



**MEME KANSERİ EPİTEL HÜCRELERİNDE PAN-AURORA
KİNAZ İNHİBİTÖRÜ DANUSERTİB İLE APİJENİN 8-C
GLUKOZİDİN (VİTEKSİN) ANTİKANSER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HEDİYE KILIÇ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
AĞUSTOS - 2022**

**MEME KANSERİ EPİTEL HÜCRELERİNDE PAN-AURORA
KİNAZ İNHİBİTÖRÜ DANUSERTİB İLE APIJENİN 8-C
GLUKOZİDİN (VİTEKSİN) ANTİKANSER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HEDİYE KILIÇ
ORCID ID: 0000-0001-8929-4452

MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. AHMET ATA ÖZÇİMEN
ORCID ID: 0000-0002-8871-8943

MERSİN
AĞUSTOS - 2022

ÖZET

MEME KANSERİ EPİTEL HÜCRELERİNDE PAN-AURORA KİNAZ İNHİBİTÖRÜ DANUSERTİB İLE APIJENİN 8-C GLUKOZİDİN (VİTEKSİN) ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kanser gelişmesi ve ilerlemesi sessiz, aynı zamanda tedaviye karşı direnç göstermesi nedeniyle tedavisi zor bir hastalıktır. Kanser oluşum ve ilerleme mekanizmalarının aydınlatılması amacı ile çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Kanser hücrelerinin çoğalmalarının durdurulması için farklı yöntemler aranmaktadır. Tedavi metodları geliştirilirken tedavi amaçlı pek çok molekül kullanılmaktadır. Bu projede Pan-Aurora kinaz inhibitörü olan Danusertib ile birlikte Apijenin 8-C Glukozid (Viteksin) maddesinin birlikte etkisi incelenmiştir. Danusertib ve Viteksin için WST-8 kiti kullanılarak sitotoksik IC₅₀ değeri 24., 48. ve 72. saatlerde tespit edilmiştir. Danusertib için 0.3 µM doz ve Viteksin için 1 µM doz değerleri meme kanseri hücresi olan MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Danusertib ve Viteksin'in MCF-7 hücrelerinde apoptotik etkisini incelemek için AnnexinV /PI Boyama metodu kullanılmıştır. Danusertib ve Viteksin'in MCF-7 hücresi üzerinde 48. saatte ayrı ayrı ve birlikte apoptotik etkisine flow sitometri cihazında bakılmıştır. Flow sitometri cihazından alınan veriler analiz edildiğinde Viteksin (1µM) apoptotik etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında primer apoptoz 2.24 ± 0.59 ($P_{K/V} < 0.05$). Danusertib-Viteksin'in birlikte apoptotik etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında primer apoptoz 3.07 ± 0.37 ($P_{KD+V} < 0,05$) bulunmuştur. Danusertib ve Viteksin'nin MCF-7 hücrelerinde gen ekspresyonu düzeyine etkisini incelemek için qRT-PCR metodu kullanılmıştır. qRT-PCR metodu ile apoptoz ilişkili genlerden Kaspaz-3 (Casp3), Kaspaz-8 (Casp8), Kaspaz-9 (Casp9); Metastaz ilişkili VEGF; Hücre döngüsünde mitoz bölünmede etkili AURK-B gen ifade düzeylerine bakılmıştır. qRT-PCR metodu ile Danusertib ve Viteksin'in MCF-7 hücreