısı	18
3.1. MTT boyasının formazana indirgenme reaksiyonu.....	26
4.1. Fisetin dozlarının T98G hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi: a) Kontrol, b) 1 µM, c) 50 µM, d) 100 µM, e) 200 µM, f) 300 µM, g) 400 µM, h) 500 µM	35
4.2. Fisetin dozlarının T98G hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi: a) Kontrol, b) 1 µM, c) 50 µM, d) 100 µM, e) 200 µM, f) 300 µM, g) 400 µM, h) 500 µM	35
4.3. Fisetin dozlarının BEAS-2B hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi: a) Kontrol, b) 1 µM, c) 50 µM, d) 100 µM, e) 200 µM, f) 300 µM, g) 400 µM, h) 500 µM	36
4.4. Fisetin dozlarının BEAS-2B hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi: a) Kontrol, b) 1 µM, c) 50 µM, d) 100 µM, e) 200 µM, f) 300 µM, g) 400 µM, h) 500 µM	36
4.5. Fisetinin doza ve zamana bağlı olarak T98G hücre çoğalması üzerindeki etkisi.....	38
4.6. Karmustin dozlarının T98G hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik etkisi.....	40
4.7. Fisetinin doza ve zamana bağlı olarak BEAS-2B hücre çoğalması üzerindeki etkisi..	40
4.8. Uygulanan fisetin dozlarının T98G hücrelerinde apoptotik ve nekrotik etkisi	42
4.9. Fisetin uygulanan BEAS-2B hücrelerinin 24 saatteki apoptoza ve nekroza bağlı Enrichment faktör oranları.....	44
4.10. T98G hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) KASPAZ 3 ve b) KASPAZ 9 genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

- 4.11.** T98G hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) *KASPAZ 8* ve b) *SURVIVIN* genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....46
- 4.12.** T98G hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) *BAX* ve b) *BCL-2* genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....47
- 4.13.** BEAS-2B hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) *KASPAZ 3* ve b) *KASPAZ 9* genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....49
- 4.14.** BEAS-2B hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) *KASPAZ 8* ve b) *SURVIVIN* genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi.....50
- 4.15.** BEAS-2B hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) *BAX* ve b) *BCL-2* genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi51
- 4.16.** T98G kontrol grubu hücrelerinin mikrolararı. a) Normal morfolojik özellikler gösteren kontrol grubu. b) Çekirdek ve hücre organellerinin daha yüksek büyütme mikroları. n, çekirdek; mi, mitokondri; er, endoplazmik retikulum.....52
- 4.17.** 50 µM fisetin uygulanan T98G hücrelerinde gözlenen değişiklikler. n, çekirdek; Lp, yağ damlacıkları; v, farklı büyüklüklerdeki veziküler yapılar.....52
- 4.18.** 50 µM fisetin uygulanan T98G hücrelerinde gözlenen değişiklikler. a) Genel hücre morfolojisi değişiklikleri. b) Daha yüksek büyütmede çekirdek ve organel yapısındaki hasarlar. n, çekirdek; mi, mitokondri; er, endoplazmik retikulum; av, otofajik vakuol; Lp, yağ damlacıkları.....53
- 4.19.** 100 µM fisetin uygulanan T98G hücrelerinde gözlenen değişiklikler. a) Genel hücre morfolojisi değişiklikleri. b) Daha yüksek büyütmede çekirdek ve organel yapısındaki hasarlar. n, çekirdek; v, veziküler yapılar; mlb, multilamellar cisimcikler....53

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Nekroz ile apoptozun karşılaştırılması	13
2.2. Santral sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması.	15
3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler	20
3.2. Deneylerde kullanılan sarf malzemeler	21
3.3. Deneylerde kullanılan hücre dizileri.....	22
3.4. Fisetin ve çözücü kontrol (DMSO) uygulama grupları	24
3.5. Karmustin ve çözücü kontrol (DMSO) uygulama grupları	24
3.6. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon çözeltisi.....	30
3.7. Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri.....	31
3.8. Gerçek zamanlı PZR tepkime karışımı.....	32
3.9. Gerçek zamanlı PZR tepkime programı.....	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Celsius degree (Santigrat derece)
μL	mikrolitre (10 ⁻⁶ litre)
μm	mikrometre (10 ⁻⁶ metre)
μM	mikromolar (10 ⁻⁶ molar)
cm ²	santimetrekare
dk	dakika
g	gram
mL	mililitre (10 ⁻³ litre)
mM	milimolar (10 ⁻³ molar)
nm	nanometre

Kısaltmalar

Acıklama

A549	İnsan akciğer karsinomu hücre dizisi
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit)
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
Bcl-2	B hücre lenfoma
BOS	Beyin omurilik sıvısı
C ₂ H ₅ OH	Etanol
CDI	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri
CDK	Siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar
CDI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
CH ₂ O	Formaldehit
CYC	Siklin bağımlı kinazlar
CDK	Hücre döngüsü siklinleri
ÇSS	Çevresel sinir sistemi
DAPI	4 ',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DU145	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EJ	İnsan mesane kanseri hücre dizisi
FBS	Fetal bovine serum (Fetal dana serumu)
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GBM	Glioblastoma Multiforme
GBM8401	İnsan glioma kanser hücre dizisi
HBSS	Hank's Balance Salt Solution (Hank'ın dengelenmiş tuz solüsyonu)
HeLa	İnsan serviks karsinom hücre dizisi
Hep G2	İnsan hepatosellüler karsinom hücre dizisi
HL-60	İnsan lösemi kanser hücresi hücre dizisi
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
Huh-7	İnsan hepatokarsinoma hücre dizisi
HUVEC _s	İnsan umbilikal ven endotel hücre dizisi
HT-29	İnsan kolorektal karsinom hücre dizisi
IC ₅₀	Hücrelerin %50'sini öldüren doz
IAF	İnhibitör apoptoz faktörü
ICAD	Kaspaz ile aktifleşen DNaz inhibitörü
LNCaP	İnsan prostat karsinom hücre dizisi
MDA-MB-231	İnsan meme adenokarsinoma hücre dizisi
MCF 7	İnsan meme karsinom hücre dizisi
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
J82	İnsan mesane kanseri hücre dizisi
PBS	Fosfat buffer saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
PC3	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RCF	Rölatif Santrifüj Gücü
RL95-2	İnsan endometrial karsinoma hücre dizisi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb	Retinablastoma
SPSS	Statistics program for social and science
SK-HEP-1	İnsan hepatosellüler karsinoma hücre dizisi
Smac	İkincil mitokondri aracılı kaspaz aktivatörü
T24	İnsan mesane kanseri hücre dizisi
T98G	İnsan glioblastoma multiforme hücre dizisi
TNF	Tümör nekroz faktör
vd.	Ve diğerleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser; fiziksel, kimyasal ya da biyolojik etkenler sonucunda hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşan kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir (Lodish vd., 2011). Günümüzde kanser, hala tüm dünyadaki en önemli sağlık problemlerinden birisidir. Dünya sağlık örgütünün (WHO) yaptığı istatistiksel çalışmalara göre kanser insanda ölüme yol açan nedenler arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada gelmekte olup tüm ölümlerin yaklaşık %23,3' ünü oluşturmaktadır (Ma ve Yu, 2006).

Intrakranial tümörler bütünüyle bakıldığında, bütün kanserlerin yaklaşık olarak % 1,5'inden ve bütün kansere bağlı ölümlerin % 2'sinden sorumludur. Kansere bağlı ölümlerde dördüncü sıradadır. En tehlikeli astrositik tümörlerden biri olan glioblastoma multiforme (GBM), tüm intrakraniyal tümörlerin %12-15'ini ve astrositik tümörlerin %50-60'ını oluşturmaktadır. Bu tümörler, genellikle 45-70 yaş arasındaki erişkin bireylerde sıklıkla görülürken, çocuklarda görülme oranı daha azdır ve bilinen en hızlı seyirli ölümcül tümörlerdendir (Tuğruli, 2008; Mamati, 2006). Genel olarak GBM teşhisi konulan bir hastaya ilk olarak tümör bulunan alanın temizlenebilmesi için cerrahi müdahale yapılmaktadır. Ardından ise radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları ile yaşam süresi uzatılmaya çalışılmaktadır (Maher vd., 2006). Tümörün tedavisinde kullanılan radyoterapinin beyinde hasar oluşturması, cerrahi müdahale ile tümör bulunan bölgenin tam temizlenememesi ve kullanılan kemoterapötik ilaç sayısının sınırlı olmasıyla birlikte kanserli hücrelerin kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirmesi bu hastalığın tedavisini güçleştirmektedir (Das vd., 2008; Reithmeier vd., 2010). Bu nedenle tedavisinde yan etkileri az, fakat daha etkili yeni kimyasal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Doğal maddeler son yıllarda ilaç etken maddesi keşfinde önemli bir kaynak olarak görülmektedir. İnsanoğlu doğal kaynaklardan ve bitkilerden tedavi ve korunma amaçlı olarak asırlardır yararlanmaktadır. Flavonoidler, bitkisel kaynaklı besinlerde doğal olarak bulunan ve 9000'den fazla çeşidi olan bileşiklerdir. Flavonoidlerle yapılan ilk çalışmalarda insanların kalp sağlığını koruyucu etkisinin olduğu bulunurken, daha sonra yapılan çalışmalarda ise, bu bileşiklerin çeşitli biyolojik etkilere sahip olduğu

belirlenmiştir (Choi, 2007; Sghaiera vd., 2011). Fisetin, flavonoidlerin bir alt grubu olan flavanol bileşiklerindendir. Yapılan çalışmalarda, fisetin'in farklı konsantrasyonların da çeşitli tümör hücrelerinde hücre döngüsünü durdurarak ve/veya değişik sinyal yolları üzerinden apoptoz mekanizmasını tetikleyerek hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (Chen vd., 2002; Lu vd., 2005).

Bu çalışmada ilk olarak insan glioblastoma multiforme (T98G) hücre dizisi üzerindeki farklı fisetin dozlarının doza ve zamana bağlı olarak hücre morfolojisi ve çoğalması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. T98G hücrelerinde fisetin oluşturduğu morfolojik değişimler elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada seçilen dozların apoptoz/nekroz oranları ve *KASPAZ 3*, *9*, *8*, *BAX*, *BCL-2* ve *SURVİVİN* gen ekspresyonları üzerindeki etkileri de ilk defa incelenmiştir. Son olarak da fisetin normal hücreler üzerindeki olası morfolojik, sitotoksik ve apoptotik etkileri sağlıklı insan bronşial epitelyum (BEAS-2B) hücre dizisinde araştırılmıştır. Bu şekilde fisetin glioma hücresi ve normal hücre üzerindeki morfolojik, sitotoksik, apoptotik ve seçilen gen ekspresyonları üzerindeki etkileri ilk kez karşılaştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Sinir Sistemi Morfolojisi

Sinir sistemi organizmanın çevresinden veya kendi iç ortamından gelen uyarıları alarak değerlendiren, sinir impulsu şeklinde duyu merkezlerine, duyu merkezlerinden de hedef organlara iletebilen oldukça karmaşık bir iletişim ağıdır. Organizma bu yolla kendi iç ve dış ortamı arasında iletişimi kurmakta ve iç dengesinin devamlılığını sağlamaktadır (Deniz, 1989).

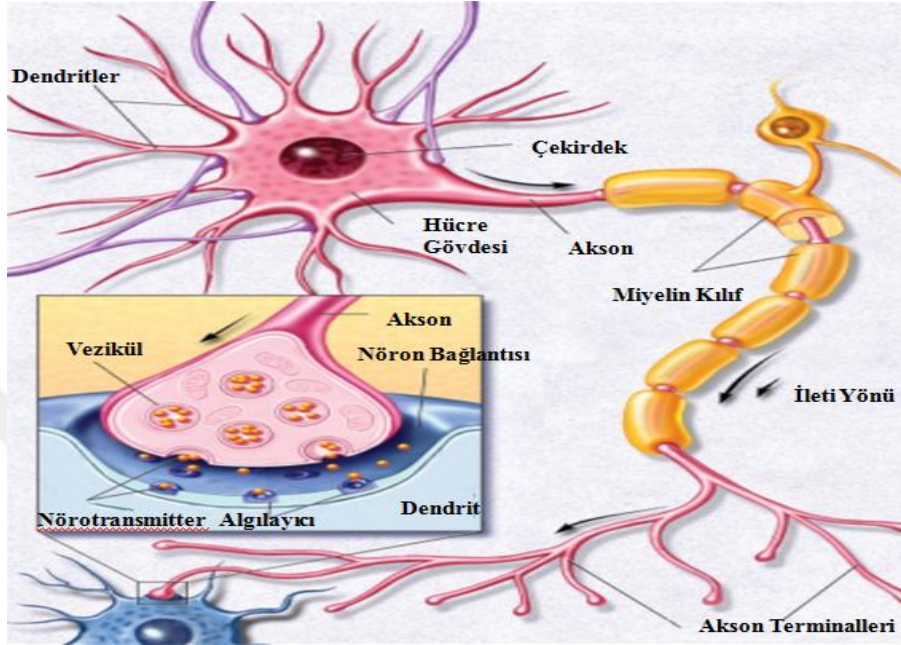
Sinir dokusu, uyarılabilen ve uyarıyı iletebilme yeteneğine sahip özelleşmiş ektodermden köken alan hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücreler mekanik, ışık, ısı, ses, koku, basınç gibi çeşitli enerji tiplerine duyarlı olup, bunları aksiyon potansiyeli adı verilen özel uyarı biçimine dönüştürebilme yeteneğindedirler (Berne ve Levy, 1998).

Sinir sistemi mikroskobik olarak incelendiğinde iki farklı hücre grubundan oluşmaktadır. Bunlardan birincisi nöronlar, ikincisi ise glial (astrosit, oligodendrosit, ependimal) hücrelerdir (Buatti vd., 1996).

2.1.1. Nöron

Sinir sistemini oluşturan en önemli hücrelerden birisi nöronlardır. İçten ve dıştan gelen farklı özellikteki uyarıları algılayarak, diğer nöronlara ya da sinir sistemi dışındaki hücrelere iletmekle görevlidirler. Nöronlar; çekirdek, sitoplazma ve hücre organellerini içeren bir hücre gövdesi (soma) ile bu hücre gövdesinden çıkan nörit adı verilen sitoplazmik uzantılardan oluşurlar (Berne ve Levy, 1998). Nöritler, uyarıyı taşıdıkları yöne bağlı olarak akson ve dendrit olmak üzere ikiye ayrılır. Dendritler uyarıyı hücre gövdesine doğru taşıırken, aksonlar ise uyarıyı hücre gövdesinden alıp daha uzaktaki bölgelere taşımaktadır. Dendritler bir ve birden fazla sayıda olabilirken, her sinir hücresinin sadece bir aksonu bulunur. Akson uzunluğu ise bir mikrondan (μ), bir metreye kadar değişebilen farklı uzunluklarda olabilir. Aksonlar, akson yumruları veya sinaptik yumrular adı verilen ve içlerinde bol miktarda vezikül içeren çok sayıda düğme şeklindeki

oluşumlarla sonlanır. Veziküller içinde nörotransmitter olarak tanımlanan ve bir nöronda aksiyon potansiyeli olarak taşınan bilginin, diğer bir nörona aktarılmasında aracılık eden molekülleri içermektedirler (Şekil 2.1) (Akay, 1996).



Şekil 2.1. Sinir Hücresi (Carey, 2006).

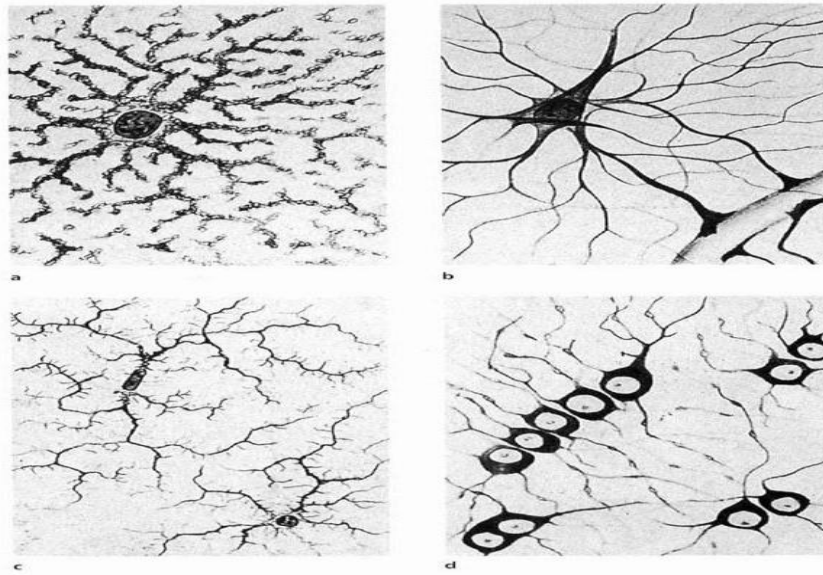
2.1.2. Glia (Nöroglia)

Sinir sisteminde, nöronların dışında farklı yapı ve özelliklere sahip olan hücreler de vardır. Bu hücelere, Virchow isimli bilim adamı tarafından 1860 yılında, nöronların etrafında bulunmaları nedeni ile nöroglia (nerve glia) adı verilmiştir (Berne ve Levy, 1998). Nöronlar bölünme özelliğine sahip olmamalarına rağmen, glia hücrelerinin tamamı bölünme özelliği göstermektedir (Carpenter, 1976). Glia hücreleri sayıca nöronlardan fazladır. İnsan beynindeki hücrelerin yaklaşık % 90'ının glia hücrelerinden oluştuğu bilinmektedir (He vd., 2002; Kandel vd., 2000). Glia hücreleri mikrogliya ve makrogliya hücreleri olmak üzere iki kısımda incelenebilir.

Mikrogliya hücreleri, makrogliya hücrelerinden morfolojik olarak daha küçük olup nöral orijinli değildir. Kemik iliğinden köken alır ve sinir sistemine kan damarları aracılığıyla yerleşirler. Merkezi Sinir Sisteminde (MSS) sayıları çok olmamakla birlikte beynin hem ak hem de boz maddesinde bulunabilirler. Bu hücreler beyin makrofajları olup

mononükleer fagositik sistemin santral sinir sistemindeki temsilcileridir (Patton vd., 1989). Mikrogliaların, multiple skleroz, kazanılmış immün eksikliği (AIDS) ile ilişkili demans, Parkinson ve Alzheimer gibi pek çok hastalıkta aktive olduğu düşünülmektedir (Kandel vd., 2000; Temburni ve Jacob, 2001).

Makroglia hücreleri; endim, oligodendrosit ve astrosit hücrelerinden oluşmaktadır. Endim hücreleri, beyin-omurilik sıvısı (serebrospinal sıvı, BOS) ile dolu olan beyin ve omurilik boşluklarının içini döşer. Epitel hücrelerine benzer yapıları vardır, dış yüzeylerinde bulunan silleri hareket ettirerek beyin omurilik sıvısının hareketini sağlarlar (Şekil 2.2). Mitokondri, golgi ve granüllü endoplazmik retikulum gibi organellere sahiptirler (Akay, 1996).



Şekil 2.2. Glia hücrelerinin şematize görünümü. a: Protoplazmik astrosit b: Fibröz astrosit c: Mikroglia d: Oligodendroglia (Verkhatsky vd., 1998).

Oligodendrosit hücreleri periferik sinir sistemindeki Schwann hücrelerinin santral sinir sistemindeki karşılığıdır. Schwann hücreleri çevresel sinir sistemindeki (ÇSS) sinir tellerinin, oligodendrositler ise MSS'deki sinir tellerinin miyelin kılıflarının oluşmasından sorumludur (Şekil 2.2). Bu sayede aksonu çevresinden izole ederek elektriksel uyarıların iletimini hızlandırırlar. Bu hücreler, Schwann hücrelerinden farklı olarak birden fazla aksonun miyelinizasyonuna katılabilirler. (Kandel vd., 2000; Markiewicz ve Lukomska, 2006). Astrositlerden daha küçük olan oligodendrosit hücreleri ektoderm kökenli olup, beyinin hem ak, hem de boz maddesinde bulunabilirler. Bu hücrelerin uzantıları diğer glia

hücrelerinden daha az sayıda olup boyları ise daha kısadır. Ayrıca çekirdekleri astrosit çekirdeğinden daha küçük olup daha koyu boyanmaktadır (Akay, 1996). Hücre organeli olarak sitoplazmalarında çok sayıda mitokondri, büyük bir golgi kompleksi ve granüllü endoplazmik retikuluma sahiptirler (Junqueira vd., 1993). Oligodendrositler somatik sinir sisteminde, varolan miyelinin devamlılığının sağlanmasında görev alırlar, fakat zarar görmüş miyelini yeni baştan sentezleyemezler (Banlı, 1997).

Astrositler, MSS’de destek görevi yapan, ektodermal kökenli, fibroblast benzeri hücrelerdir. Çok sayıda uzantıya sahip, en büyük glia hücreleridir. Genellikle yıldız şeklindedirler ve çok sayıda uzun uzantıları olan astrositler bu uzantılarının kalınlığına göre fibröz astrosit ve protoplazmik astrosit olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 2.2).

Astrositlerin sinir sisteminde önemli görevleri vardır. Bu görevlerden bazıları aşağıda sıralanmaktadır.

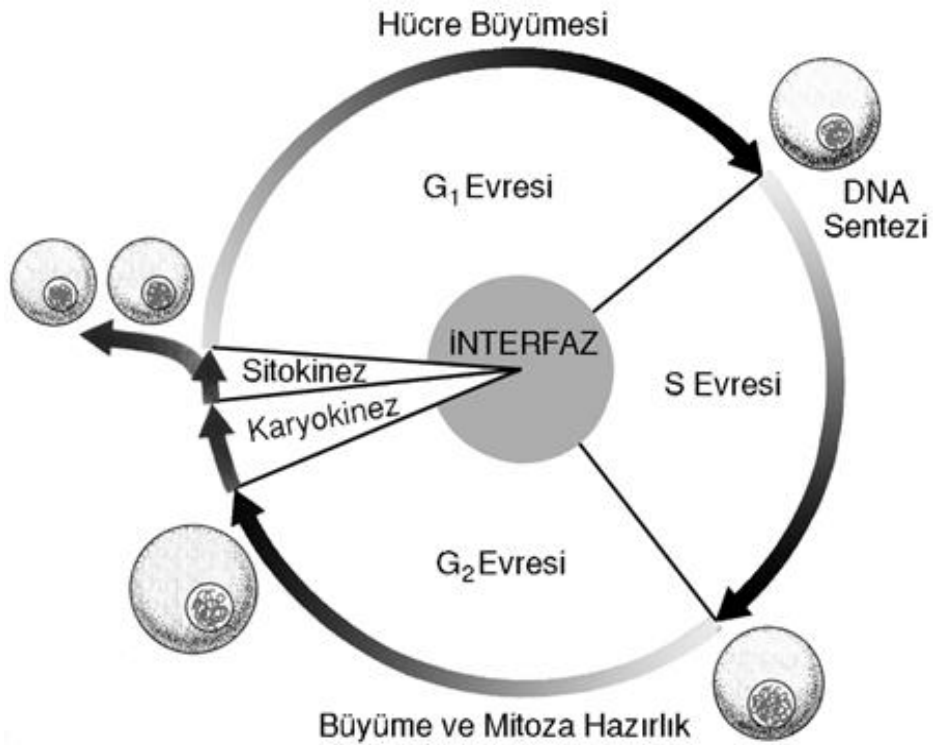
1. Nöron ve kan damarlarının üzerinde uç-ayaklar (end-feet) oluştururlar. Bu sayede nöronları beslerler.
2. Hasarlı dokuda oluşan atıkları mikrogliya hücreleri ile birlikte uzaklaştırarak doku iyileşmesinde de görev almaktadırlar. Sitoplazmalarında bol miktarda glikojen partikülleri bulunmaktadır. Gerekli olan enerjiyi bu sayede sağlarlar (Junqueira vd.,1993; Carpenter, 1976).
3. Astrosit hücreleri ayrıca kan damarlarının endotel hücreleri ile sıkıca birleşmeleri sonucunda kan-beyin bariyer engelinin oluşmasında görev alırlar (Kandel vd., 2000).
4. Nöronlar arası ekstrasellüler alandaki potasyum (K^+) iyon düzeyinin korunmasına yardım ederler. Bu hücreler K^+ iyonuna karşı yüksek oranda geçirgendir ve artmış olan K^+ miktarını içlerine alarak komşu nöronları fazla K^+ iyon artışına karşı korurlar (Maragakis ve Rothstein, 2006).
5. Nörotransmitterleri sinaptik bölgeden salındıktan sonra tutabilirler ve bu çevredeki transmitterleri uzaklaştırarak sinaptik aktiviteleri düzenlemeye yardımcı olurlar. Glutamat ve dopamin gibi nörotransmitterlerin düzeylerini düzenledikleri bilinmektedir (Kandel vd., 2000; Temburni ve Jacob, 2001; Lopez vd., 2007).
5. Bazı aminoasitlerin beyinde sentezi için önemli bir merkez görevi görürler (He ve Sun, 2007).

6. Astrositler bulundurdıkları karbonik anhidraz enzimi yardımı ile asit-baz dengesini düzenlerler (Maragakis ve Rothstein, 2006).

2.2. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü ya da hücre siklusu; çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen bir dizi geçici biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü, birbirine tıpa tıpa benzeyen iki hücre oluşmasıyla tamamlanan bir süreçtir. Hücre döngüsü, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücresel fonksiyonları düzenlemektedir. Bu nedenle, organizmadaki her türlü fizyolojik ve/veya patolojik durumda kritik bir öneme sahip olmaktadır (Arı, 2008).

Hücre döngüsü interfaz ve mitoz olmak üzere iki temel kısımda incelenmektedir. İnterfaz aşaması sırasıyla G₁, S ve G₂ fazlarından oluşurken; mitoz ise profaz, metafaz, anafaz, telofaz, karyokinez ve sitokinez aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 2.3) (Smith vd., 2007; Klug ve Cummings., 2003).



Şekil 2.3. Hücre döngüsü ve aşamaları (Berrak, 2004)

Hücre interfaz süresince bölünme için gerekli olan hazırlıkları yapar. Hücre G1 (gap 1) evresi boyunca metabolik olarak aktiftir, RNA ve protein sentezlerini gerçekleştirilerek DNA replikasyonuna hazırlanır. G1 evresini, DNA replikasyonunun yer aldığı S (sentez) evresi izler ve bu evrede hücre hızlıca DNA miktarını iki katına çıkarır. Replikasyon sırasında DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması onları ultraviyole, çeşitli ilaç ve mutajenler gibi dış ajanların etkisine açık hale getirir. Bu yüzden DNA sentezi bir kez başladı mı hızla bitirilmelidir. DNA sentezinin tamamlanmasını, mitoz hazırlık için gerekli olan proteinlerin sentezlendiği G2 (gap 2) evresi izler. G0 fazı ise, döngüsünü tamamlayan bir hücrenin tekrar döngüye katılmayarak sessiz olarak kaldığı faz olarak tanımlanmaktadır (Esposito vd., 2004; Howell ve Lew, 2012; Cooper ve Hausman, 2006).

2.2.1. Hücre döngüsünün kontrol noktaları

Hücrelerin çoğunda, hücre döngüsünün farklı evreleri arasındaki düzen diğer biyolojik olaylarda olduğu gibi çeşitli mekanizmalarla sıkı bir şekilde denetlenir. Hücre döngüsünün çeşitli evreleri arasındaki bu koordinasyon, döngünün bir önceki evresindeki olaylar tamamlanmadıkça bir sonraki evrenin başlamasını engelleyen kontrol noktaları ve geri bildirim kontrollerinden oluşan bir sisteme sahiptir. Kontrol noktaları eksik veya hasarlı genetik bilginin yavru hücrelere geçmesini engellemekte önemli rol oynamaktadır (Howell ve Lew, 2012).

Hücre döngüsünde görevli üç tane kontrol noktasından birincisi, G1/S kontrol noktası olup, S evresine girmeden önce oluşmuş veya bir önceki kontrol noktası olan mitoz evresinde meydana gelmiş DNA hasarının varlığını kontrol eder. Herhangi bir hasar belirlenmesi durumunda döngüyü G1 deki kontrol noktasında durdurur ve S evresine girmesini engeller. Böylece S fazında hasarlı DNA'nın kopyalanması önlenmiş olur. İkinci kontrol noktası G2/M kontrol noktası, DNA hasarına ek olarak çeşitli hücre dışı sinyallere cevap veren G1 kontrol noktasından farklı olarak, sadece DNA hasarına cevap verir. Dolayısıyla, replikasyon hataları için önemli bir kontrol noktası olup, DNA replikasyonu tamamlanmadıkça mitozun başlamasını önler.

Genomun bütünlüğünü sağlayan son kontrol noktası mitoz içinde yer alan M kontrol noktasıdır. Hücre döngüsünün metafazdan anafaza geçişi sırasında görev

yapmaktadır. Bu kontrol noktasında kromozomların yavru hücrelere tam ve doğru dağıtılması için metafaz plağındaki sayı ve dizimleri kontrol edilir (Howell ve Lew, 2012; Lüleyap, 2008).

2.2.2. Hücre döngüsünün kontrol edilmesinden sorumlu olan moleküller

Hücre döngüsü siklinler (CYC), siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından kontrol edilir (Lodish vd., 2011).

Siklinler; hücre döngüsü esnasında gerektiği zaman sentezlenen ve ardından görevini tamamladığında hızla parçalanın bir protein ailesidir. Siklin bağımlı kinazlar ise hücre döngüsü düzenleyici proteinleridir ve sadece siklinlere bağlandıklarında aktive olmaktadır. Bir kez aktive olan siklin/CDK kompleksi, DNA replikasyonu ve mitozdaki birçok işlemin kontrolünde rolü olan proteinleri fosforile eder. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ise siklin/CDK komplekslerinin aktivitelerini denetleyerek, siklin/CDK kompleksinin oluşumunu ve DNA replikasyonunu inhibe ederler. Düzenli olarak kontrol edilmeyen siklin/CDK aktivitesi, artmış hücre çoğalmasına ve genomik kararsızlığa neden olmaktadır. Bu durum; hücrenin ölümsüzlük kazanmasına ve sonuç olarak kanserleşmesine neden olur (Esposito vd., 2004).

2.3. Hücre Ölümü

Canlılar yaşamları boyunca, hücrelerini belirli bir sayıda tutmak ve hasar gören hücrelerini yenileyebilmek için çoğalma özelliği gösterirler. Fakat hücrelerin, çoğalması ve ölümü arasında bir denge kurulması gerekir. Organizma genç ve yeni hücreler ile devamlılığını sağlarken, görevini tamamlamış, yaşlanmış ya da hasar görmüş hücrelerini de çeşitli mekanizmalarla ortadan kaldırması gerekmektedir. Hücrelerin ortadan kaldırılması sürecine hücre ölümü adı verilir. Hücre ölümünün düzenlenmesi embriyolojik gelişim ve doku homeostazı için önemli bir aşamadır (Şimşek ve Vatansever, 2014).

Genel olarak, biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik olarak ele alındığında birbirinden farklı mekanizmalara sahip olan üç farklı hücre ölümü türü tanımlanmıştır.

Bunlar; nekroz, programlı hücre ölümü (apoptoz), ve otofajidir (Kam ve Ferch, 2000; Eşrefoğlu, 2009).

2.3.1. Nekroz

Nekroz, hücrelerin genellikle olumsuz fiziksel ya da kimyasal şartlar sonrasında yaralanması ve bunun sonucunda da şişip, patlayarak ölmesi olarak tanımlanabilir. Nekroza uğrayan bir hücrede, zar bütünlüğü bozulduğu için hücrenin geçirgenliği artar. Hücre içine aşırı sıvı girmesinden dolayı hücreler şişer. Artan zar geçirgenliğinin sonucunda ise, hücre ve organel parçalanması ve bu içeriğin hücreler arası boşluğa salınması gerçekleşir. Bu olay da iltihaplanmaya (inflamasyon) neden olmaktadır (Kroemer vd., 2009).

Hücre içi ATP seviyesi hücrenin nekrozla mı veya apoptozla mı öleceğine yön verir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (Nicotera ve Melino, 2004) .

2.3.2. Apoptoz

Apoptoz, terimi ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılarak canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (Kerr vd., 1972). Eski bir yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Teorik olarak ise apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak da tanımlanmaktadır (Berrak, 2014).

Apoptotik hücreler tipik morfolojik değişimleri ile çevre hücrelerden ve diğer hücre ölüm tiplerinden kolayca ayırt edilebilmektedir. Apoptoz hücresel veya dış kaynaklı birçok uyarı ile tetiklenebilir. Apoptotik uyarım alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikroviluslarını yavaş yavaş kaybeder (Kültürsay ve Kayıkçıoğlu, 2002). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda apoptotik bir hücrenin

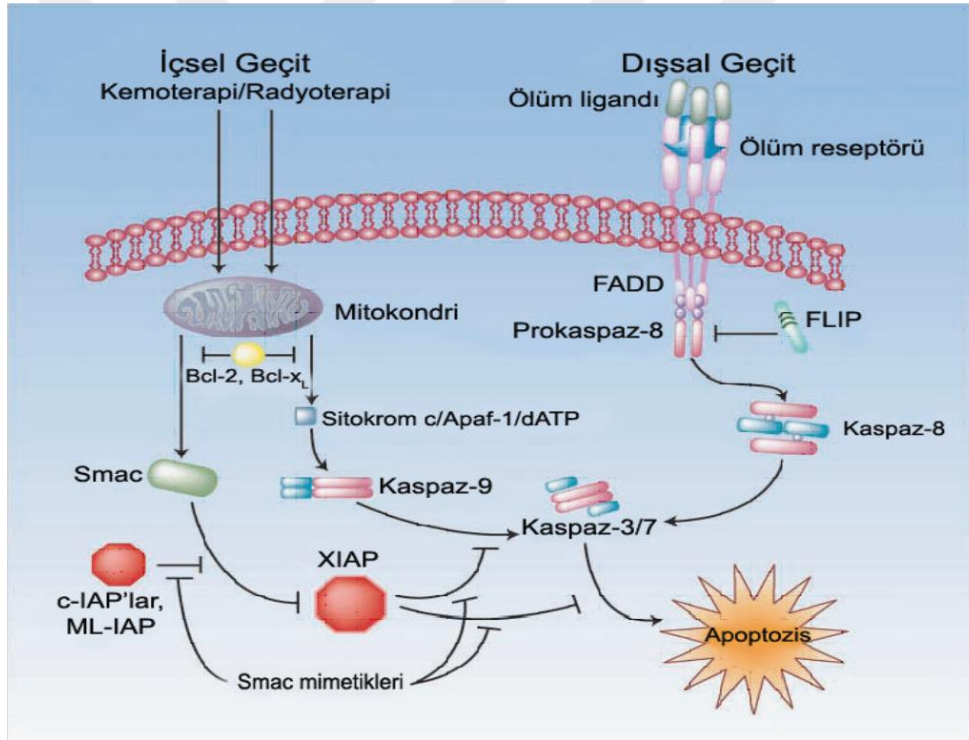
yüzey adhezyon kaybı nedeniyle hücre zarının şeklinin bozulduğu ve kabarcık şeklinde yapıların oluştuğu rapor edilmiştir. Bu aşamada mitokondri morfolojik olarak sağlamdır ve burada esas hasar gören organel çekirdektir. Plazma ve çekirdek yoğunlaşmasını takiben kromatinin kümelenmesi şekillenir. Kromatindeki değişikliklerin başlamasının hemen öncesinde sitozolik kalsiyum iyonun (Ca^{++}) düzeyinde önemli bir artış olmaktadır. Çekirdekte kromatin yoğunlaşır ve DNA parçalanır. DNA parçalanmasının Ca^{++} artışına duyarlı endonükleaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Ağır hasara uğrayan hücrenin organel ve zar yapısı bozulmakta ve hücre parçalanmaktadır. Son aşamada, çekirdek içeriğini içeren zarla çevrili apoptotik cisimcikler oluşur ve bunlar çevredeki hücreler tarafından fagositozla ortamdan uzaklaştırılırlar (Rajesh vd., 2009; Sartorius vd., 2001).

Apoptotik hücre ölümü temel olarak iki yolla gerçekleşmektedir. Bunlar dış yolak (ölüm reseptörleri) ve iç yolak (mitokondriyal) olarak adlandırılır (Şekil.2.4). Bu iki yolda birbirleriyle bağlantılı olup, her iki yolda da merkezi oyuncu sisteme bağlı aspartat spesifik proteaz (cystein aspartat spesifik protease= caspase) ailesi olan kaspazlardır (Wong, 2011). Kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptit bağını kıran proteaz enzimlerin genel ismidir. Aktif merkezlerinde sistein amino asidi bulunmaktadır. Hücrede, normal koşullarda inaktif (pro-kaspaz) olarak bulunurlar. Apoptotik süreçte pro-kaspazlar proteazlar tarafından aktif kaspaz haline dönüşmektedirler. Böylece bir şelale (kaskad) şeklinde birbirlerini aktive ederek çalışmaktadırlar (Bilir ve Ergüven, 2012).

Apoptozda aktive olan kaspazlar iki şekilde sınıflanmaktadır. Bunlar apoptotik sinyali başlatmak için gerekli olan başlatıcı kaspazlar ve proteinlerin geri dönüşümsüz fonksiyonlarının değişiminde aspartik asit kalıntılarını koruyan düzenleyici proteinler ve çeşitli yapısal proteinlerin parçalanmasında rolü olan sonlandırıcı (öldürücü) kaspazlardır. Bu aile üyelerinden başlatıcı kaspazlar kaspaz 2, 8, 9 ve 10 olup, sonlandırıcı kaspazlar ise kaspaz 3, 6 ve 7 dir (Pradelli vd., 2010; Şimşek ve Vatansever, 2014).

Apoptotik iç yolağın (mitokondriyal) düzenlenmesinde Bcl-2/Bax gen ailesi önemli rol oynamaktadır. Bu gen ailesi anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-w, A1) ve pro-apoptotik (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bad, Bik, Bim, Blk) üyelerinden oluşmaktadır. Hücredeki apoptotik uyarıların alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid;

mitokondri dış zarında bulunan anti-apoptotik Bcl-2/ Bcl-x1 kompleksine bağlanır ve bu kompleksin pro-apoptotik proteini olan Bax ile ilişki kurmasını engeller. Aktifleşen Bax, mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek mitokondriden sitoplazmaya; başta sitokrom-c, Smac/diablo (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endonükleaz-G (Endo-G), Ca^{++} ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) gibi maddelerin salınımını uyarır. Sitokrom c'nin Apaf-1 'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks apoptozom olarak isimlendirilir. Aktifleşen kaspaz 9, prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir, böylece apoptozun karakteristik bulgularından olan kromatin yoğunlaşmasını ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonunu sağlar (Shimizu vd., 2014; Kang ve Reynolds, 2009).



Şekil 2.4. Apoptoz uyarımında iç ve dış yolak işleyiş mekanizmaları (Vucic ve Fairbrother, 2007).

Hücre zarında Fas, TNF, DR4, DR5 ya da TRAIL gibi isimler alan pek çok farklı ölüm reseptörleri bulunmaktadır. Hücre dışı apoptotik sinyaller (iskemi, toksinler, UV ışınları, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon vb.) geldiğinde in aktif halde bulunan reseptörler hücre içindeki uygun ligandlarıyla birleşerek aktif hale geçerek hücre içindeki in aktif halde bulunan kaspaz 8'zi aktive ederek apoptotik süreci başlatırlar. Kaspaz 8 dış yolakta,

başlatıcı kaspaz olarak görev yapar; çünkü reseptör ile apoptotik proteazlar arasındaki ilk bağlantıdır ve bir anahtar niteliğindedir. Aktive olan kaspaz 8, diğer kaspazları (kaspaz 3, 6, 7) aktive eder ve aktifleşmiş kaspazlar DNaz ile birlikte DNA yıkımına neden olur (Lüleyap, 2008).

Hem nekroz hem de apoptoz, hücre ölüm çeşitlerinden olmasına rağmen her ikisi arasında da morfolojik ve biyokimyasal farklılıklar görülmektedir. Nekroz ile apoptoz arasındaki farklılıklar Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Nekroz ile apoptozun karşılaştırılması (Arslanyüreği, 2009).

Nekroz	Apoptoz
Morfolojik Değişiklikler -Hücre membran bütünlüğü bozulmuştur. -Hücreler büyür ve şişer. -Hücre lizisi gerçekleşir. -Kromatin yoğunlaşması olmaz.	Morfolojik Değişiklikler -Hücre membranı sağlamdır. -Hücreler küçülür. -Organeller parçalanır. -Apoptotik cisimcikler oluşur. -Kromatin yoğunlaşması olur.
Biyokimyasal Özellikleri -İyon dengesi bozulur. -ATP gerekmez. -DNA rastgele parçalanır.	Biyokimyasal Özellikleri -İyon dengesi kontrollüdür. -ATP gereklidir. -DNA kırıkları belirli baz sayısında kırılır.
Diğer Özellikler -Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. -Hücreler grup halinde ölürlür. -Lizozomal enzimler sayesinde uzaklaştırılır. -İnflamasyon görülür.	Diğer Özellikler -Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. -Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür. -Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler. -İnflamasyon görülmez.

2.3.3. Otofaji

Otofaji normal büyüme koşulları altında hücrel homeostazın sürdürülmesinde ve stres koşulları altında hücre canlılığının korunmasında kritik işlevlere sahip olan son derece korunmuş bir süreçtir. Otofaji, hücre içi makromoleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasını sağlayan bir mekanizmadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogeneze, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve

bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında etkili bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Shintani ve Klionsky, 2004)

2.4. Sinir Sistemi Tümörleri

Kanser; fiziksel, kimyasal ya da biyolojik etkenler sonucunda hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması sonucu oluşan kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir (Lodish vd., 2011). Günümüzde kanser, hala tüm dünyadaki en önemli sağlık problemlerinden birisidir. WHO yaptığı istatistiksel çalışmalara göre kanser insanda ölüme yol açan nedenler arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada gelmekte olup tüm ölümlerin yaklaşık %23,3' ünü oluşturmaktadır (Ma ve Yu, 2006).

Kanser, vücuttaki hücrelerden herhangi birinin anormal çoğalması ile ortaya çıktığı için gerek davranış, gerek tedavi yöntemi, gerek de tedaviye yanıt açısından büyük ölçüde değişiklik gösteren çok sayıda türe sahiptir (Jemal vd., 2008).

Santral sinir sistemi tümörlerinin büyük bir çoğunluğunu glial hücrelerden köken alan gliomalar oluşturmaktadır. Gliomalar, her yaşta görülebilir ancak genel olarak görülme sıklığı 45-70 yaş aralığındadır (Mamati, 2006). Bununla beraber nöroepitelyal kökenli çocukluk çağı tümörlerinin ise % 20'sini teşkil etmektedir. Çocuklarda ölümcül hastalıklar sıralamasında lösemiden sonra ikinci sırada yer alırken, yetişkinlerde ise üçüncü sırada gliomalar yer almaktadır. Erkeklerdeki görülme sıklığı kadınlara oranla % 40 daha fazladır. Bu farklılık, kadınların doğurma kapasiteleri ile ilgili olarak hormonların koruyucu etkisinden kaynaklanmaktadır (Kumar vd., 2010).

Santral sinir sistemi tümörlerinin ilk histolojik tiplendirmesi 1979 yılında Zülch tarafından yapılmış ve yayınlanmıştır (Fritz vd., 2000). 1993 yılında WHO tarafından merkezi sinir sisteminde görülen tümörlerin davranışlarına göre farklı bir skala daha geliştirilmiştir. Bu skalaya göre, en az saldırgan olan kötü huylu tümörler sınıf I ve en fazla saldırgan olan tümörler ise sınıf IV olarak, I'den IV'e kadar derecelendirilmiştir. Bunun ardından yine WHO tarafından "Onkoloji Hastalıkları için Uluslararası Sınıflandırma (International Classification of Diseases for Oncology, ICD-O)" yapılmış ve V'lik derecelendirme sistemi kullanılmıştır. 2000 yılında yayınlanan bu rapor daha sonra

2001, 2005, 2007, 2009 ve 2012 yılında yenilenerek Çizelge 2.2 de gösterildiği şekilde tekrar yayınlanmıştır.

Çizelge 2.2. Santral sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması (Fritz vd., 2000).

Tümör Türü	WHO Sınıflaması	ICD-O Kodu	ICD-O Davranış Kodu
Astrositik Tümörler (Astrositoma)			
Subependimal büyük hücre	I	9384	1
Pilositik	I	9421	1
Düşük grade	II	9400	3
Pleomorfik ksantoastrositoma	II-III	9424	3
Anaplastik	III	9401	3
Glioblastoma	IV	9440	3
Oligodendrogliomalar			
Düşük grade	II	9450	3
Anaplastik	III	9451	3
Oligoastrositomalar			
Düşük grade	II	9382	3
Anaplastik	III	9382	3
Ependimal Tümörler			
Subependimoma	I	9383	1
Miksopapiller	I	9394	1
Düşük grade	II	9391	3
Anaplastik	III	9392	3
Koroid pleksus tümörler			
Papilloma	I	9390	0
Karsinoma	III-IV	9390	3
Nöral/Glial tümörler			
Gangliositoma	I	9492	0
Ganlioglioma	I-II	9505	1
Anaplastik ganglioglioma	III	9505	3
Desmoplastik infantil ganglioglioma	I	9412	1
Disembriyoplastik nöroepitel tümör	I	9413	0
Merkezi nörositoma	I	9506	1
Pineal tümörler			
Pineositoma	II	9361	1
İntermedial farkın pineal parankimal tümörü	II-IV	9362	3
Pineoblastoma	IV	9362	3
Embriyonel tümörler			
Medulloblastoma	III	9470	3
Diğer PNET'ler	III	9473	3
Medulloepitelioma	III	9501	3
Nöroblastoma	III	9500	3
Ependimoblastoma	III	9392	3
Kraniyal ve spinal sinir tümörleri			
Schwannoma	I	9560	0
Kötü huylu periferik sinir kılıfı tümörü	III-IV	9540	3
Menenjial tümörler			

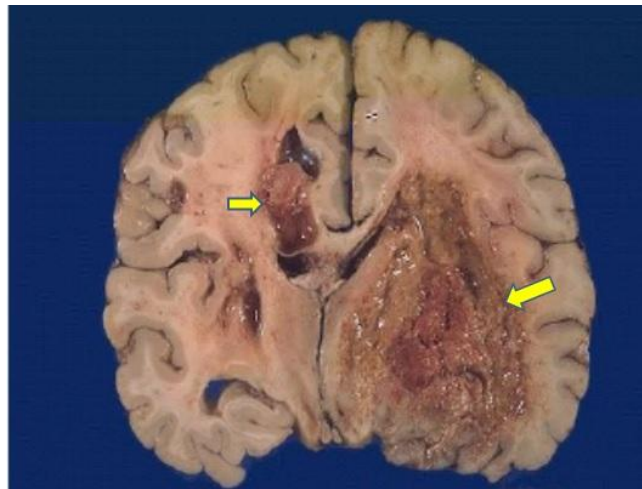
Menenjiyoma	I	9530	0
Atipik menenjiyoma	II	9539	1
Papiller menenjiyoma	II-III	9538	3
Hemanjiyoperisitoma	II-III	9150	3
Anaplastik menenjiyoma	III	9530	3

SSS’de görülen en yaygın kanser çeşidi Çizelge 2.2.’de görüleceği gibi astrositik tümörlerdir. Bunu oligodendrogial ve ependimal tümörler izlemektedir (Caldarella vd., 2013).

2.5. Glioblastoma multiforme (GBM)

En tehlikeli astrositik tümörlerden olan glioblastoma multiforme (GBM), tüm intrakraniyal tümörlerin %12-15’ ini ve astrositik tümörlerin %50-60’ ını oluşturmaktadır. Bu tümörler, genellikle 45-70 yaş arasındaki erişkin bireylerde sıklıkla görülürken, çocuklarda görülme oranı daha azdır (Tuğruli, 2008; Mamati, 2006). Yapılan araştırmalarda GBM’nin lokal olarak gelişeceği gibi, metastas şeklinde de oluşabileceği rapor edilmiştir (Elsamaloty vd., 2006).

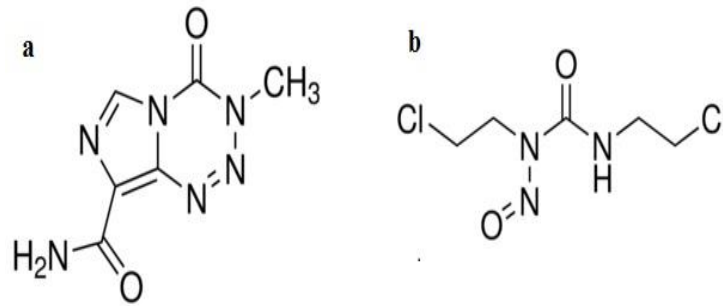
Makroskobik olarak incelendiğinde tümör dokusu içerisinde yumuşak alanlar, küçük kanama bölgeleri ve nekrotik alanların oldukça fazla olduğu gözlenmektedir. Şekil 2.5’de GBM gelişmiş insan beyin kesiti gösterilmektedir (Bayram, 2012) .



Şekil 2.5. Glioblastoma multiforme gelişmiş bir beyin kesit görüntüsü (Bayram, 2012).

Beyin kanserine neden olan faktörler üzerinde pek çok araştırma yapılmış ve halen de yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, endüstri alanında çalışan kişilerde özellikle, formaldehit, akrilonitril, fenol, fenolik bileşikler, kömür katranı, karbon tetra klorür, N-nitrozo bileşikleri, sentetik kauçuk ve vinil klorid gibi nörotoksik ve karsinojenik olan maddelere maruz kalındığında GBM oluşum sıklığının arttığı görülmüştür. Bunun yanı sıra cinsiyet, genetik yatkınlık, iyonize ve non-iyonize radyasyon, elektromanyetik alanlar, pestisit uygulamaları, cep telefonları, sigara kullanımı ve beslenme alışkanlıklarının da risk faktörünü arttırdığı bilinmektedir (Wrench vd., 2002).

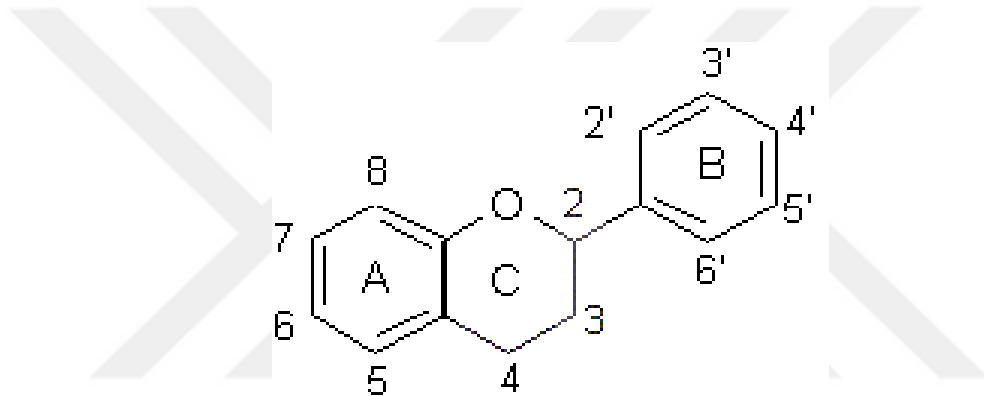
GBM, tanısı konduktan sonra hastaların çoğunlukla bir seneden daha az yaşadığı belirlenmiştir (Liang vd., 2005). Bu nedenle, gliomalar içerisinde düşük sağ kalım, az diferansiye ve en kötü prognozu olan beyin tümörü çeşidi olarak tanımlanmaktadır (Görür, 2012). Genel olarak GBM teşhisi konulan bir hastaya ilk olarak tümör bulunan alanın temizlenebilmesi için cerrahi müdahale yapılmaktadır. Ardından ise radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları ile yaşam süresi uzatılmaya çalışılmaktadır (Maher vd., 2006). Kemoterapi tedavisinde sıklıkla alkilleyici ajan olarak bilinen temazolomid (TMZ) ve karmustin (BCNU) isimli ilaçlar kullanılmaktadır (Şekil 2.6). Bu iki ilaçta kan beyin bariyerini rahatça geçebilmektedir. TMZ, G2/M fazında hücre döngüsünü durdurken, ve BCNU ise DNA replikasyonunu ve DNA transkripsiyonunu engelleyerek hücre ölümüne yol açmaktadır (Paul-Samojedny vd., 2016). Kemoterapi, radyoterapiye göre daha az başarılıdır. Bunun sebepleri arasında tedavi amacı ile kullanılan ilaçların kan-beyin bariyerini geçememesi veya bu tümör çeşidinin kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirmesi sayılabilir. Bu nedenle günümüzde yeni ilaçların geliştirilmesi için sürekli olarak çalışmalar yapılmaktadır (Reithmeier vd., 2010).



Şekil 2.6. Temozolomid ve karmustinin organik yapısı (Sarin, 2016).

2.6. Fisetin

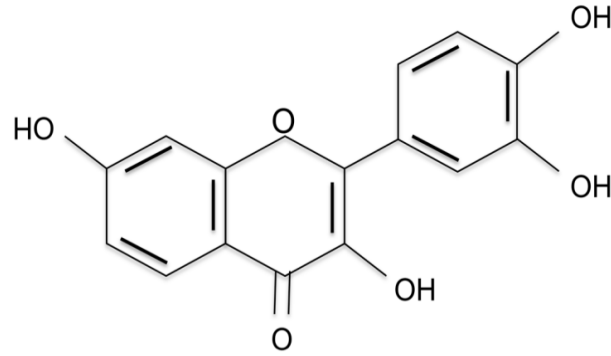
Flavonoidler bitkilerde bulunan ve insan sađlıđı üzerinde olumlu etkileri olan dűűűk molekűl ađırlıklı dođal bileűiklerdir (Felicia vd., 1997; Sghaiera vd., 2011). Flavonoid bileűikleri, C6-C3-C6 karbon iskeleti ile karakterize edilen polifenollerdir. Yapıları heterosiklik (C) bir halde bulunan űű karbonlu bir zincirle bađlanmış iki fenolik (A,B) halkadan oluűur (űekil 2.7). Sayıları yaklasık 9000' in űzerinde olduđu tahmin edilen flavonoidler molekűler yapılarına gűre flavonlar, flavanonlar, flavonoller, isoflavonlar, antosiyanidin ve flavanoller (kateűin) diye altı sınıfta toplanmaktadır (Gibellini vd., 2011; Buer vd., 2010)



űekil 2.7. Flavonoid iskeleti (Tapas vd., 2008).

Flavonoidlerle yapılan ilk űalıűmalarda insanların kalp sađlıđını koruyucu etkisinin olduđu belirlenmiűtir. Daha sonra yapılan űalıűmalarda ise bu bileűiklerin anti-oksidant, anti-tűmoral, anti-proliferatif, anti-inflamatuar, anti-viral gibi űeűitli biyolojik űzelliklere sahip olduđu belirlenmiűtir (Choi, 2007; Lee vd., 2011; Sghaiera vd., 2011).

Fisetin (3,3',4',7-tetrahydroxyflavone) flavonoidlerin bir alt grubu olan flavonol bileűiklerindendir ve 2 ila 160 $\mu\text{g/g}$ konsantrasyonlarında űilek, elma, Japon hurması, űűm, sođan, salatalık gibi sebze ve meyve tűrlerinde bulunmaktadır. Fisetinin molekűl forműlű $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ve molekűl ađılıđı 286,24 g/mol' dűr (űekil 2.8) (Lu vd., 2005).



Şekil 2.8. Fisetinin organik yapısı (Shia ve Tsai, 2009).

Kemirgen ve insan kanser hücre hatlarıyla yapılan *in vitro* çalışmalarda fisetinin zamana ve doza bağlı olarak karaciğer (Constantin vd., 2011), akciğer (Touil vd., 2011), serviks (Ying vd., 2011), prostat (Haddad vd., 2010), mesane (Li vd., 2010), lösemi (Kim vd., 2010), böbrek (Lee vd., 2008) gibi çeşitli kanser hücre dizileri üzerinde farklı dozlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda fisetin'in farklı konsantrasyonlar da çeşitli tümör hücrelerinde genel olarak hücre döngüsünü durdurarak ve/veya değişik sinyal yolları üzerinden apoptoz mekanizmasını tetikleyerek hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (Chen vd., 2002; Lu vd., 2005).

Bu çalışmada ilk olarak insan glioblastoma multiforme (T98G) hücre dizileri üzerindeki farklı fisetin dozlarının doza ve zamana bağlı olarak hücre morfolojisi ve çoğalması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. T98G hücre dizilerinde fisetinin yapmış olduğu morfolojik değişimler elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada seçilen dozların apoptoz/nekroz oranları ve kaspaz 3, 8, 9, Bax, Bcl-2 ve survivin gen ekspresyonları üzerindeki etkileri de ilk defa incelenmiştir. Son olarak da, fisetinin normal hücreler üzerindeki olası morfolojik, sitotoksik ve apoptotik etkileri sağlıklı insan bronşial epitelium (BEAS-2B) hücre dizisinde araştırılmıştır. Bu şekilde fisetinin kanserli hücre normal hücre üzerindeki etkileri farklı yöntemler kullanılarak karşılaştırılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Deneysel çalışmamızın tamamı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Hücresel Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Deneylerde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler Çizelge 3.1. ve 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1 Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma
Fetal Bovine Serum (Fetal Dana Serum, FBS)	Sigma
Penisilin-Streptomisin Çözeltisi	Hyclone
%0,25 Trypsin-EDTA Çözeltisi	Sigma
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline, PBS)	Sigma
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Carlo Erba
3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolium bromid (MTT)	Applichem
Tripan Mavisi	Sigma
Hank'ın Dengelenmiş Tuz Çözeltisi (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS)	Sigma
Fisetin	Sigma
Karmustin	Sigma
RNA İzolasyon Kiti	Roche
cDNA Sentez Kiti	Roche
Green Master Kiti	Roche
Hücre Ölümünü Belirleme Kiti	Roche

%99.8'lik Etanol (C ₂ H ₅ OH)	Riedel de Haen
Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	İnvitrogen

Çizelge 3.2. Deneylerde kullanılan sarf malzemeler.

25 cm ² 'lik Kültür Kabı	Orange Scientific
75 cm ² 'lik Kültür Kabı	Sarstedt
96 Kuyucuklu Kültür Kabı	Sarstedt
Tek Kullanımlık Serolojik Pipet	Ratiolab
Santrifüj Tüpleri	Corning
Tek Kullanımlık Filtreler	Sartorius
Eppendorf Tüp (1,5 mL)	Neptune
Sekiz Kanallı PCR Tüpü	Roche
Hücre Sayım Cihazı Lamları	Roche
Filtreli Tek Kullanımlık Pipet Uçları	Thermo

Deneylerde kullanılan cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak kuru hava sterilizatöründe 120 °C'de 90 dakika tutularak, sıvı maddeler ise steril tek kullanımlık 0,22 ve 0,45 µm aralıklı sellüloz nitrat filtrelerden geçirilerek kullanılmıştır.

Hücre kültür işlemleri steril kabin içinde gerçekleştirilmiş olup, her çalışmadan önce 15 dakika ultraviyole lamba ile ortam steril edildikten sonra, çalışılan yüzey %70'lik alkol ile silinmiştir.

3.2. Deneylerde Kullanılan Hücre Hatları

Bu çalışmada, Amerikan Kültür Koleksiyonundan (ATCC) satın alınan ve dondurularak -196°C 'de sıvı nitrojen tankında saklanan insan glioblastoma multiforme (T98G) ve sağlıklı insan bronşial epitelyum (BEAS-2B) hücre hatları kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Deneylerde kullanılan hücre hatları.

İnsan Glioblastoma Multiforme Hücre Hattı (T98G)	ATCC® CRL 1690™
Sağlıklı İnsan Bronşial Epitelyum Hücre Hattı (BEAS-2B)	ATCC® CRL 9609™

3.3. Hücrelerin Kültüre Alınması

-196°C 'de sıvı azot tankında bulunan hücreler tanktan çıkarılıp oda sıcaklığında çözüldükten sonra 15 mL'lik steril santrifüj tüpüne, %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin çözeltisi içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri içine aktarılacak ve 1200 devir/dakika (rpm) 4°C 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstteki sıvı kısım (süpernatant) uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan hücreler 5 mL besiyeri içeren 25 cm^2 'lik kültür kaplarına ekilerek 37°C 'de, %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Besiyeri iki günde bir değiştirilmiş ve hücreler kültür kaplarının %70'ini kaplayana kadar, bu işleme devam edilmiştir.

3.4. Hücre Serilerinin Pasajlanması

25 cm^2 'lik kültür kabındaki besiyeri pipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 1,5 mL Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra tabana yapışık halde bulunan hücreleri kaldırabilmek için %0,25'lik Trypsin-EDTA

solüsyonundan 2 mL kültür kaplarına konularak inkübatöre kaldırılmıştır. Yaklaşık 5 dakikalık bekleme süresi sonunda hücreler, mikroskop altında kontrol edildikten sonra 9 mL besiyeri bulunan santrifüj tüpüne alınarak 1200 rpm, 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantın tamamı döküldükten sonra, 1 mL besiyeri eklenerek dipte kalan hücreler pipet yardımıyla homojen hale getirilip, 10 mL besiyeri içeren 75 cm²'lik kültür kabına konularak çoğalmaları için tekrar inkübatöre kaldırılmıştır. Kültür kaplarındaki hücreler, ters ışık mikroskobu kullanılarak canlılık, çoğalma ve kontaminasyon bakımından günlük olarak takip edilmiştir. Hücrelerin besi ortamı ise iki gün de bir değiştirilmiştir.

3.5. Hücrelerin Sayımı

Deneye alınacak hücreler %70 yoğunluğa ulaştıktan sonra besiyerinin tamamı çekilip atılmış ve hücreler 3 mL HBSS ile yıkanmıştır. Hücrelerin tabandan ayrılması için 3 mL %0,25'lik Trypsin-EDTA solüsyonu eklenerek, 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde 5 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin tabandan ayrılıp ayrılmadığı ters ışık mikroskobunda kontrol edildikten sonra tabandan ayrılan hücreler 9 mL besiyeri bulunan santrifüj tüpüne alınarak, 1200 rpm'de, 4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda, süpernatant kısmının tamamı atıldıktan sonra 4 mL yeni besiyeri eklenip hücreler pipet yardımı ile homojen hale getirilmiştir. Daha sonra hücre sayım işlemine geçilmiştir.

Hücre sayımında, tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu boyama yönteminde, ölü hücreler hücre zarı bütünlüğünü kaybettiği için tripan mavisi boyasını içlerine kontrolsüz olarak alırlar. Fakat canlı hücreler hücre zarları sağlam olduğu için boyayı içlerine almazlar ve bu nedenle boyanmazlar. Hücre sayısı, hücre sayım cihazı (Cedex XS, Innovatis) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.6. Hücrelerin Ekilmesi

Canlı hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğunda 100 µL hacim içinde 1×10^4 hücre olacak şekilde sekiz kanallı mikropipet (Eppendorf) yardımıyla ekim yapılmıştır. 24 saat inkübasyon süresinin ardından hücreler deneye alınmıştır.

3.7. İlaç Dozlarının Hazırlanması

Toz halde alınan fisetin (Sigma, F4043), dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 100 mM'lık ana stok hazırlanmıştır. Deneylerde stok solüsyonundan DMEM içerisinde seyreltilen 1, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 μ M'lık fisetin dozları kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Hazırlanan dozlar kuyucuklara 100 μ L'lık hacim içinde olacak şekilde 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır. İlaç içermeyen kuyucuklara ise sadece 100 μ L besiyeri konularak kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her bir doz için en az 8 kuyu olacak şekilde deney tasarlanmıştır.

Çizelge 3.4. Fisetin ve çözücü kontrol (DMSO) uygulama grupları

Sıra	Uygulanan doz
1	Kontrol grubu (sadece besiyeri uygulandı)
2	1 μ M Fisetin doz grubu
3	50 μ M Fisetin doz grubu
4	100 μ M Fisetin doz grubu
5	200 μ M Fisetin doz grubu
6	300 μ M Fisetin doz grubu
7	400 μ M Fisetin doz grubu
8	500 μ M Fisetin doz grubu
9	500 μ M çözücü kontrol (DMSO) doz grubu

Çalışmada pozitif kontrol olarak karmustin (Sigma, C0400) kullanılmıştır. Toz halde alınan karmustin DMSO içinde çözülerek 100 mM'lık ana stok solüsyonu hazırlanmıştır. Deneylerde stok solüsyonundan DMEM içerisinde seyreltilen 100; 200; 250; 300; 350; 400; 450 ve 500 μ M'lık karmustin dozları kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Hazırlanan dozlar kuyucuklara 100 μ L'lık hacim içinde olacak şekilde 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır. İlaç içermeyen kuyucuklara ise sadece 100 μ L besiyeri konularak kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her bir doz için en az 8 kuyu olacak şekilde deney tasarlanmıştır.

Çizelge 3.5. Karmustin ve çözücü kontrol (DMSO) uygulama grupları

Sıra	Uygulanan doz
1	Kontrol grubu (sadece besiyeri uygulandı)
2	100 μ M Karmustin doz grubu
3	200 μ M Karmustin doz grubu
4	250 μ M Karmustin doz grubu
5	300 μ M Karmustin doz grubu

6	350 μ M Karmustin doz grubu
7	400 μ M Karmustin doz grubu
8	450 μ M Karmustin doz grubu
9	500 μ M Karmustin doz grubu
10	500 μ M $\text{ç}\ddot{\text{o}}\ddot{\text{z}}\ddot{\text{u}}\ddot{\text{c}}\ddot{\text{u}}$ kontrol (DMSO) doz grubu

3.8. Hücreslerin Ters Işık Mikroskobu İle Morfolojik Görüntülenmesi

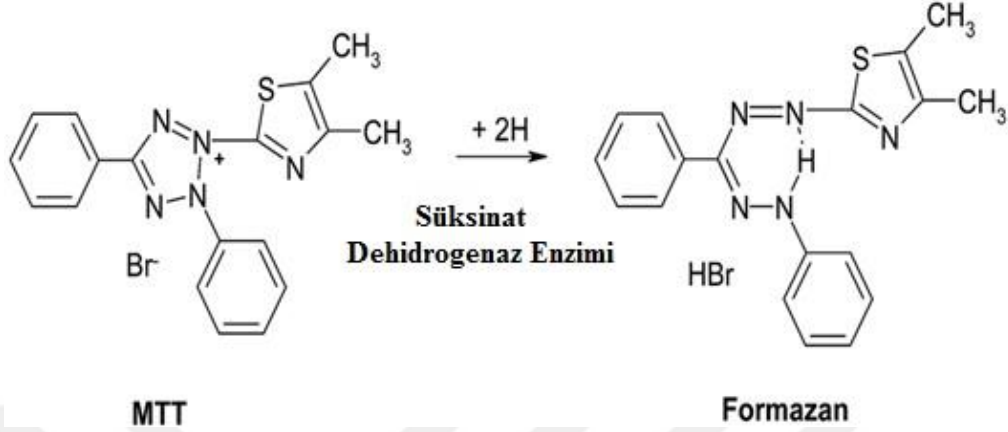
Farklı fisetin dozları ile muamele edilen T98G ve BEAS-2B hücre hatlarındaki doza ve zamana bağlı oluşan morfolojik değişimler ters ışık mikroskobunda (Nikon Eclipse, TC100) incelenmiş olup, Kameram 21 programı yardımıyla görüntülenmiştir.

3.9. Mitokondriyal Aktiviteye Dayalı Hücre $\text{Ç}\ddot{\text{o}}\ddot{\text{g}}\ddot{\text{a}}\ddot{\text{l}}$ masının Belirlenmesi (MTT)

Fisetinin hücre $\text{ç}\ddot{\text{o}}\ddot{\text{g}}\ddot{\text{a}}\ddot{\text{l}}$ ması üzerindeki etkisi 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) yöntemi ile araştırılmıştır. İlk kez Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntem, hücre $\text{ç}\ddot{\text{o}}\ddot{\text{g}}\ddot{\text{a}}\ddot{\text{l}}$ ması ve canlılığını *in vitro* ortamda belirleyen, pratik, kolorimetrik bir metottur (Mosmann, 1983). Bu yöntem genellikle hızlı $\text{ç}\ddot{\text{o}}\ddot{\text{g}}\ddot{\text{a}}\ddot{\text{l}}$ an ve mitokondriyal aktivitesi yüksek olan hücre dizileri için uygundur. Özellikle kanserli hücreler üzerinde yapılan ilaç çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir metottur (Alley vd., 1988).

MTT canlı hücelere aktif olarak alınabilen ve mitokondriye bağlı bir dizi reaksiyonla mor renkli, suda $\text{ç}\ddot{\text{o}}\ddot{\text{z}}\ddot{\text{u}}\ddot{\text{l}}$ meyen formazana indirgenebilen bir boyadır. Hücrede bu boyanın tetrazolium halkası, mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enzimi yardımıyla parçalamakta ve berrak sarı renkli MTT boyası, koyu mavi-mor suda $\text{ç}\ddot{\text{o}}\ddot{\text{z}}\ddot{\text{u}}\ddot{\text{l}}$ meyen formazana dönüşmektedir (Şekil 3.1). Formazan hücre zarını geçemediği için hücrenin içinde toplanmaktadır. Oluşan formazan, DMSO veya diğer uygun $\text{ç}\ddot{\text{o}}\ddot{\text{z}}\ddot{\text{u}}\ddot{\text{c}}\ddot{\text{u}}$ ilavesiyle $\text{ç}\ddot{\text{o}}\ddot{\text{z}}\ddot{\text{u}}\ddot{\text{l}}$ üp serbest kalabilir ve kolorimetrik olarak tespit edilebilir. Sonuç olarak, canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hüceler MTT boyasını formazana dönüştürürken, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hüceler ise formazana dönüştüremez. Bu nedenle bu yöntemde hücelerin MTT boyasını indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınmaktadır. Sonuç olarak, 96 kuyucuklu kültür

kaplarındaki boyanın yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantı göstermektedir (Meerlo vd., 2011; Kısmalı ve Sel, 2012).



Şekil 3.1. MTT boyasının formazana indirgenme reaksiyonu (Stockert vd., 2012).

Her deneyden önce taze olarak 5 mg/mL MTT, dengelenmiş tuz çözeltisi (PBS) içerisinde çözülerek 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek hazırlanmıştır. Muamele süreleri sonunda 20 µL MTT solüsyonu her bir kuyuya eklenerek, 37 °C, %5 CO₂'li ortamda 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür kabının içeriği dökülmüş ve canlı hücrelerde oluşturulan formazan tuzunun çözünmesi için her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiştir. Karanlık ortamda 5 dakika beklendikten sonra ölçümler mikropılaka okuyucu (BioTek, Powerwave XS) ile 550 nm dalga boyunda yapılmıştır. MTT ürünü olan formazan yaşayan hücre sayısı ile ilişki gösterdiğinden, ilaç verilen kuyucuklarda okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Oztopçu vd., 2015).

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Her bir kuyucuktaki ilaç verilen hücre absorbanısı} \times 100}{\text{Kontrol hücrelerinin ortalama absorbanısı}}$$

Her bir deney birbirinden bağımsız olarak en az 3 kez tekrar edilmiştir. MTT yönteminden elde edilen veriler, Statistics Program for Social and Science 12.0 (SPSS) programında, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi olarak p<0,05 kabul edilmiştir. SPSS analizinden elde edilen veriler kullanılarak; kontrole göre %50 oranında hücre ölümüne neden olan doz hesaplanarak, IC₅₀ değeri olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca, istatistiksel değerlendirmesi yapılmış olan verilerin grafiklerinin hazırlanmasında ise Microsoft Excel (Office 2007) programı kullanılmıştır. Çizilen grafiklerde istatistiksel anlamlılıklar uygun işaretler (*) ile gösterilmiştir.

3.10. DNA Fragmentasyonunun ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Hedef molekülü işaretlemek için enzimlerin kullanıldığı yöntemlere Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ya da Enzyme Immunoassay (EIA) denir. Geniş tanı parametrelerinin olması, ticari olarak kolayca temin edilebilmesi, yöntemin kolay uygulanabilirliği, çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesi ve sonuçların spektrofotometrik olarak kalitatif, semi-kantitatif ya da kantitatif değerlendirilebilmesi bu testlerin avantajları olarak sayılabilir (Bayram, 2013).

Fisetinin, hücre canlılığını baskıladığı dozlar belirlendikten sonra bu etkinin apoptoz / nekroz bağımlı olup olmadığını belirlemek üzere Hücre Ölümünü Belirleme Kiti (Cell Death Detection ELISA Plus Kit, Roche) kullanılmıştır ve tüm işlemler kitte yazılı protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

1. T98G ve BEAS-2B hücreleri her bir kuyuda 1×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekim yapılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra T98G hücreleri 50, 100, 200 μM ve BEAS-2B hücreleri ise 100, 200, 300 μM fisetin dozları ile 24 saat süre boyunca muamele edilmiştir.
2. İnkübasyon süresinin sonunda 96 kuyucuklu kültür kapları 27°C , 200 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj sonunda seçilen kuyulardaki süpernatantın tamamı eppendorf tüplere alınmıştır (Nekroz için).
4. Süpernatantı alınan her kuyuya daha sonra 200 μL lizis tamponu eklenip oda sıcaklığında 30 dakika beklenmiş ve sonrasında kültür kapları 27°C , 200 xg'de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüjden sonra seçilen kuyulardaki içerik 20 μL alınarak streptavidin kaplı kuyulara aktarılmıştır. Daha sonra bu kuyuların üzerine; immünoareagent (1440 μL inkübasyon tamponu, 80 μL anti-histon biotin, 80 μL anti-DNA pod) karışımından 80 μL eklenerek oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun

amacı anti-histon biotin antikoru nükleozom üzerinde bulunan histon proteinlere ve kuyularda streptavidine bağlanmasını sağlamaktır. Anti-DNA pod antikoru ise bu işlem esnasında nükleozomlarda bulunan DNA'ya bağlanmaktadır.

6. İnkübasyonun bitmesiyle tüm kuyular 300 µL inkübasyon tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa kit içerisinde bulunan ABTS solüsyonundan 100 µL eklenip renk değişimi gözleninceye kadar oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. ABTS solüsyonu bir önceki basamakta eklenen Anti-DNA pod antikoru ile reaksiyona girerek renk vermektedir.

7. Süre sonunda her bir kuyuya 100 µL ABTS Stop solüsyonu eklenmiş, tüm reaksiyonlar bu sayede durdurulmuştur. Son aşama olarak her bir kuyudaki absorban değerleri mikroparka okuyucu cihazı ile 405 nm dalga boyunda okunmuştur.

8. Çalışmada kitte bulunan pozitif kontrol kullanılmıştır. Pozitif kontrole göre nükleozomal DNA parçalanma oranı % 100 kabul edilmiş ve seçilen fisetin dozlarının hücrelerdeki DNA parçalanma oranları kit protokolünde belirlenen formüle göre hesaplanmıştır. Kör; 20 µL inkübasyon tamponu +80 µL immünoreagent karışımından oluşmaktadır.

Zenginleştirme (Enrichment) Faktörü: (Doz-Kör)/(Kontrol-Kör)

Zenginleştirme faktörü hesaplandıktan sonra elde edilen veriler, Statistics Program for Social and Science 12.0 (SPSS) programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ kabul edilmiştir. Ayrıca, istatistiksel değerlendirmesi yapılmış olan verilerin grafiklerinin hazırlanmasında ise Microsoft Excel (Office 2007) programı kullanılmıştır. Çizilen grafiklerde istatistiksel anlamlılıklar uygun işaretler (*) ile gösterilmiştir.

3.11. Hücre Kültüründen Total RNA'nın Elde Edilmesi

T98G hücreleri 25 ve 50 µM ve BEAS-2B hücreleri ise 50, 100 ve 200 µM fisetin dozları ile 24 saat süre boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin dolmasıyla, hücrelerden RNA izolasyonu High Pure RNA İsolation Kiti kullanılarak aşağıda yazılı olan protokole göre steril kabinin içinde yapılmıştır.

1. İnkübasyon süresi sonunda hücreler %0,25 Tripsin-EDTA yardımıyla toplanarak 1200 rpm' de 4 °C' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant döküldükten sonra dipte kalan hücre pelletinin üzerine 1mL soğuk PBS eklenip santrifüj yapılmıştır.
2. Santrifüj edilen örneklerden PBS uzaklaştırıldıktan sonra 400 µL lizis tamponu eklenip, 15 saniye çalkalayıcıda karıştırılmıştır.
3. Kitin içerisinden çıkan filtre, toplama tüpüne yerleştirildikten sonra çalkalayıcıdan alınan karışımın hepsi filtre üstüne aktarılmıştır.
4. Filtreli tüpe aktarılan örnekler 8.000 xg'de 15 saniye santrifüj yapıldıktan sonra toplama tüpünde toplanan sıvı dökülmüş ve filtre tekrar aynı tüp üzerine yerleştirilmiştir.
5. Steril bir tüpe çalışılan her bir örnek için 90 µL DNase inkübasyon tamponu ve 10 µL DNase I konulduktan sonra bu karışımdan 100 µL filtrenin tam ortasına eklenmiş ve oda ısısında 15 dakika bekletilmiştir.
6. Daha sonra bu tüplere 500 µL 1.yıkama tamponu eklenerek ve 8.000 xg'de 15 saniye santrifüj edilmiş, filtre altında toplanan kısım dökülmüş ve aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.
7. Aynı tüpün filtresinin ortasına 500 µL 2. yıkama tamponu eklenerek ve 8.000 xg'de 15 saniye santrifüj edilmiş ve filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.
8. Filtrenin ortasına 200 µL 2. yıkama tamponu eklenmiş ve 13.000 xg'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır.
9. Santrifüj sonunda toplama tüpleri atıldıktan sonra filtreler yeni steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir.
10. Filtrenin üzerine 50 µL örnek seyreltme çözeltisi eklenerek ve 8.000 xg'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
11. Son olarak santrifüj sonunda tüpün içindeki içerik tekrar filtreden geçirilip 8.000 xg'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

3.11.1. RNA kalite tayini

Elde edilen RNA'ların miktar ve saflığının tayini için spektrofotometre (NanoDrop 2000) cihazı kullanılmıştır. Ölçüm için izolasyonu yapılan örneklerden 1,5 µL RNA kullanılmış ve 260, 230 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. 260 nm'de okunan sonuçlara göre mikrolitredeki mikrogram değerleri

belirlenmiştir. 260nm/280nm (1,95-2,08 nm) ve 260nm/230nm (2,09-2,29) de okunan sonuçlar ise RNA saflığını değerlendirmek için kullanılmıştır. Elde edilen verilerden RNA'ların saflık düzeyleri çalışma açısından uygun bulunarak cDNA sentez aşamasına geçilmiştir.

3.12. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi, Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche) ile yapılmıştır. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.6'da verilmiştir. İzolasyonu gerçekleştirilen örnekler 0,2 mL'lik tüplere alınarak 10 µL'de 1 µg RNA olacak şekilde sulandırılmış ve üzerlerine 1 µL random hekzamer primeri (60µM) eklenerek Light Cycler Nano (Light Cycler ® Nano Real-Time PCR System, Roche Applied Science) cihazı içinde 65 °C' de 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler 9 µL reaksiyon karışımı (Çizelge 3.6) ilave edilmek üzere buz üzerine alınmıştır. Reaksiyon karışımı, ilave edildikten sonra örnekler önce 40 °C'de 10 dakika, daha sonra 55 °C'de 60 dakika ve son olarak 85 °C'de 7 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri çalışılana kadar -20 °C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

Çizelge 3.6. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon çözeltisi.

Malzemeler	Final Konsantrasyonu	Miktar
5X Reaksiyon tamponu	1,25x	4 µL
10mM dNTP	1mM	2 µL
0,1M Dithiothreitol (DTT)	0,1M	1µL
Rnase İnhibitörü	20 ünite	1µL
Reverse Transkriptaz	200 ünite	1µL

3.13. Gen Anlatım Düzeylerinin Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi İle Belirlenmesi

cDNA'ları elde edilmiş olan örneklerin gen anlatım ifadelerindeki değişiklikler SYBR Green kullanılarak, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi

ile belirlenmiştir. Çalışmamızda referans (housekeeping) gen olarak *GAPDH*, *B-ACTB*, ve *HPRT1* kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri

Primer	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
<i>GAPDH</i>	ACTCCGACCTTCACCTTCCC	TCGACAGTCAGCCGCATCT
<i>B-ACTB</i>	AGGCCCTCTGAACCCTA	GGGGTGTGAAGGTCTCAA
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>SURVIVIN</i>	TCTGCTTCAAGGAGCTGGA	AAAGTGCTGGTATTACAGGCGTA
<i>CASPASE 3</i>	CTGGTTTTCGGTGGGTGT	CCACTGAGTTTTCAGTGTCTCC
<i>CASPASE 8</i>	CAGCAAAGAGAGAAGCAGCA	CGAGATTGTCATTACCCACA
<i>CASPASE 9</i>	GGAAGCCCAAGCTCTTTTC	AAGTGAGGCCACCTCAA
<i>BAX</i>	CAAGACCAGGTGGTTGG	CACTCCCGCCACAAAGAT
<i>BCL-2</i>	TACCTGAACCGGCACCTG	GCCGTACAGTTCACAAAGG

Sentezlenen cDNA örnekleri 1/5 oranında sulandırıldıktan sonra her bir örnekten 2,5 µL tüplere konulmuştur. Daha sonra bu tüplerin üzerine de gerçek zamanlı PZR tepkime karışımından 7,5 µL eklenmiştir (Çizelge 3.8). Tüpler Light Cycler Nano (Light Cycler ® Nano Real-Time PCR System, Roche Applied Science) cihazına yerleştirildikten sonra Çizelge 3.9’da belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak RT-PZR tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Toplamda 45 döngü sonrasında RT-PZR işlemi sonuçlanmıştır.

Ardından amplifikasyonlar Light Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirildikten sonra Ct değerleri elde edilmiştir. Sonrasında housekeeping Ct değerinden hedef genlerin Ct değeri çıkartılarak ($Ct_{\text{housekeeping}} - Ct_{\text{hedef gen}}$) ΔCt değeri bulunmuştur. Ardından $\Delta\Delta Ct$ hesaplamak için ΔCt değerlerinden her genin kendine ait kontrol grubunun ΔCt değeri çıkarılmıştır ($\Delta Ct_{\text{hedef örnek}} - \Delta Ct_{\text{hedef kontrol}}$). Son olarak elde edilen $\Delta\Delta Ct$ değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6 programında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ verileri kullanılarak t-testi ile yapılmıştır. (*:p<0.05).

Çizelge 3.8. Gerçek zamanlı PZR tepkime karışımı

Malzemeler	Final Konsantrasyonu	Miktar
dH ₂ O	-	1,5 µL
Primer (F)	5 pmol	0,5 µL
Primer (R)	5 pmol	0,5 µL
SYBR Green miks	2X	5 µL

Çizelge 3.9. Gerçek zamanlı PZR tepkime programı

Denatürasyon (1 döngü)	95 °C	Ramp: 5	600 saniye
3 Aşamalı amplifikasyon (45döngü)	95 °C	Ramp: 5	20 saniye
	60 °C	Ramp: 4	20 saniye
	72 °C	Ramp: 5	45 saniye
	72 °C	Ramp: 5	45 saniye
Melting (1 döngü)	65 °C	Ramp: 4	60 saniye
	95 °C	Ramp: 0,1	1 saniye

3.14. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) İle Hücrelerin Görüntülenmesi

Hücre ölümünü inceleme yöntemleri çok çeşitlidir ve birbirlerini tamamlayıcı, destekleyici niteliktedir. Bu yöntemlerden biri de görüntüleme ve yapısal özelliklerin ortaya konması için tercih edilen elektron mikroskobudur. Bu yöntem sayesinde hücrelerin morfolojik ve subsellüler (organel durumu ve membran bütünlükleri vb.) değişiklikleri detaylı olarak incelenebilir. Çalışmada T98G hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan 50 ve 100 µM fisetin dozlarının hücre ve organel düzeyinde neden olduğu değişimleri belirleyebilmek amacıyla geçirimli elektron mikroskobu (TEM) yöntemi kullanılmıştır. Çalışma aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

1. 25 cm²'lik kültür kaplarına 2,5 x 10⁶ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.
2. Bir gün sonra hücreler 50 ve 100 µM'lık fisetin dozları ile muamele edilmiştir.
3. 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücreler falkon tüplere alınarak 2 mL PBS (0,1 M) içerisinde 1000 rpm'de, 4 °C 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
4. Santrifüj sonrası pellet üzerine PBS (0,1 M) + % 2,5'lik glutaraldehit karışımından 2 mL ilave edilip hücreler bir gece boyunca 4 °C'de primer fiksasyona bırakılmıştır.
5. Daha sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkama yapılarak santrifüj edilmiştir.

6. Yıkama işlemi sonrasında 2mL %1'lik ozmiyum tetroksit konularak 4 °C'de 1 saat boyunca sekonder fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
7. Fiksasyonun ardından hücreler PBS eklenerek iki kez santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj edilen hücreler pastör pipeti yardımıyla alınarak, %5'lik eriyik agarın içerisine ilave edilmiştir.
9. Elde edilen homojen hücre-agar karışımı pipet yardımıyla lam üzerine küçük damlalar halinde damlatılıp, donması beklenilmiştir.
10. Lam üzerindeki parçalar bistüri ucu yardımıyla ufak parçalara kesildikten sonra ışık görmeyecek şekilde koyu şişeler içerisine alınmış ve üstlerine %1'lik uranil asetat eklenerek 4 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
11. Süre sonunda agara gömülü hücreler 4 °C' de 10 dakika tutularak sırasıyla %30, 50, 70 ve 90'lık alkol serilerinden geçirilmiştir.
12. Daha sonra hücreler saf propilen oksitte 4 °C'de 10 dakika bekletildikten sonra 1:1 oranında propilen oksit/epon karışımı ilave edilip, 4 °C'de 2 saat karıştırıcıda bekletilmiştir.
13. Daha sonra hücrelerin saf araldite gömülebilmesi için hücreler 60 °C'de 48 saat polimerizasyona bırakılmış ve sonrasında örnekler blok haline getirilmiştir.
14. TEM'de görüntülenmesi istenilen alanlar belirlendikten sonra, blok haline getirilen örnekler trimleme işlemine tabi tutulmuştur ve ultramikrotomda (Leica Ultracut R) 60 nm kalınlığında tam ince kesitleri alınmıştır.
15. Tam ince kesitleri alınan örnekler uranil asetat- kurşun sitrat ile boyandıktan sonra TEM elektron mikroskopunda (Jeol Jem 1220) incelenmeye alınmıştır.

Tüm bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler bulgular ve tartışma kısmında sırasıyla detaylı olarak verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

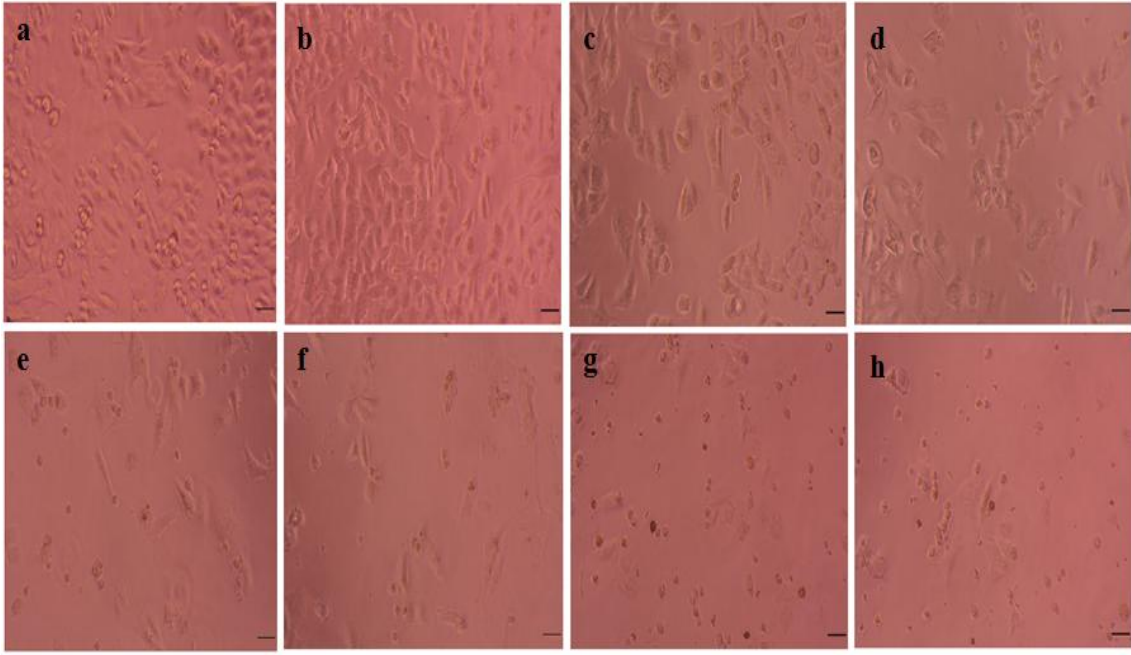
4.1. Fisetinin T98G ve BEAS-2B Hücre Dizileri Üzerindeki Morfolojik Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada 1, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 μM 'lık fisetin dozlarının T98G ve BEAS-2B hücre hatları üzerindeki 24 ve 48 saatlik doza ve zamana bağlı yaratmış olduğu morfolojik etkiler ters ışık mikroskobu yardımıyla incelenmiştir.

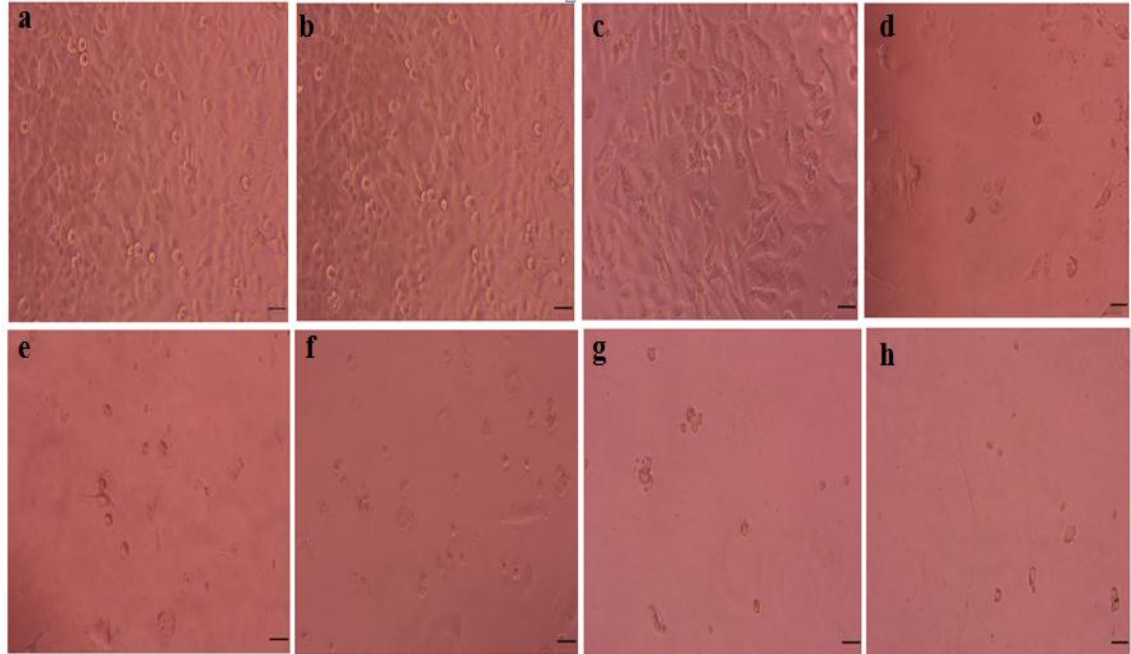
Fisetinin 24 ve 48 saat süre ile denenen 1 μM dozunun T98G hücrelerinde herhangi bir morfolojik değişiklik yaratmadığı ve hücre yoğunluğu açısından kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında bir farklılık gözlenmediği tespit edilmiştir. Fakat 50 μM dozundan itibaren kontrol grubu ile kıyaslandığında, canlı hücre sayısının azalmasıyla birlikte mekik şeklinde olan normal hücre morfolojisinin kaybolarak hücrelerin küçüldüğü, hücreler arası bağlantıların ve hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.1; Şekil 4.2).

BEAS-2B hücre hattında da 1 ve 50 μM fisetin dozunun 24 saatlik uygulamasında hücre morfolojisinde herhangi bir değişiklik yaratmadığı gözlenmiştir. 100 μM dozundan itibaren doz artışına bağlı olarak hücre sayısı ve hücreler arası bağlantıların azaldığı kontrol grubu ile kıyaslandığında tespit edilmiştir. Hücrelerin mekik şeklinde olan tipik morfolojik özelliklerinin doz artışı ile değişmediği gözlenmiştir.

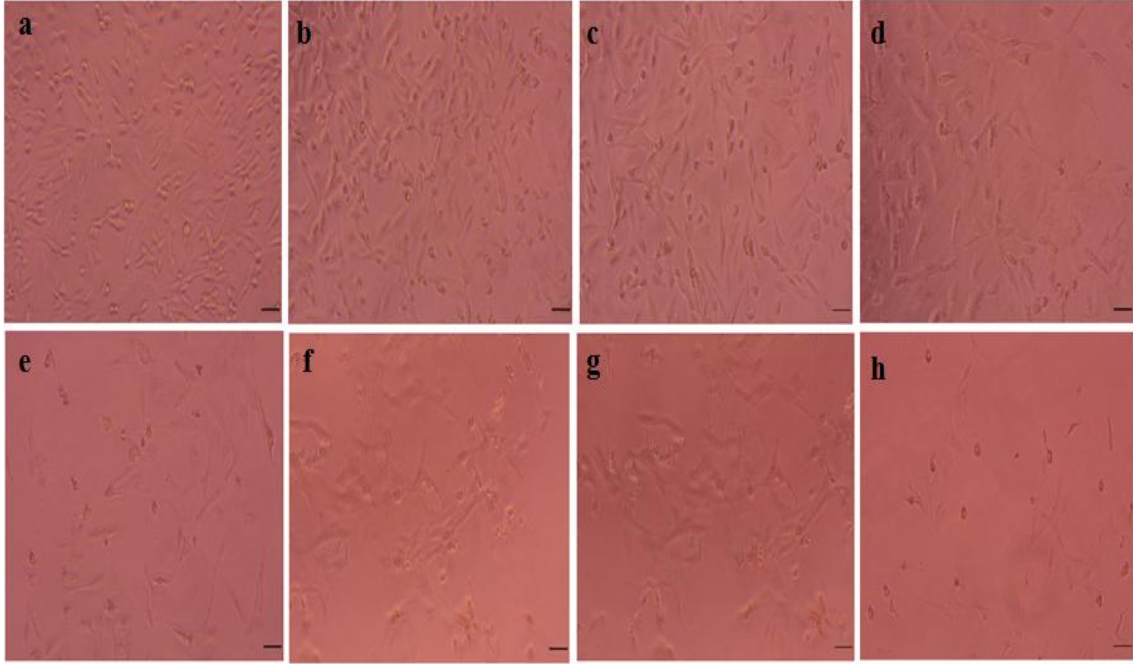
Fisetinin 1 μM dozunun 48 saatlik uygulamasında BEAS-2B hücrelerinde morfolojik değişiklik yaratmadığı, ilaç muamelesi yapılmamış hücrelerle karşılaştırıldığında tespit edilmiştir. Morfolojik değişikliklerin 50 μM dozundan itibaren görüldüğü belirlenmiştir. Doz ve süre artışına bağlı olarak, normal hücre morfolojisinin yuvarlaklaştığı, hacimce küçüldüğü, hücreler arası bağlantıların kaybolduğu ve hücre sayısının azaldığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, belirgin bir şekilde belirlenmiştir (Şekil 4.3; Şekil 4.4).



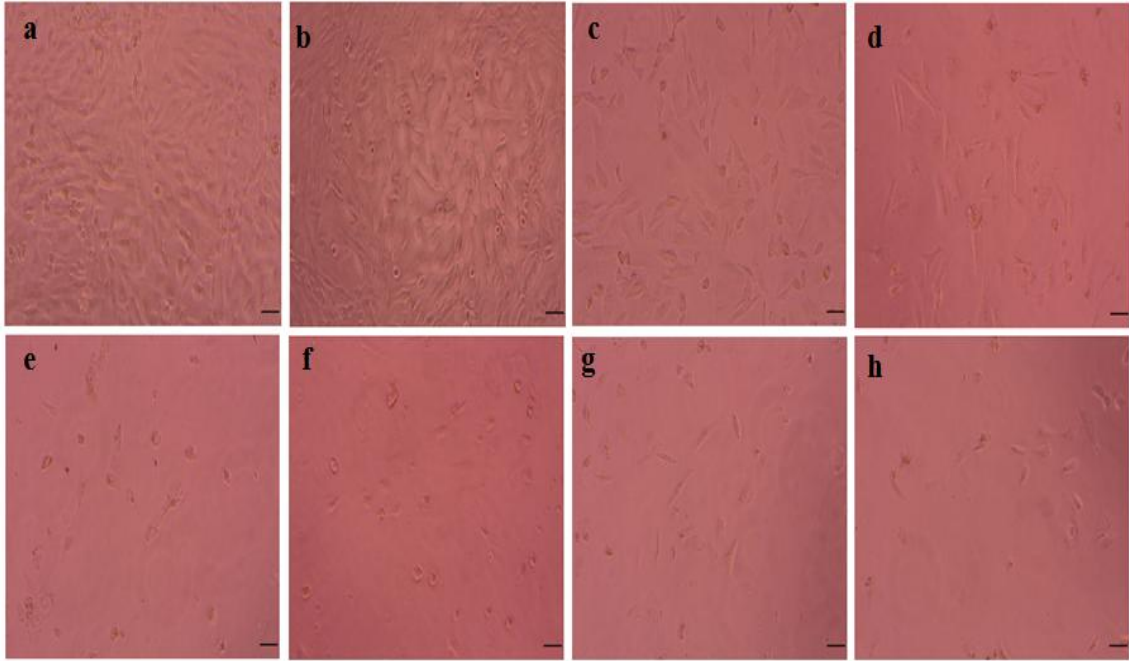
Şekil 4.1. Fisetin dozlarının T98G hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi: a) Kontrol, b) 1 μ M, c) 50 μ M, d) 100 μ M, e) 200 μ M, f) 300 μ M, g) 400 μ M, h) 500 μ M Ölçü birimi: 50 μ m.



Şekil 4.2. Fisetin dozlarının T98G hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi: a) Kontrol, b) 1 μ M, c) 50 μ M, d) 100 μ M, e) 200 μ M, f) 300 μ M, g) 400 μ M, h) 500 μ M Ölçü birimi: 50 μ m



Şekil 4.3. Fisetin dozlarının BEAS-2B hücreleri üzerinde 24 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi: a) Kontrol, b) 1 μM , c) 50 μM , d) 100 μM , e) 200 μM , f) 300 μM , g) 400 μM , h) 500 μM Ölçü birimi: 50 μm



Şekil 4.4. Fisetin dozlarının BEAS-2B hücreleri üzerinde 48 saatlik morfolojik etkilerinin görüntülenmesi: a) Kontrol, b) 1 μM , c) 50 μM , d) 100 μM , e) 200 μM , f) 300 μM , g) 400 μM , h) 500 μM Ölçü birimi: 50 μm .

Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 24 saat boyunca 80 μM fisetin ile muamele edilen insan hepatoselüler karsinoma (SK-HEP-1) hücrelerinde de fisetin belirgin bir yuvarlaklaşma ve şişmeye neden olduğu belirlenmiştir (Chen vd., 2002). Yapılan diğer bir çalışmada ise 60 ve 80 μM fisetin dozları ile muamele edilen hepatokarsinoma (Huh-7) hücre hattında doza bağlı olarak hücre sayısının azaldığı, hücreler arası bağlantıların kaybolduğu ve yuvarlaklaşmanın arttığı tespit edilmiştir (Kim vd., 2010). Benzer şekilde çalışmamızda da SK-HEP-1 ve Huh-7 hücrelerinde olduğu gibi fisetin dozlarının her iki hücre hattında da doza ve zamana bağlı olarak hücre morfolojisi ve sayısında değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir.

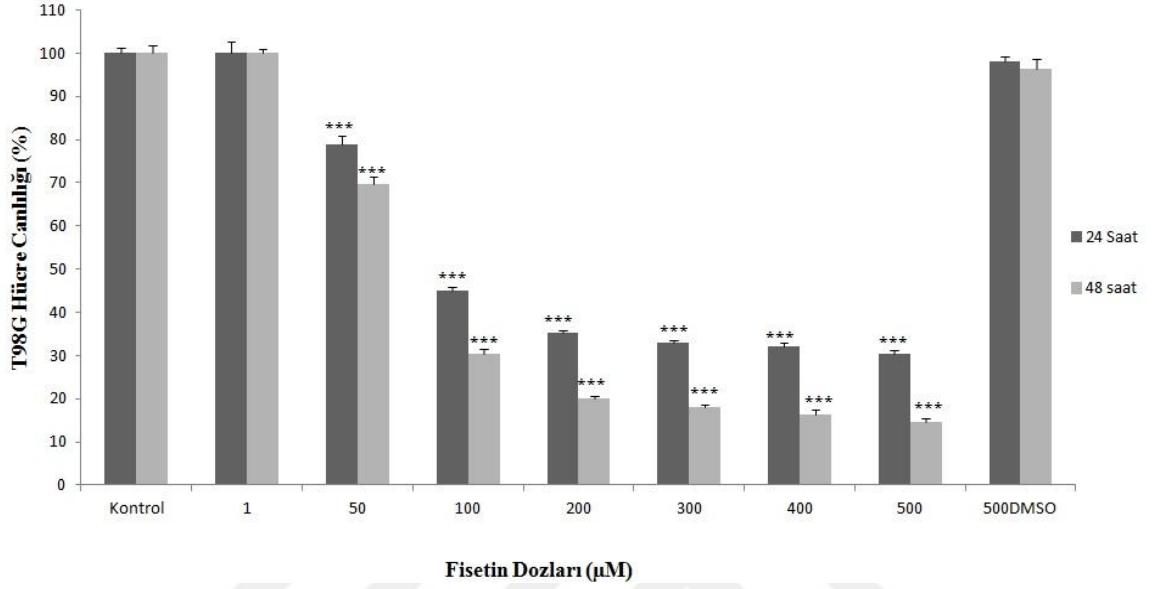
Fisetin dozlarının hem kanserli (T98G) hem de normal hücre dizilerinde (BEAS-2B) hücre morfolojileri üzerindeki farklı etkileri görsel olarakta belirlenmiştir. Her iki hücrenin dozu ve zaman artışına bağlı olarak normal hücre morfolojilerini kaybederek küçülmesi ve hücreler arası bağlantılarını kaybetmesi apoptotik hücre ölümü ile benzerlik gösterdiğini düşündürmektedir.

4.2. Fisetinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

Fisetin dozlarının hücre çoğalması üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla mitokondrial aktiviteye dayalı MTT yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada; 1, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 μM 'lık fisetin dozları ile en yüksek doz olan 500 μM için sadece DMSO içeren çözücü kontrol dozları 24 ve 48 saat süre ile T98G ve BEAS-2B hücre dizileri üzerinde uygulanmıştır.

Yirmi dört saat süre ile uygulanan 1 μM fisetin dozunun T98G hücrelerinde çoğalmayı baskılayıcı bir etki göstermediği belirlendi ($p>0,05$). Fisetinin diğer dozlarda ise hücre yaşam oranları kontrol ile kıyaslandığında sırasıyla % 21, 55, 65, 67, 68 ve 70 oranında azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,001$). 48 saat süre ile uygulanan; 1 μM fisetin dozunun çoğalmayı baskılayıcı bir etkisi gözlenmezken ($p>0,05$); diğer dozlarda hücre yaşam oranları kontrole göre sırasıyla % 31, 70, 80, 83, 84 ve 86 oranında azaldığı belirlenmiştir ($p<0,001$). Kontrole göre % 50 oranında hücre ölümüne neden olan doz olarak ifade edilen IC_{50} değeri 24 saatte 93 μM ; 48 saatte ise IC_{50} değeri 75 μM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5).

Ayrıca T98G hücrelerinde en yüksek dozumuz olan 500 μ M fisetin içerisinde bulunan DMSO miktarının hücre yaşam oranlarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı kontrol grubu ile kıyaslanarak belirlenmiştir ($p>0,05$; Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Fisetinin doza ve zamana bağlı olarak T98G hücre çoğalması üzerindeki etkisi. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

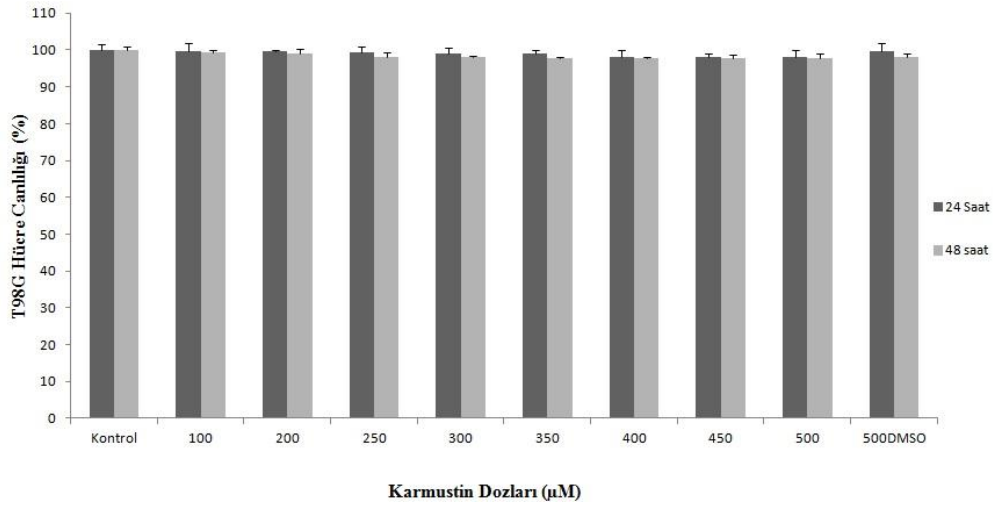
Chen ve ark., tarafından insan glioblastoma (GBM8401) hücre hattında MTT, yöntemi kullanılarak 10, 20 ve 40 μ M fisetin dozlarının etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, fisetin dozları 24 ve 48 saat denenmiş olup, hücre canlılığında doza ve zamana bağlı olarak önemli bir azalış bulunmadığı rapor edilmiştir (Chen vd., 2015). Çalışmamızda ise benzer şekilde bir insan glioblastoma hücre hattı olan T98G kullanılmasına rağmen fisetin yüksek dozlarının özellikle hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Her iki hücre hattında glioma olmasına rağmen, hücre çoğalması üzerindeki fisetin etkisi aynı olmamıştır. Bu farklılığın sebebi hücre dizilerinin katlanma zamanları, kromozom sayıları ve elde edildikleri örneklerin cinsiyet farklılıkları olabilir.

Fisetinin farklı kanser hücre dizileri üzerindeki çoğalmayı baskılayıcı etkileri çalışmamızla benzer şekilde farklı çalışmalarla da rapor edilmiştir. Örneğin; Li ve ark., tarafından insan mesane kanseri (T24; EJ ve J82) hücre dizileri ile yapılan çalışmada 60, 80 ve 100 μ M fisetin dozlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. T24 hücre hattında 24 saatlik 100 μ M fisetin uygulanmasında yaklaşık % 50'lik bir hücre ölümü gözlenirken, EJ ve J82 hücrelerinde böyle bir etki gözlenmemiştir.

Fakat 48 saatlik uygulamada 80 ve 100 μM fisetin dozlarının hücre canlılığını büyük oranda azalttığı rapor edilmiştir (Li vd., 2010). Hepatokarsinoma (Huh-7) hücre hattında yapılan diğer bir çalışmada ise 24 saat süre ile uygulanan fisetin dozlarının (20, 40, 60, 80 ve 100 μM) IC_{50} değeri 60 μM olarak belirlenmiştir (Kim vd., 2010). Hepatoselüler karsinoma (SK-HEP-1) hücre dizisi ile yapılan başka bir çalışmada ise 24 saat süre ile uygulanan 20, 40 ve 80 μM fisetin dozlarının hücrelerde doza bağlı olarak çoğalmayı baskıladığı MTT yöntemiyle bulunmuş fakat hücre azalışı hakkında herhangi bir oran verilmemiştir (Chen vd., 2002). Prostat kanseri (PC3 ve LnCAP) hücreleri üzerinde 72 saat süre ile uygulanan 6,25, 12,5, 25 ve 50 μM fisetin dozlarının ise doza bağlı olarak hücre canlılığı üzerinde baskılayıcı etkisinin olduğu akış sitometrisi yöntemi kullanılarak rapor edilmiştir (Haddad vd., 2010). Ying ve arkadaşları fisetinin 10, 20, 40, 60 ve 100 μM dozlarının sitotoksik etkilerini insan rahim ağzı (HeLa), akciğer adenokarsinoma (A549), endometrial karsinoma (RL95-2), meme adenokarsinoma (MDA-MB-231), hepatoselüler karsinoma (HepG2), osteosarkinoma (U20S) ve kolon adenosarkoma (SW480) hücre dizleri üzerinde çalışmışlardır. Yedi farklı kanser çeşidi içerisinde fisetin en fazla HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. 24 saatteki IC_{50} değeri 52 μM , 48 saatte ise IC_{50} değeri 36 μM belirlenmiştir (Ying vd., 2011). Promiyelositik lösemi (HL-60) hücrelerinde ise 48 ve 72 saat süre ile denenen 1, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 μM fisetin dozlarının 48 saatte IC_{50} değeri 82 μM , 72 saatte ise IC_{50} değeri 45 μM olarak MTT yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (Adan ve Baran, 2015).

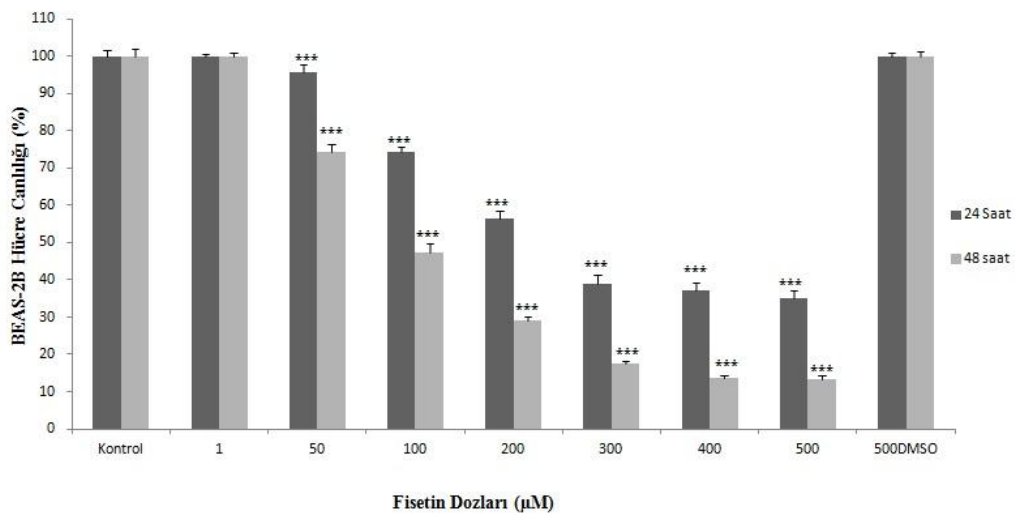
Karmustin klinik olarak glioblastoma multiforme vakalarında tedavi amacıyla kullanılan bir ilaçtır. Glioma hücreleri ile yapılan araştırmalarda karmustin araştırılacak olan maddenin sitotoksik etkinliğini kıyaslamak amacıyla pozitif kontrol olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan karmustin dozlarının (100, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ve 500 μM) hem 24 hem de 48 saatte T98G hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$; Şekil 4.6).

Szeliga ve arkadaşları 10, 100 ve 1000 μM karmustin dozlarının T98G hücre çoğalması üzerindeki etkisini 72 saat süre ile MTT yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. Çalışmada T98G hücrelerinin sayılarında azalış tespit edilmesine rağmen IC_{50} değeri hesaplanamamıştır (Szeliga vd., 2012).



Şekil 4.6. Karmustin dozlarının T98G hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik etkisi. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: $p < 0,001$).

BEAS-2B hücrelerinde 24 saat süre ile denenen 1 µM fisetin dozunda çoğalmayı baskılayıcı bir etki görülmezken ($p > 0,05$); artan dozlarda hücre yaşam oranları kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla % 4, 26, 44, 61, 63 ve 65 oranında azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,001$). 1 µM fisetin dozunun 48 saatlik uygulamasında da hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmezken ($p > 0,05$); artan fisetin dozlarında hücre yaşam oranları kontrole göre sırasıyla % 26, 53, 71, 82, 86 ve 87 oranında azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0,001$). IC_{50} değeri 24 saatte 270 µM; 48 saatte ise 90 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Fisetinin doza ve zamana bağlı olarak BEAS-2B hücre çoğalması üzerindeki etkisi. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: $p < 0,001$).

Ayrıca BEAS-2B hücrelerinde en yüksek dozumuz olan 500 μM fisetin içerisinde bulunan DMSO miktarının hücre yaşam oranlarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı kontrol grubu ile kıyaslanarak belirlenmiştir ($p>0,05$; Şekil 4.7).

Ying ve arkadaşları sağlıklı insan akciğer fibroblast (WI-38) ve insan forestin fibroblast (Hs68) hücre dizilerinde fisetinin sırasıyla 24 saatte 191 μM ve 206 μM , 48 saatte ise 178 μM ve 193 μM gibi yüksek dozlarda toksik etki gösterdiğini bulmuşlardır (Ying vd., 2011). Diğer bir çalışmada ise insan göbek kordonu ven endotel (HUVECs) hücre hattında tripan blue yöntemi kullanılarak 24, 48 ve 72 saat 10, 25 ve 50 μM fisetin dozları uygulanmıştır. Fisetinin doza ve zamana bağlı olarak sırasıyla 24 saatte % 34-82, 48 saatte %70-98, 72 saatte % 87-99 aralıklarında hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur (Bhat vd., 2012). Khan ve ark., sağlıklı prostat epitel (PrECs) hücrelerini kullanarak 10, 20, 40 ve 60 μM fisetin dozlarının etkisini doza ve zamana bağlı olarak MTT yöntemi ile araştırmışlardır. Hücre canlılığında doza ve zamana bağlı olarak sadece minimal bir azalış bulmuşlardır (Khan vd., 2008). Farklı normal hücre dizileri üzerinde yapılan bu çalışmalarda da elde ettiğimiz verilerle paralel olarak ilk 24 saatte fisetinin sitotoksik etkisinin yüksek dozlarda bile düşük olduğu belirlenmiştir.

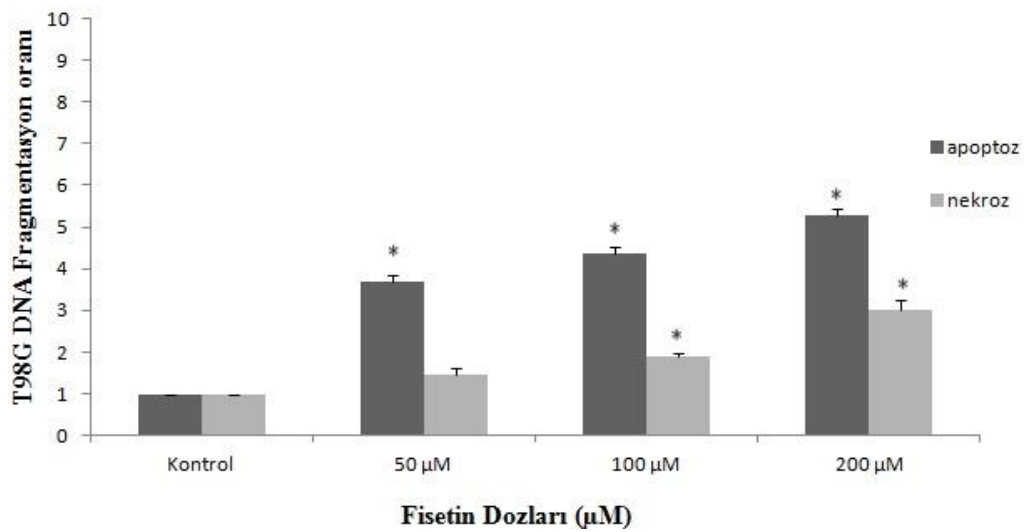
T98G hücre hattı ile sağlıklı hücre hattı olan BEAS-2B hücrelerini karşılaştırdığımızda fisetinin kanserli hücre dizisi üzerindeki 24 saatlik sitotoksik etkisinin normal hücreye oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Fisetinin 48 saatlik uygulanmasında ise her iki hücre hattında da sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenirken, bu etkinin T98G hücrelerinde daha düşük dozda olduğu hesaplanmıştır. Sonuç olarak, fisetinin 24 saatlik uygulamasının kanserli hücre dizimiz olan glioma hücreleri üzerinde daha sitotoksik bir etki gösterdiği belirlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ise bu etkinin 48 saatte ancak olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda T98G hücre hattında fisetinin klinikte sitotoksik bir ajan olarak kullanılan karmustine göre daha etkili olduğu ve düşük dozlarda hücre çoğalmasını baskıladığı belirlenmiştir.

4.3. Fisetinin T98G ve BEAS-2B Hücre Dizileri Üzerindeki Apoptotik ve Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi

DNA'nın fragmente olması apoptozun spesifik özelliklerinden birisidir. Çalışmada T98G ve BEAS-2B hücrelerinde apoptoz ve/veya nekroz oluşumunu belirlemek için sitoplazmik histonlara bağlı sitoplazmada bulunan DNA fragmentlerinin (mono ve oligo nükleozom) varlığını belirlemek amacıyla Hücre Ölümü Belirleme ELISA Kiti kullanılmıştır.

T98G hücrelerinde 50, 100 ve 200 μ M; BEAS-2B hücrelerinde ise 100, 200 ve 300 μ M fisetin dozları MTT deney sonuçları değerlendirilerek seçilmiştir. Seçilen dozlar her iki hücre hattında 24 saat süre ile uygulanmıştır. Hücrelerdeki DNA parçalanma oranları kit protokolünde belirlenen formüle göre hesaplanmış, ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerinin zenginleştirme faktörü 1 ($EF_K:1$) olarak kabul edilmiştir.

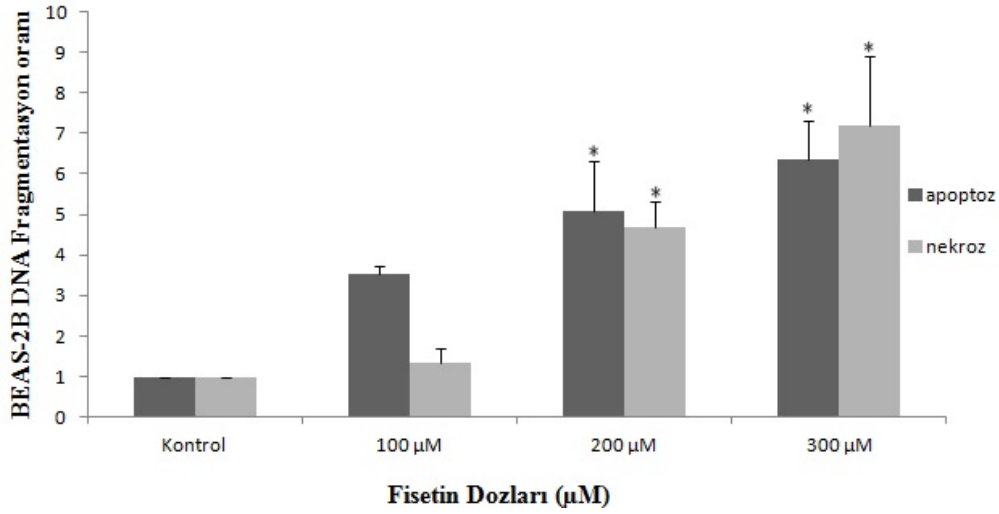
Denenen fisetin dozlarının T98G hücrelerinde DNA fragmentasyon miktarlarını doza bağlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Seçilen dozlar kontrole göre kıyaslandığında apoptotik etkinin sırasıyla, 3,7, 4,4 ve 5,3 ($p<0,05$) kat arttığı tespit edilmiştir. Aynı dozlarla muamele edilen hücrelerde ise nekrotik etkinin sırasıyla 1,5, 1,9 ve 3 ($p<0,05$) kat arttığı hesaplanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Uygulanan fisetin dozlarının T98G hücrelerindeki apoptotik ve nekrotik etkisi (*: $p<0,05$).

Daha önce fistein ile yapılan *in vitro* çalışmalarda da fisetinin doza ve zamana bağlı olarak apoptotik etkiyi arttırdığı farklı yöntemler kullanılarak çeşitli kanserli hücre dizilerinde belirlenmiştir. Örneğin; Khan ve ark., tarafından yapılan çalışmada LNCaP hücreleri ile 48 saat muamele edilen 10, 20, 40 ve 60 μM fisetin dozlarının doza bağlı olarak apoptoza neden olduğu Hücre Ölümünü Belirleme Kiti (cell death detection ELISA PLUS) ile belirlenmiştir (Khan vd., 2008). Kim ve ark., tarafından yapılan çalışmada 24 saat 100 μM fisetin ile muamele edilen Huh-7 hücrelerinde apoptozun tetiklediği DNA fragmentasyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Kim vd., 2010). Li ve ark., tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise T24; EJ ve J82 hücreleri ile 48 saat muamele edilen 60, 80 ve 100 μM fisetin dozlarının doza bağlı olarak apoptoza neden olduğu Hoescht 33258 floresans boyama yöntemiyle gözlenmiştir (Li vd., 2010). Haddad ve ark., tarafından PC3 hücreleri ile yapılan çalışmada ise 15, 25, 50 μM fisetin dozları ile 72 saat muamele edilen hücrelerin doza bağlı olarak apoptoza uğradığı Hoescht 33258 floresans boyama yöntemiyle belirlenmiştir (Haddad vd., 2010). HT-29 ve SK-HEP-1 dizileri ile akış sitometrisi yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda da fisetinin doza bağlı olarak hücreleride apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (Lu vd., 2005; Chen vd., 2002). Adan ve Baran tarafından yapılan bir çalışmada HL-60 hücre dizilerinde 72 saat muamele ettikleri 20, 50 ve 100 μM fisetin dozlarının doza bağlı olarak sırasıyla apoptozu 1,6, 6,2 ve 11,6 kat arttırdığı Annexin V-FITC Apoptozu belirleme kiti kullanılarak belirlenmiştir. HL-60 hücrelerinin 72 saatlik fisetin muamelesinde G2/M fazında sırasıyla %0,89, %8 ve %29,5 oranlarında birikmiştir (Adan ve Baran, 2015).

Fisetinin 100; 200 ve 300 μM dozları ile muamele edilen BEAS-2B hücrelerinde 100 μM fisetin dozunun kontrole göre kıyaslandığında apoptotik/nekrotik hücre ölümü üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi ($p>0,05$). 200 ve 300 μM dozlarının ise apoptotik etkiyi sırasıyla, 5,1 ve 6,4 kat, nekrotik hücre ölümünü ise sırasıyla 4,7 ve 7,2 kat arttırdığı ($p<0,05$), kontrol grubu ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Fisetin uygulanan BEAS-2B hücrelerinin 24 saatteki apoptoza ve nekroza bağlı Enrichment faktör oranları (*: $p < 0,05$).

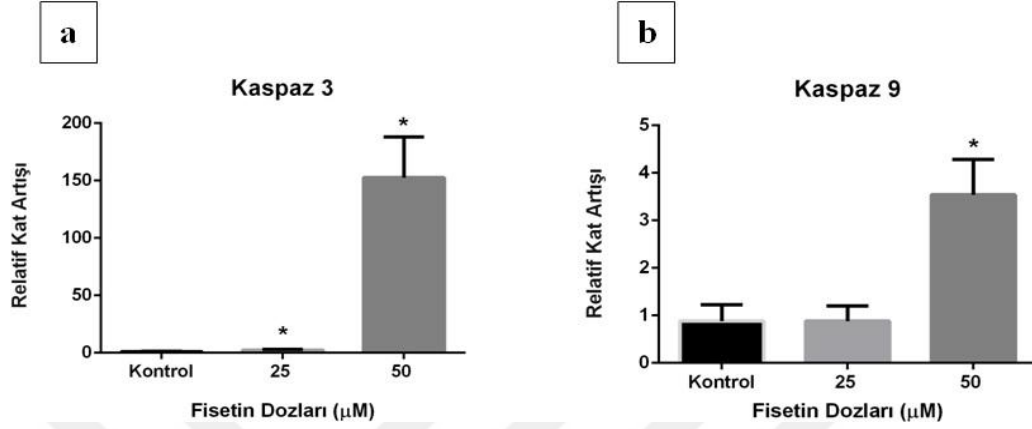
T98G hücre hattı ile sağlıklı hücre hattı BEAS-2B hücrelerini karşılaştırdığımızda fisetin glioma hücrelerinde doza bağlı olarak apoptoza neden olduğu belirlenmiştir. Maddenin nekrotik etkisi apoptotik etkisinden az olduğu gözlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ise apoptotik ve nekrotik hücre ölümü miktarının birbirine oldukça yakın olduğu bulunmuştur. Kanser tedavisinde kanserli hücrelerin apoptozdan kaçtıkları bilinmektedir. Fisetinin glioma hücrelerinde apoptotik bir etki yarattığının belirlenmesi ileride yapılacak çalışmalar için önemli bir veri olduğunu düşünmekteyiz.

4.4 Gen Anlatım Düzeylerinin Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi İle Hesaplanması

Farklı dozlarda 24 saat süreyle uygulanan fisetin T98G ve BEAS-2B hücre hatlarında apoptotik hücre ölümünde anahtar rol oynayan *KASPAZ 3*, *KASPAZ 8*, *KASPAZ 9*, *BAX*, *BCL-2* ve *SURVIVIN* genlerinin mRNA ifade düzeylerini belirlemek için RT-PZR yöntemi kullanılmıştır. Genlerin mRNA ifade düzeylerindeki relatif kat artışları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplanmıştır. Hedef genlerin ifade düzeyleri *B-AKTB*, *GAPDH* ve *HPRT1* genlerinin mRNA ifade düzeyine göre normalize edilmiştir.

T98G hücrelerinde 25 ve 50 µM fisetin dozlarının kaspaz 3 geninin mRNA ifade düzeyini kontrole göre kıyaslandığında doza bağlı olarak sırasıyla 2,4 ve 152 kat arttırdığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). Fisetinin 25 µM dozunun kaspaz 9 ve 8 mRNA ifade düzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken ($p > 0,05$), 50 µM dozunun ise kaspaz 9 mRNA

ifadesini 3,5 kat, kaspaz 8 geninin ifadesini ise 17 kat arttırdığı hesaplanmıştır ($p<0.05$; Şekil 4.10; Şekil 4.11 a).



Şekil 4.10. T98G hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) KASPAZ 3 ve b) KASPAZ 9 genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi (*: $p<0.05$).

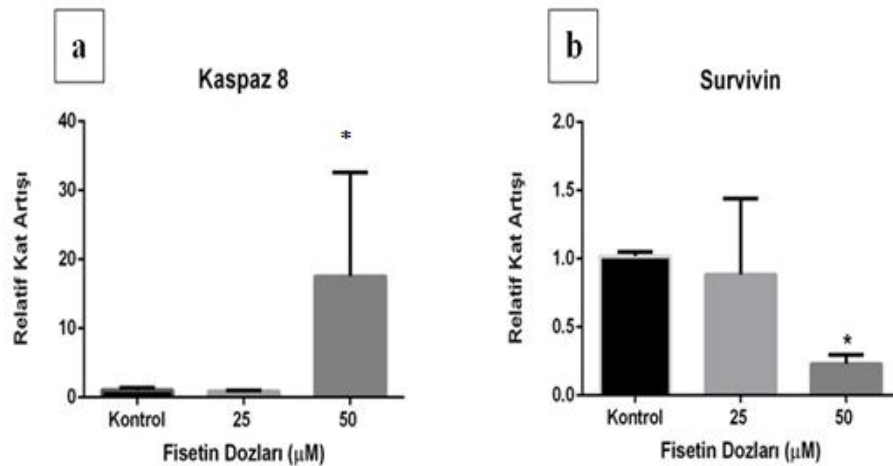
Le ve ark., HL-60 hücrelerinde 2, 4 ve 8 saatlik sürelerle denedikleri 80 µM fisetin dozunun zamana bağlı olarak kaspaz 3 aktivesini arttırdığını kolorimetrik kit yardımıyla belirlemişlerdir (Le vd., 2002). Adan ve Baran'ın HL-60 hücreleriyle yaptıkları çalışmada ise fisetin 20, 50 ve 100 µM dozlarını 72 saat denediklerinde doza bağlı olarak sırasıyla kaspaz 3 aktivitesini 1,05, 2 ve 2,2 kat arttırdığını kaspaz 3 kolorimetrik kitini kullanarak bulmuşlardır (Adan ve Baran, 2015). SK-HEP-1 hücre dizisinde denenen 40 ve 80 µM fisetin dozlarının yine kaspaz 3 aktivitesi arttırdığı Western blot tekniği ile belirlenmiştir (Chen vd., 2002). Benzer şekilde çalışmamızın sonuçları ile yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında T98G hücrelerinde de doza bağlı olarak kaspaz 3 mRNA düzeylerinin arttığı görülmektedir. Özellikle 50 µM dozundaki kaspaz 3 aktivasyonu oldukça yüksek düzeydedir. Aksine Klimaszewska ve arkadaşları 10 µM fisetin dozunu 24 saat süreyle uyguladıklarında A549 hücrelerinde kaspaz 3 gen ifadesini, kontrol grubu ile kıyaslandıklarında herhangi bir artış olmadığını RT-PCR yöntemi ile belirlemişlerdir (Klimaszewska vd., 2016). Çalışmadaki 10 µM fisetin dozunun gen aktivasyonu için düşük bir doz olduğu araştırmacılar tarafından da yayında belirtilmiştir.

T24 hücre dizisi üzerinde denenen 80 µM fisetin kaspaz 3, 9 enzim aktivitesini arttırdığı kolorimetrik kit yardımıyla ölçülmüştür. Aynı çalışmada Kaspaz 3 ve 9 gen

ekspresyonunu zamana bağlı olarak arttığı Western blot tekniği ile de belirlenmiştir (Li vd., 2010). LNCaP hücre dizisi üzerinde 50 μ M fisetin dozunun 24 saatte kaspaz 3 ve 8'i aktive ettiği kolorimetrik proteaz kiti sayesinde bulunmuştur (Szlszka vd., 2011). Khan ve ark., tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise yine LNCaP hücre dizisinde 48 saat süreyle denenilen 10, 20, 40 ve 60 μ M fisetin dozlarının doza bağlı olarak kaspaz 3, 9 ve 8 protein ifadesini arttırdığı Western blot tekniği ile belirlenmiştir (Khan vd, 2008). Yapılan bir diğer çalışmada ise HeLa hücrelerinde denenilen 20, 40 ve 80 μ M fisetin dozlarının kaspaz 3 ve 8 aktivitesini artırırken, kaspaz 9 gen aktivitesi üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı Western blot tekniği ile belirlenmiştir (Ying vd., 2011).

Farklı hücre dizileri ve farklı doz-zaman aralıklarında denenilen fisetin dozlarının kaspaz 9 ve 8 gen ifadelerinde artışa neden olduğu sadece tek bir çalışmada kaspaz 9 gen aktivitesi üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Çalışmamızın verileri değerlendirildiğinde fisetin dozlarının artışına bağlı olarak hem kaspaz 9 hem de kaspaz 8 mRNA gen ifadelerindeki artışların görülmesi diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Apoptotik sürecin başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynayan kaspaz 3, 8 ve 9 gen ifadelerindeki artışların T98G hücrelerinin apoptoza uğramasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Survivin geninin mRNA ifade düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece 50 μ M dozunda 0,2 kat ($p<0.05$) azalışa neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11 b).

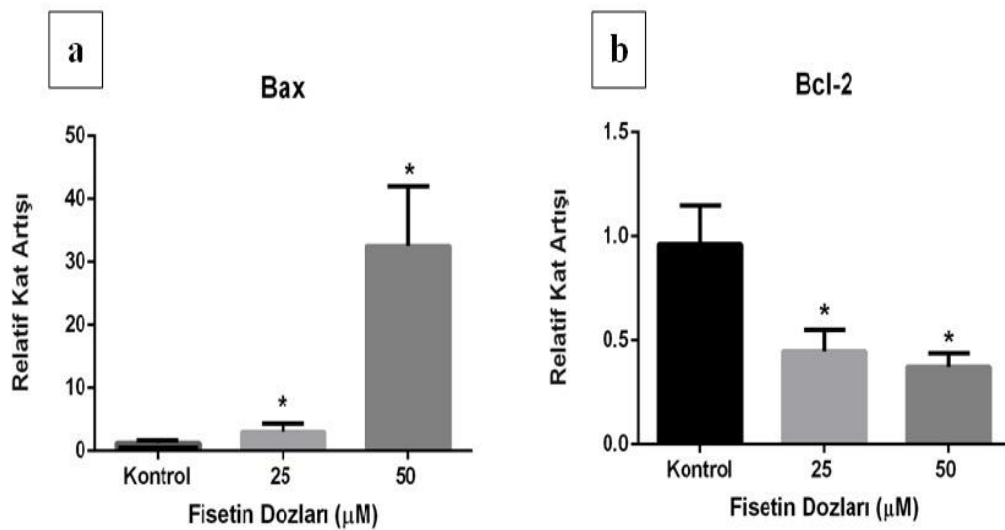


Şekil 4.11. T98G hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) *KASPAZ 8* ve b) *SURVIVIN* genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi (*: $p<0.05$).

Survivin (BIRC5 olarak da bilinir) apoptozu düzenleyen, apoptoz inhibitörü protein inhibitörlerinden (IAP) birisidir. Survivin proteini ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda pek çok kanser türünde yüksek miktarlarda ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca survivin proteinin fazla miktarda sentezlenmesinin kemoterapi direnci ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla da belirlenmiştir (Aynacı vd., 2012).

Yapılan literatür taramasında fisetinın survivinın mRNA düzeyindeki artış/azalışı ile ilgili kanser hücrelerinde yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde survivin mRNA düzeyindeki azalışın sağ kalım miktarını azaltarak glioma hücrelerini apoptozu yönlendirdiğini tespit ettik. Survivinın kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesini inhibe ederek her iki apoptoz yolunun baskılanmasını bloke ettiği ve bu sayede kanserli hücrelerin apoptozdan kaçtığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Nicholson ve Thornberry, 1997). Çalışmamızda da benzer şekilde fisetinın 50 μ M dozunda gözlenen kaspaz 3 ve 9 mRNA düzeylerindeki artışın, survivinın aktive ettiği inhibitör etkinin azalışına bağlı olarak gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

Bax geninin mRNA ifade düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak sırasıyla 3 ve 32 kat artarken ($p<0.05$; Şekil 4.12 a), Bcl-2 geninin mRNA ifade düzeyi 0,4 ve 0,3 kat azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 4.12 b).

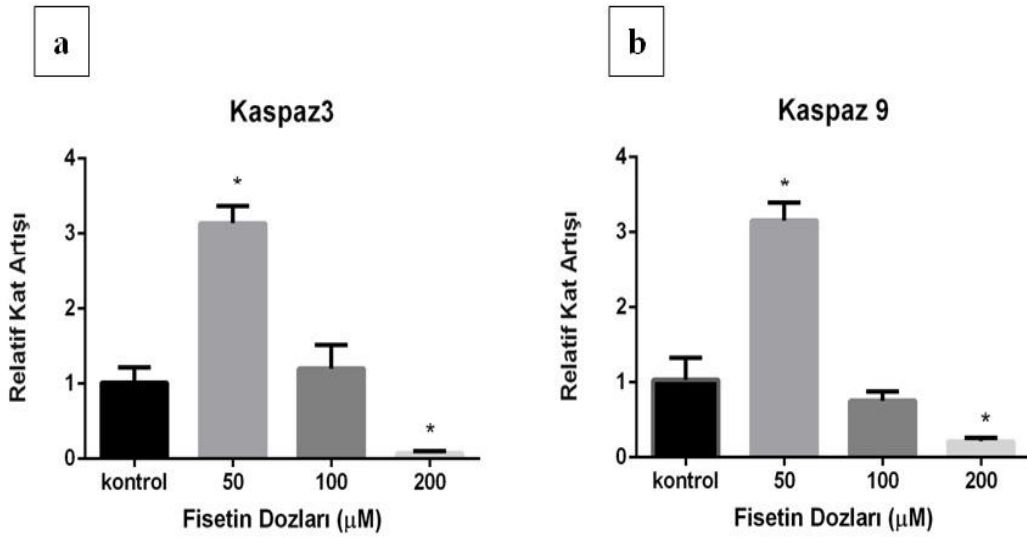


Şekil 4.12 T98G hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) BAX ve b) BCL-2 genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi (*: $p<0.05$).

T24 hücre dizisi üzerinde 48 saat süre ile denenen 60, 80 ve 100 μM fisetin dozlarının Bax protein miktarını doza bağılı olarak arttırdığı, Bcl-2 protein miktarını ise azalttığı Western blot tekniği ile belirlenmiştir (Li vd., 2010). Le ve ark., 20, 40 ve 80 μM fisetin dozlarını 12 saat süre ile uyguladıklarında Bcl-2 gen ifadesinde değişiklik yaratmadığını, Bax gen ifadesinde ise artışa neden olduğunu HL-60 hücrelerinde Western blot yöntemi ile belirlemişlerdir (Le vd., 2002). Yapılan diğer bir çalışmada ise 10 μM fisetin dozunu 24 saat süreyle uyguladıklarında A549 hücrelerinde Bax ve Bcl-2 genlerinin mRNA seviyelerini kontrol grubu ile kıyaslandıklarında gen ifadesinde herhangi bir artış olmadığını RT-PCR yöntemi ile belirlemişlerdir (Klimaszewska vd., 2016). Çalışmadaki 10 μM fisetin dozunun gen aktivasyonu için düşük bir doz olduğu araştırmacılar tarafından da yayında belirtilmiştir.

Bax geninin apoptozu tetiklediği aksine Bcl-2 geninin ise apoptozu inhibe ettiği daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Ambrosini vd., 1997). Çalışma da T98G hücrelerinde 50 μM fisetin dozunun Bax geninin mRNA ifade düzeyini artması, aksine Bcl-2 mRNA gen ifade düzeyini ise düşürmesi apoptozun tetiklediğini göstermektedir. Survivin miktarının Bcl-2 ile birlikte azalması da verilerimizi destekler niteliktedir.

BEAS-2B hücre hattında ise 24 saat süreyle uygulanan 50, 100 ve 200 μM fisetin dozlarının mRNA ifade düzeylerinde yaptıkları değişiklikler incelenmiştir. Kaspaz 3 geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında 50 ve 100 μM dozlarında sırasıyla 3,1 ($p<0.05$) kat artarken, 100 ve 200 μM fisetin dozlarında ise 1,2 ($p>0.05$) ve 0,07 kat ($p<0.05$) azaldığı hesaplanmıştır (Şekil 4.13 a). Kaspaz 9 geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında ise 50 μM dozunda 3,1 ($p<0.05$) kat artarken 100 μM ve 200 μM dozunda 0,7 ($p>0.05$) ve 0,2 kat ($p<0.05$) azaldığı hesaplanmıştır (Şekil 4.13 b).

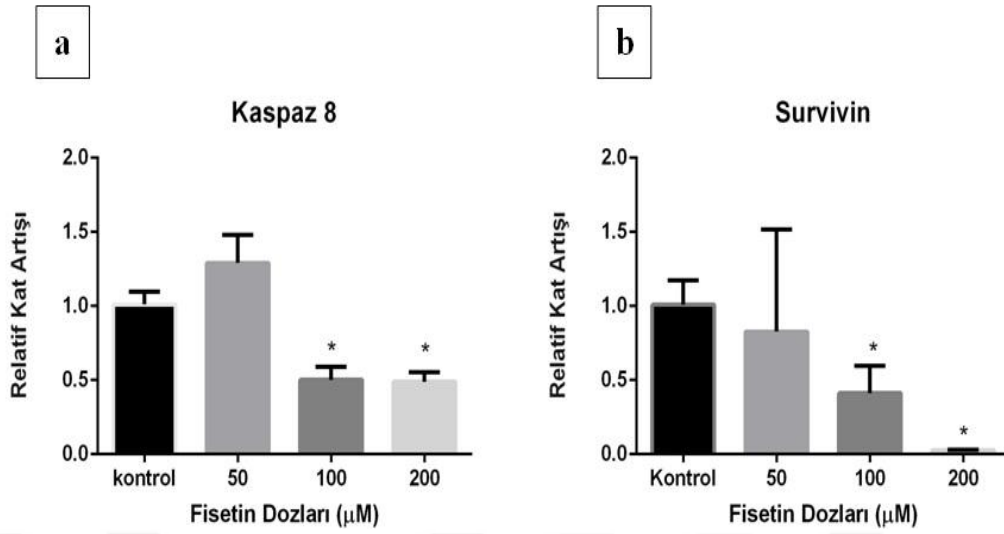


Şekil 4.13 BEAS-2B hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) *KASP3* ve b) *KASP9* genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi (*:p<0.05).

Kaspaz 8 geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında 50 µM dozunda 1,2 ($p>0,05$) kat artarken 100 ve 200 µM dozunda ise 0,5 ve 0,4 kat azaldığı hesaplanmıştır ($p<0,05$; Şekil 4.14 a).

Fisetinin normal hücrelerdeki kaspaz 3 aktivitesi ile ilgili yapılan tek bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada HUVEC₅ hücre dizisinde 10, 25 ve 50 µM fisetin dozlarını 24 saat süre ile uyguladıklarında doza bağlı olarak kaspaz 3 gen ekspresyon seviyesini arttırdığını belirlemişlerdir (Bhat vd., 2011). Kaspaz 9 ve 8 gen ifadesi ile ilgili herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

50 µM fisetin uygulanan normal hücre hattındaki kaspaz 3, 9 ve 8 mRNA düzeyindeki artışın hücreleri apoptoza yönlendirdiği gözlenmiştir. Aksine, fisetin yüksek dozlarının apoptozdan sorumlu olan bu üç gendeki mRNA ifadesindeki azalışa neden olması hücrelerin apoptozdan ziyade farklı bir yolla öldüğünü göstermektedir. Çalışmamızın apoptotik/nekrotik hücre ölümü oranlarına bakıldığında da nekrotik ölümün özellikle 300 µM dozunda 7,2 kat fazla olduğu bu sonuçlarımızı desteklemektedir. Fisetinin düşük dozlarda kaspazlar üzerinden apoptotik bir etki gösterirken, yüksek dozlarda ise kaspazlar dışında farklı mekanizmalarla hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.14 BEAS-2B hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) *KASPAZ 8* ve b) *SURVIVIN* genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi (*:p<0.05).

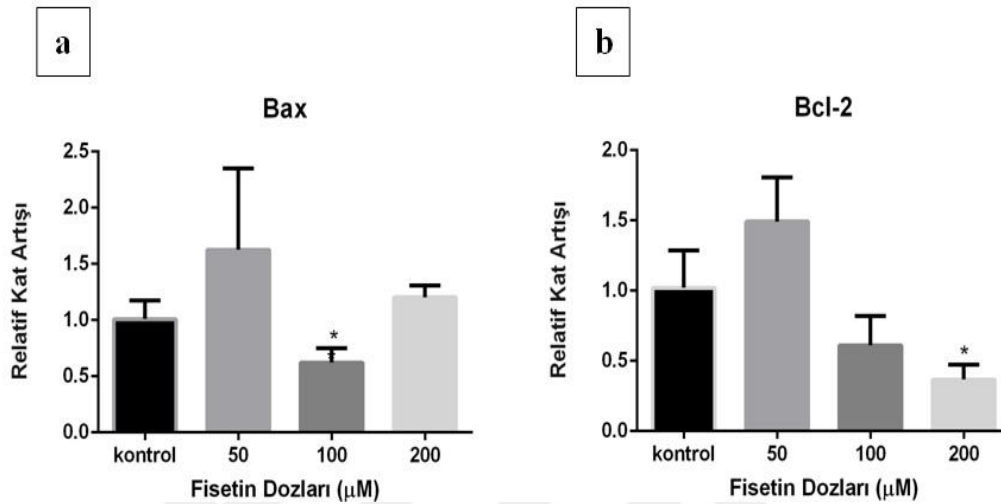
Survivin geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında 50, 100 ve 200 µM dozları sırasıyla 0,8 ($p>0,05$), 0,4 ve 0,02 kat azaldığı hesaplanmıştır ($p<0,05$; Şekil 4.14 b).

Bhat ve ark.'nın, yaptığı aynı çalışmada fisetin doza bağlı olarak çalışmamızın verileriyle benzer bir şekilde survivin seviyelerini önemli derecede azalttığı belirlenmiştir (Bhat vd., 2011).

Fisetin dozlarının normal hücrelerde de kanserli hücrelerde olduğu gibi survivin mRNA düzeyindeki azalışa bağlı olarak sağ kalımı azalttığı morfolojik ve sitotoksik sonuçlarımızda uyumlu göstermektedir. Fisetinin 50 µM dozunda survivin düzeyindeki azalışın kaspaz 3 ve kaspaz 9 ifadesinde artışa neden olduğu, aksine yüksek dozlarda ise böyle bir etki göstermediği belirlenmiştir.

Bax geninin 50 ve 200 µM dozunda mRNA ifade düzeyi sırasıyla 1,6 ve 1,2 kat arttığı belirlenirken bu artışın kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). 100 µM dozunda ise 0,6 kat ($p<0,05$) azaldığı hesaplanmıştır (Şekil 4.15 a). Bcl-2 geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında 50 µM dozunda 1,4 kat arttığı belirlenmiştir. Fakat bu artışın kontrol grubu ile kıyaslandığında

anlamli olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). 100 μM dozunda ise 0,6 kat azaldığı ancak bu azalışın kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamli olmadığı hesaplanmıştır. 200 μM dozunda ise 0,3 kat ($p<0,05$) azaldığı hesaplanmıştır (şekil 4.15 b).



şekil 4.15 BEAS-2B hücrelerinde fisetin uygulanması sonucu doza bağlı olarak a) *BAX* ve b) *BCL-2* genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi (*: $p<0,05$).

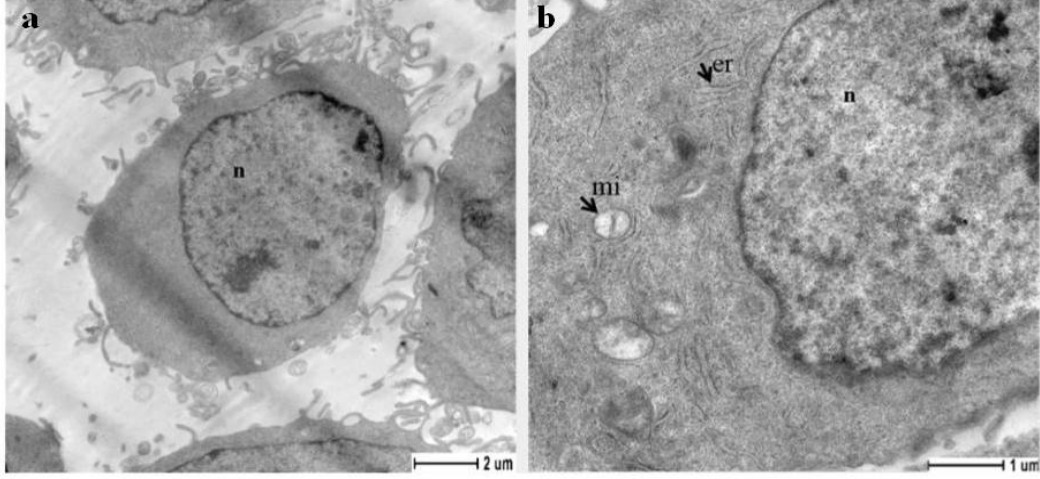
Bhat ve ark., HUVEC_s hücre dizisinde 10, 25 ve 50 μM fisetin dozunu 24 saat uyguladıklarında doza bağlı olarak Bax ekspresyon seviyesini arttırdığını, Bcl-2 seviyesini ise önemli derecede azalttığını immünoblot tekniğini kullanarak bulmuşlardır. Fisetinin 25 μM dozunda Bcl-2 seviyesi kontrol ile kıyaslandığında 0,3 kat azaldığı belirlenmiştir (Bhat vd., 2011).

Çalışmamızın verileri incelendiğinde denenen dozların Bax mRNA düzeyini 50 μM dozunda arttırdığı fakat bu artışın anlamli olmadığı yüksek dozlarda ise baskıladığı gözlenmiştir. Benzer etki Bcl-2 ekspresyonu içinde görölmektedir.

4.5. Fisetinin Hücresel Etkilerinin T98G Hücrelerinde TEM İle İncelenmesi

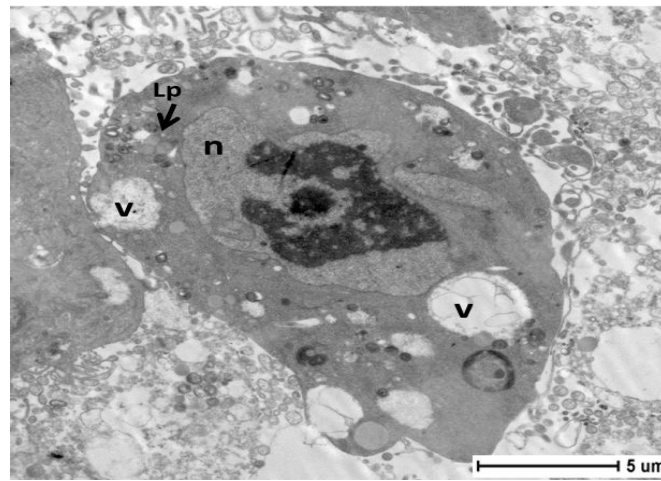
Fisetinin 50 ve 100 μM dozları ile 24 saat süre muamele edilen T98G hücrelerinde oluşan morfolojik ve hücresel değişiklikler kontrol grubu ile kıyaslanarak elektron mikroskobu yardımıyla incelenmiştir. Yapılan çalışmada kontrol grubunda, düzgün organizasyonlu nükleer kromatin yapısı, çekirdek zarı bütünlüğü, tübüler yapıda

mitokondri ve düzenli krista görünümü, normal morfolojik özellikte endoplazmik retikulum ve sitoplazmik zar bütünlüğü olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.16).

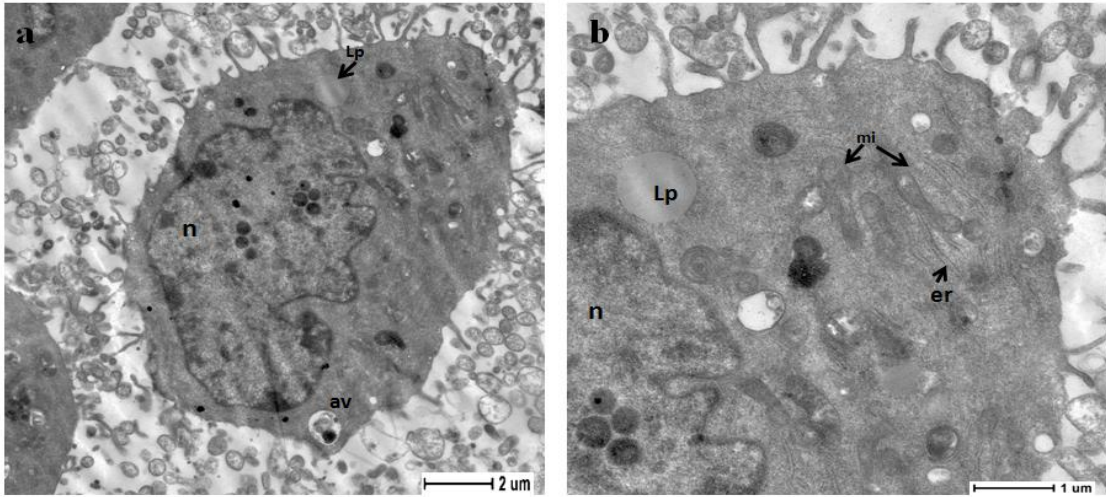


Şekil 4.16. T98G kontrol grubu hücrelerinin mikrografları. a) Normal morfolojik özellikler gösteren kontrol grubu (Skala bar: 2µm). b) Çekirdek ve hücre organellerinin daha yüksek büyütme mikroskobu (Skala bar: 1µm). n, çekirdek; mi, mitokondri; er, endoplazmik retikulum.

Fisetinin 50 µM dozunun uygulandığı hücrelerde ise, mitokondrilerde krista ve zar erimeleri gözlenmiş; az sayıda otofajik vakuol ile beraber endoplazmik retikulumda yer yer genişlemeler tespit edilmiştir. Aynı zamanda hücrenin sitoplazmasında farklı boyutlarda yağ damlacıkları ve vezikül oluşumları da belirlenmiştir (Şekil 4.17). Hücre çekirdeğinde ise büzülme, kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanması ile karakterize edilen erken evre apoptoz bulguları gözlenmiştir (Şekil 4.18).

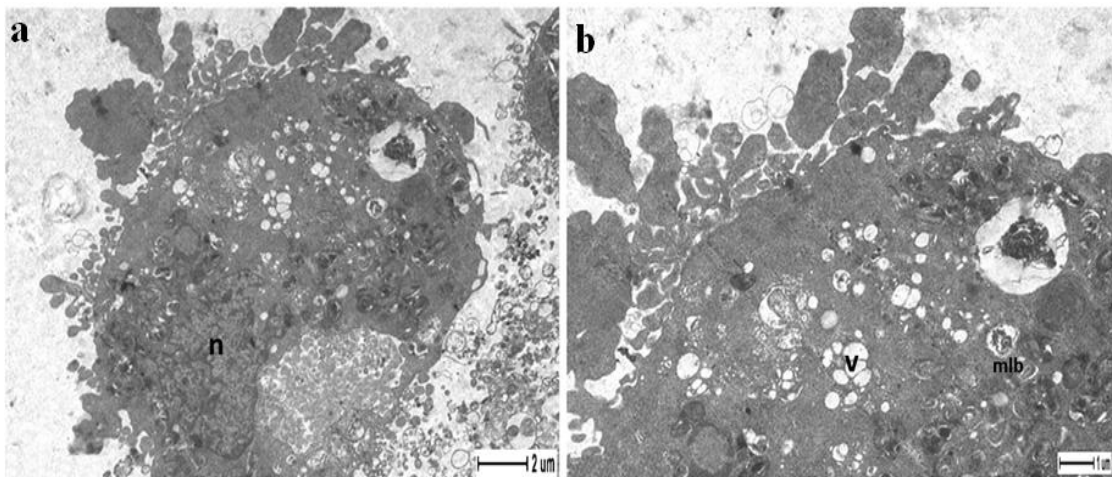


Şekil 4.17. 50 µM fisetinin uygulanan T98G hücrelerinde gözlenen değişiklikler (Skala bar: 5µm). n, çekirdek; Lp, yağ damlacıkları; v, farklı büyüklüklerdeki veziküler yapılar.



Şekil 4.18. 50 μM fisetinin uygulanan T98G hücrelerinde gözlenen değişiklikler. a) Genel hücre morfolojisi değişiklikleri (Skala bar : 2 μm). b) Daha yüksek büyütmede çekirdek ve organel yapısındaki hasarlar (Skala bar : 1 μm). n, çekirdek; mi, mitokondri; er, endoplazmik retikulum; av, otofajik vakuol; Lp, yağ damlacıkları.

Fisetinin 100 μM dozunun uygulandığı hücrelerde ise, sitoplazma yapısının elektronca yoğunlaştığı, mitokondri ve E.R. organellerinin ise büyük oranda silindiği gözlenmiştir. Sitoplazmada veziküler yapılarda ve multilamellar cisimciklerde artış gözlenirken, hücre zarındaki yapısal bozulmalar da dikkat çekici bir bulgu olarak saptanmıştır. Ayrıca çekirdeğin parçalı bir görünüm alarak hücrenin kenarına itildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Elde edilen veriler fisetinin apoptotik hücre ölümüne neden olabileceğini destekler niteliktedir.



Şekil 4.19. 100 μM fisetinin uygulanan T98G hücrelerinde gözlenen değişiklikler. a) Genel hücre morfolojisi değişiklikleri (Skala bar : 2 μm). b) Daha yüksek büyütmede çekirdek ve organel yapısındaki hasarlar (Skala bar : 1 μm). n, çekirdek; v, veziküler yapılar; mlb, multilamellar cisimcikler.

Klimaszewska ve arkadaşlarının A549 hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada 10 μ M fisetin dozunu 24 saat süreyle uyguladıklarında hücrelerde sitoplazmadaki vakualizasyon miktarının arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmada dikkat edici bir şekilde otolizozomal yapıların bulunması fisetinin otofajik hücre ölümüne neden olabileceğini belirtmişlerdir (Klimaszewska vd., 2016). Kim ve ark., 5 μ M fisetin dozunu 24 saat fare kortikol nöronal hücrelerinde (T4) denediklerinde kontrol hücreleriyle kıyasladıklarında otofajik veziküllerin sayısında artış olduğunu TEM mikroskopuyla belirlemişlerdir (Kim vd., 2016).

Li ve arkadaşları T24 ve EJ hücre hatlarında 60, 80 ve 100 μ M dozunu 48 saat uyguladıklarında doza bağlı olarak apoptoza uğramış hücrelerde görülen morfolojik değişimleri Hoechst 33258 boyama yöntemiyle belirlemişlerdir. Bu değişimlerin kromatin yoğunlaşması, çekirdek parçalanması ve apoptotik cisimciklerin oluşması şeklinde tanımlamışlardır (Li vd., 2010). Diğer bir çalışmada ise PC3 hücrelerine 72 saat 25 μ M fisetin dozu uygulanan hücrelerde Hoechst 33258 boyama yöntemi uygulandıktan sonra florasan mikroskobu ile görüntülenen hücrelerde kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanması olduğu belirlenmiştir (Haddad vd., 2010). Ying ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise HeLa hücrelerinde 24 saat uygulanan 20, 40 ve 80 μ M fisetin dozlarının çekirdek yoğunlaşmasına ve apoptotik cisimciklerin artışına doza bağlı olarak neden olduğu DAPI yöntemi ile tespit edilmiştir (Ying vd., 2011). Başka bir çalışmada ise LNCaP hücrelerine 48 saat süre ile uygulanan 10, 20, 40 ve 60 μ M fisetin dozlarının hücreleri apoptoza uğrattığı ve doz artışıyla birlikte apoptoza uğrayan hücrelerin sayısının arttığı konfokal mikroskop yardımıyla belirlenmiştir (Khan vd., 2008).

T98G hücreleri üzerinde de ilk defa denen fisetin dozlarının da benzer şekilde daha önce denen farklı kanser hücrelerinde olduğu gibi doz artışına bağlı olarak hücre morfolojisini değiştirerek hücreyi hasara uğrattığı ve bu etkinin süre artışı ile daha belirgin bir şekilde ortaya çıktığı görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada farklı kanser hücre dizileri üzerinde çoğalmayı baskılayıcı etkisi olduğu belirlenen ve bir çeşit flavonoid türevidir olan fisetin, insan merkezi sinir sisteminde yaygın olarak görülen ve ölümcül bir beyin tümörü olan glioblastoma multiforme (T98G) hücre dizisi üzerindeki etkileri ilk kez incelenerek aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Fisetinin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı morfolojik ve spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Çalışmada fisetin dozlarının hücre çoğalmasını baskılaması açısından pozitif kontrol olarak kullanılan karmustine göre daha etkili olduğunda bulunmuştur. Aynı çalışmada seçilen dozların apoptoz/nekroz oranları hesaplandığında apoptotik etkinin nekrotik etkiye göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Apoptotik süreçte etkili olan *KASPAZ 3*, *KASPAZ 8*, *KASPAZ 9*, *BAX*, *BCL-2* ve *SURVIVIN* gen ekspresyonları üzerindeki etkileri de incelendiğinde *KASPAZ 3*, *KASPAZ 9*, *KASPAZ 8*, *BAX* genlerinin mRNA ifade düzeylerini doza bağlı olarak arttırdığı, *BCL-2* ve *SURVIVIN* genlerinin mRNA ifade düzeylerini ise azalttığı bulunmuştur. Ayrıca fisetin dozlarının morfolojik ve organel düzeyinde yapmış olduğu değişimler T98G hücre dizilerinde daha ayrıntılı olarak elektron mikroskobu ile incelendiğinde hücre çekirdeğinde büzülme, kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanmasına sebep olurken, mitokondri ve endoplazmik retikulumlarda silinmeye sebep olduğu gösterilmiştir.

Son olarak da fisetin normal hücreler üzerindeki olası morfolojik, sitotoksik ve apoptotik etkileri sağlıklı insan bronşial epitelyum (BEAS-2B) hücre dizisinde araştırılarak fisetin kanserli hücre ve normal hücre üzerindeki etkileri farklı yöntemler kullanılarak karşılaştırılmıştır. BEAS-2B hücre dizilerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre sayısını azalttığı, morfolojik değişime sebep olduğu ve sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Hücre ölümünün hangi yolla olduğu araştırıldığında apoptotik etkinin, nekrotik etkiye yakın olduğu hesaplanmıştır. *KASPAZ 3*, *KASPAZ 8*, *KASPAZ 9*, *BAX*, *BCL-2* ve *SURVIVIN* gen ekspresyonları üzerindeki etkileri de incelendiğinde ise *KASPAZ 3*, *KASPAZ 8*, *KASPAZ 9*, *BAX*, *BCL-2* ve *SURVIVIN* genlerinin mRNA ifade düzeylerini düşük dozlarda arttırdığı, yüksek dozlarda ise azalttığı bulunmuştur.

Fisetinin normal hücre dizilerinin çoğalması üzerindeki etkisinin tespit edilmesine yönelik çalışmalar oldukça azdır. Fisetinin BEAS-2B hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkisinin belirlenmesi açısından ilk veriler bu çalışma ile elde edilmiştir. Fisetinin sağlıklı hücrelerde bu etkiyi hangi mekanizmalar ile gösterdiği daha önceki çalışmalarda araştırılmamış olup, süreçte görev alan moleküller ve sinyal yolları ile olan ilişkisinin detaylı olarak çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bulduğumuz verilerin sonra yapılacak çalışmalara yol göstereceğini inanmaktayız.

Fisetinin sitotoksik ve apoptotik etkileri normal ile kanserli hücrelerde karşılaştırıldığında glioma hücrelerinde daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin gerçekleşmesinde görev alan diğer genlerinde ifade düzeylerinin detaylı olarak incelenmesi ve ürüne dönüşüp dönüşmediği uygun yöntemler ile belirlenmelidir.

Ayrıca fisetinin farklı kemoterapötik ajanlarla kombine etkileşimleri farklı hücrelerde çalışmaya açık diğer bir konudur. Özellikle ilaç direnci gelişen hücrelerde fisetinin güçlü sitotoksik bir etki gösterebileceği açıktır. Normal hücrelere göre kanserli hücrelerde daha düşük dozlarda sitotoksik ve apoptotik etki göstermesi bakımından ileride glioma tedavisinde kullanılabilir bir ilaç olarak geliştirilmesinde yapılacak olan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adan, A., Baran, Y., 2015, The pleiotropic effects of fisetin and hesperetin on human acute promyelocytic leukemia cells are mediated through apoptosis, cell cycle arrest, and alterations in signaling networks, *Tumor Biol.*, 36:8973–8984.
- Akay, M.T., 1996, Genel Histoloji, 3. Baskı, İmaj Yayınevi, Ankara, s.194-196.
- Alley, M.C., Scudiere, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., 1988, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Research*, 48: 589-601.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C., 1997, A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine*, 3(8): 917-21.
- Arı, B., 2008, p53 Yolağında yer alan mdm2 ve p53 genlerinde görülen tek nükleotid polimorfizimlerinin meme kanserli hastalarda araştırılması, Yüksek Lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 88 s.
- Arslanyüreği, H., 2009, Epigallocatechin-gallat'ın C6 glioma hücrelerine apoptotik etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s. 52.
- Aynacı, E., coşkunpınar, E., Eren, A., Kum, O., Müşteri-Oltulu, Y., Akkaya, N., Turna, A., Yaylın, İ., Yıldız, P., 2012, Survivin geni -625G/C polimorfizminin Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri ile ilişkisinin Araştırılması, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 10(1):27-32.
- Banlı, H., 1997, Hacettepe Patoloji Ders Notları, Metay Yayınları, Ankara, s. 405-441.
- Bayram, F., 2012, Glioblastomlarda metil guanin metil transferaz promoter bölgesinde metilasyonun polimeraz zincir reaksiyon yöntemiyle gösterilmesi, klinik ve histopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisi, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim dalı, s. 76.
- Bayram, H., 2013, Göğüs hastalıklarında in vitro araştırma yöntemleri, *Türk Toraks Derg*, 14(2), 20-26.
- Berne, M.R., Levy, N.M., 1998, *Physiology*, 4th Edition, Mosby, p. 81-82.
- Berrak, Ö., 2014, mTOR sinyal yolağının rapamycin ile baskılanması durumunda cdk inhibitörlerinin terapötik etkilerinin LNCaP, DU145 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde incelenmesi, Yüksek Lisans tezi, İstanbul Kültür Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 126 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bhat, T.A., Nambiar, D., Pal, A., Agarwal, R., Singh, R.P., 2011, Fisetin inhibits various attributes of angiogenesis in vitro and in vivo—implications for angioprevention, *Carcinogenesis*, 1-9.
- Bilir, A., Ergüven, M., 2012, Apoptotik hücre ölümü ve mekanizmaları, II. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, Eskişehir, s. 25-37.
- Buatti, J.M., Marcus, R.B., Mendenhall, W.M., 1996, Accelerated hyperfractionated radiotherapy for malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 34: 785-792.
- Buer, C.S., Imin, N., Djordjevic, M.A., 2010, Flavonoids: new roles for old molecules, *Journal of Integrative Plant Biology*, 52 (1): 98–111.
- Caldarella, A., Crocetti, E., Buzzoni, C., Bianchi, S., Vezzosi, V., Apicella, P., Biancalani, M., Giannini, A., Urso, C., Zolfanelli, F., Paci, E., 2013, Invasive breast cancer: a significant correlation between histological types and molecular subgroups, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(4), 617-623.
- Carey, J., 2006, *Brain facts a primer on the brain and nervous system*, Fifth Edition, Society for Neuroscience, p. 6-9.
- Carpenter, M.B., 1976, *Human neuroanatomy*, 7th Edition, The William & Wilkins Company, Baltimore, p. 115-128.
- Chen, M.C., Hsieh, Y.H., Hwang, J.M., Jan, H.J., Hsieh, S.C., Lin, S.H., Lai, C.Y., 2015, Fisetin suppresses ADAM9 expression and inhibits invasion of glioma cancer cells through increased phosphorylation of ERK1/2, *Tumor Biol.*, 36: 3407-3415.
- Chen, Y.C., Shen, S.C., Lee, W.R., Lin, H.Y., Ko, C.H., Shih, C.M., Yang, L.L., 2002, Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of Caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1, *Molecular Toxicology*, 76: 351–359.
- Choi, E.J., 2007, Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21, *Nutrition and Cancer*, 59: (1), 115-119.
- Constantin, R.P., Constantin, J., Pagadigorria, C.L.S., Ishii-Iwamoto, L., Bracht, A., Castro, C.V., Yamamoto, N.S., 2011, Prooxidant activity of fisetin: effects on energy metabolism in the rat liver, *J Biochem Molecular Toxicology*, 25(2), 117-126.
- Cooper, G.M., Hausman, R.H., 2006, *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, İzmir Tıp Kitabevi, s.634-645.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Das, A., Banik, N.L., Ray, S.K., 2008, N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide induced both differentiation and apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells, *Brain Research*, 1227, 207 – 215.
- Deniz, E., 1989, *Tıbbi Biyoloji*, 4. Baskı, Özkan Matbaacılık, Ankara, s. 236-237.
- Elsamaly, H., Zenooz, N.A., Mossa-Basha, M., 2006, Glioblastoma multiforme (GBM) of the conus medullaris with brain and brain stem metastases, *European Journal of Radiology Extra*, 58, 59–62.
- Esposito, V., Baldi, A., Tonini, G., 2004, Analysis of cell cycle regulator proteins in non-small cell lung cancer, *J Clin Pathol.*, 57: 58-63.
- Eşrefoğlu, M., 2009, Cell injury and death: oxidative stress and antioxidant defense system: review, *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(6), 1660-1676.
- Felicia, V., Guthrie, N., Chambers, A.F., Carroll, K.K., 1997, Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen, *Cancer Letters*, 112, 127-133.
- Fritz, A., Percy, C., Jack, A., Shanmugaratnam, K., Sobin, L., Parkin, D.M., Whelan S., 2000, ICD-O, International Classification of Diseases for Oncology, WHO, Third Edition, p. 242.
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J.P., Biasi, S.D., Roat, E., Bertoncelli, L., Cooper, E.L., Cossarizza, A., 2011, Quercetin and cancer chemoprevention. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, doi:10.1093/ecam/neq053.
- Görür, S., 2012, Glioblastoma multiforme (gbm) beyin tümörü tedavisinde üç boyutlu konformal radyoterapi ve yoğunluk ayarlı radyoterapi tekniklerinin karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimleri Enstitüsü, 72 s.
- Haddad, A.Q., Fleshner, N., Nelson, C., Sour, B., Musquera, M., Vasundara, V., Klotz, L., 2010, Antiproliferative Mechanisms of the Flavonoids 2,2'-Dihydroxychalcone and Fisetin in Human Prostate Cancer Cells, *Nutrition and Cancer*, 62(5), 668–681.
- He, F., Riley, R.T., Sharma, R.P., 2002, Pharmacological antagonism of fumonisin B₁ cytotoxicity in porcine renal epithelial cells (LLC-PK₁): A model for reducing fumonisin-induced nephrotoxicity in vivo, *Pharmacology and Toxicology*, 90: 268-277.
- He, F., Sun, Y.E., 2007, Glial cells more than support cells, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 661-665.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Howell, A.S., Lew, D.J., 2012, Morphogenesis and the cell cycle, *Genetics*, 51-77.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., vd., 2008, Cancer Statistics 2008, *CA Cancer J Clin*, 58:71–96.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., 1993, *Basic Histology*, 7th Edition, Appleton & Lange, p. 206-209.
- Kam, P.C.A., Ferch, N.I., 2000, Apoptosis: mechanisms and clinical implications, *Anaesthesia*, 55; 1081-1093.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., 2000, *Principles of neuronal science*, 4th Edition, United States of America, p. 523-547.
- Kang, M.H., Reynolds, C.P., 2009, Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy, *Clin Cancer Res*, 15(4), 1126-1132.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, 26, 239-257.
- Khan, N., Afaq F., Syed, D.N., Mukhtar, H., 2008, Fisetin a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells, *Carcinogenesis*, 29(5), 1049-1056.
- Kısmalı, G., Sel, T., 2012, Paraquat İle Oluşturulmuş Oksidatif Stresin HepG2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkisinin Araştırılması, *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.*, 26 (2): 79 – 85.
- Kim, S., Choi, K.J., Cho, J.C., Yun, S.M., Jeon, J.P., Koh, Y.H., Song J., Johnson, G.V.W., Jo, C., 2016, Fisetin stimulates autophagic degradation of phosphorylated tau via the activation of TFEB and Nrf2 transcription factors, *Scientific Reports*, 6:24933, 1-13.
- Kim, J.Y., Jeon, Y.K., Jeon, W., Nam, M.J., 2010, Fisetin Induces Apoptosis İn Huh-7 Cells Via Downregulation Of BIRC8 And Bcl2L2, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2259–2264.
- Klimaszewska-Wisniewska, A., Halas-Wisniewska, M., Tadrowski, T., Gagat, M., Grzanka D., Grzanka, A., 2016, Paclitaxel and the dietary flavonoid fisetin: a synergistic combination that induces mitotic catastrophe and autophagic cell death in A549 non-small cell lung cancer cells, *Cancer Cell International*, 16:10, 1-23.
- Klug, S.W., Cummings, M.R., 2003, *Genetik Kavramlar*, Palme Yayıncılık, s. 17-43.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, ES, Baehrecke EH, Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., 2009, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death Differ.*, 16(1): 3–11.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, j.C., 2010, Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th edition, Saunders, p. 1629.
- Kültürsay, H., Kayıkçıoğlu, M., 2002, Apoptosis ve kardiyovasküler hastalıklar-derleme, *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 4: 323-329.
- Lee, K.S., Kim, E.Y., Cho, S.G., Han, Y.J., Yang, Y.C., Lee, S.S., Ko, M.S., Riu, K.J., Lee, H.T., Park, S.P., 2011, 3,4-Dihydroxyflavone acts as an antioxidant and antiapoptotic agent to support bovine embryo development in vitro, *J Reprod Dev.*, 57: 127-134.
- Lee, S., Kim, Y.J., Kwon, S., Lee, Y., Choi, S.Y., Park, J., Kwon, H.J., 2008, Inhibitory Effects Of Flavonoids On TNF- α -induced IL-8 Gene Expression İn HEK 293 Cells, *BMB Report*, 42(5): 265-270.
- Lee, W.R., Shen, S.C., Lin, H.Y., Hou, W.H., Yang, L.L., Chen, Y.C., 2002, Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease, *Biochemical Pharmacology*, 63, 225-236.
- Li, J., Cheng, Y., Qu, W., Sun, Y., Wang, Z., Wang, H., Tian, B., 2010, Fisetin, a Dietary Flavonoid, Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis through Activation of p53 and Inhibition of NF-Kappa B Pathways in Bladder Cancer Cells, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 108, 84–93.
- Liang, Y., Diehn, M., Watson, N., Bollen, A.W., Aldape, K.D., Nicholas, M.K., Lamborn, K.R., Berger, M.S., Botstein, D., Brown, P.O., Israel, M.A., 2005, Gene Expression profiling reveals molecularly and clinical distinct subtypes of glioblastoma multiforme, *PNAS*, 102(16), 5814-5819.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$} CT Method, *Methods*, 25: 402–408.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P., 2011, Moleküler Hücre Biyolojisi, (Çev. H. Geçkil, M. Özmen, Ö. Yeşilada), Palme Yayıncılık, s. 847- 890.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lopez, M.V.N., Cuadrado, M.P.G.S., Ruiz-Poveda O.M.P., Delfresno, A.M.V., 2007, Accame M.E.C, Neuroprotective effects of individual ginsenosides on astrocytes primary culture, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(9), 1308-1316.
- Lu, X., Jung, J. İ., Cho, H. J., Lim, D.Y., Lee, H.Y., Chun, H.S., Kwon, D.Y., Park, J.H.Y., 2005, Fisetin Inhibits the Activities of Cyclin-Dependent Kinases Leading to Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells, *The Journal Of Nutrition*, 0022-3166/05, 2884-2890.
- Lüleyap, Ü., 2008, Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, Adana, s. 263-281.
- Ma, X., Yu, H., 2006, Global Burden of Cancer, *Yale Journal of Biology AND Medicine*, 79, 85-94.
- Maher, E.A., Brennan, C., Wen, P.Y., Durso, L., Ligon, K.L., Richardson, A., Khatry, D., Feng, B., Sinha, R., Louis, D.N., Quackenbush, J., Black, P.M., Chin, L., DePinho, R.A., 2006, Marked Genomic Differences Characterize Primary and Secondary Glioblastoma Subtypes and Identify Two Distinct Molecular and Clinical Secondary Glioblastoma Entities, *Cancer Res*, 66(23), 11502-11513.
- Mamati, T.T., 2006, Glioblastoma Multiforme' de Konkomitant ve Adjuvant Temozolomid'in Radyoterapiye Katkısı, Uzmanlık Tezi, Okmeydanı Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Kliniği, s. 1-23.
- Maragakis, N.J., Rothstein, D., 2006, Mechanisms of disease: Astrocytes in neurodegenerative disease, *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(10), 679-689.
- Markiewicz, I., Lukomska, B., 2006, The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system, *Acta Neurobiological Experimentalis*, 66, 343-358.
- Meerloo, J.V., Kaspers, G.J.L., Cloos J., 2011, Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Second Edition, *Methods in Molecular Biology*, vol. 731, 237-245.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., 1997, Caspase: killer proteases, *Trends Biochem Sci.*, 22:299-306.
- Nicotera, P., Melino, G., 2004, Regulation of the apoptosis–necrosis switch, *Oncogene*, 23, 2757–2765.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Oztopcu-Vatan, P., Sayitoglu, M., Gunindi, M., Inan, E., 2015, Cytotoxic and Apoptotic Effects of Menadione on Rat Hepatocellular Carcinoma Cells, *Cytotechnology*, 67: 1003-1009.
- Patton, H.D., Fuchs, A.F., Hille, B., Scher, A.M., Steiner, R., 1989, Textbook of Physiology, 20th Edition, W.B.Saunders Company, Philadelphia, p. 764-769.
- Paul- Samojedny, M., Pudelko, A., Kowalczyk, M., Fila-Daniłow, A., Suchanek-Raif, R., Borkowska, P., Kowalski, J., 2016, Combination Therapy with AKT3 and PI3KCA siRNA Enhances the Antitumor Effect of Temozolomide and Carmustine in T98G Glioblastoma Multiforme Cells, *BioDrugs*, 30: 129–144.
- Pradelli, A.L, Beneteau, M., Ricci, J.E., 2010, Mitochondrial control of caspase-dependent and-independent cell death, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67:1589-1597.
- Rajesh, P., Richa, R., Sinha, R.P., 2009, Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity, *Excli. Journal*, 29, 155-181.
- Reithmeier, T., Graf, E., Piroth, T., Trippel, M., Pinsker, M.O., Nikkhah, G., 2010, BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors, *BMC Cancer*, 10(30), 1-8.
- Sarın, H., 2016, Conserved molecular mechanisms underlying the effects of small molecule xenobiotic chemotherapeutics on cells, *Molecular and Clinical Oncology* 4: 326-368.
- Sartorius, U., Schmitz, I., Krammer, P.H., 2001, Molecular Mechanisms of Death-Receptor-Mediated Apoptosis, *Chembiochem*, 2, 20 -29.
- Sghaiera, M.B., Skandrani, I., Nasra, N., Francac, M. G. D., Chekir-Ghediraa, L., Ghediraa, K., 2011, Flavonoids and sesquiterpenes from *Teurium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure-activity relationship study, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, AAPS, 2011; 32: 336–348.
- Shia, C.S., Tsai, S.Y., 2009, Metabolism and pharmacokinetics of 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone (fisetin), 5-hydroxyflavone, and 7-hydroxyflavone and antihemolysis effects of fisetin and its serum metabolites, *J Agric Food Chem*, 57(1): 83-89.
- Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M., Arakawa, S., 2014, Autophagic Cell Death and Cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 3145-3153.
- Shintani, T., Klionsky, D.J., 2004, Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword, *Science*, 306 (5698), 990-995.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stockert, J.C., Blazquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A., 2012, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochemica*, 114, 785-796.
- Szeliga M., Zgrzywa A., Michlewska M.B., Albrecht J., 2012, Transfection of a human glioblastoma cell line with liver-type glutaminase (LGA) down regulates the expression of DNA-repair gene MGMT and sensitizes the cells to alkylating agents, *Journal of Neurochemistry*, 123, 428- 436.
- Szliszka E., Helewski K.J., Mizgala E., Krol W., 2011, The dietary flavonol fisetin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells, *International journal of oncology*, 39: 771-779.
- Şimşek, F., Vatansever, S.H., 2014, Apoptotik ve otofajik ölümlerde hücre içi organizasyon, *Yeni Tıp Dergisi*, 31: 6-11.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., Kakde, R. B., 2008, Flavonoids as Nutraceuticals: A Review *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (3): 1089-1099.
- Temburni, M.K., Jacob, M.H., 2001, New functions for glia in the brain, *Proceedings of The National Academy of Science*, 98(7), 3631-3632.
- Touil, Y.S., Seguin, J., Scherman, D., Chabot, G. G., 2011, Improved Antiangiogenic And Antitumour Activity Of The Combination Of The Natural Flavonoid Fisetin And Cyclophosphamide In Lewis Lung Carcinoma-Bearing Mice, *Cancer Chemother Pharmacol* , 68: 445–455.
- Tuğrulu, F., 2008, Glioblastome multiformede konkomitan temazolamidle hipofraksiyone radyoterapi, *Uzmanlık tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkoloji Kliniği*, s. 1-27.
- Verkhatsky, A, Orkand, K.R., Kettenmann, H., 1998, Glial calcium:homeostasis and signaling function, *Physiological Reviews*, 78(1), 90-141.
- Vucic, D., Fairbrother, W., 2007, The Inhibitor of Apoptosis Proteins as Therapeutic Targets in Cancer, *Clin Cancer Res.*, 13(20), 5995-6000.
- Wong, R.S.Y., 2011, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to Treatment, *Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30:87, 2-14.
- Wensch, M., Minni, Y., Chew, T., Bondy, M., Berger, M. S., 2002, Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the Literature, *Neuro-Oncology*, 4, 278-299.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ying, T. H., Yang, S. F., Tsai, S. J., Hsieh, S. C., Huang, Y. C., Bau, D. T., Hsieh, Y. H., 2011, Fisetin Induces Apoptosis In Human Cervical Cancer HeLa Cells Through ERK1/2-Mediated Activation Of Caspase-8-/Caspase-3-Dependent Pathway, Arch Toxicol, DOI 10.1007/s00204-011-0754-6.

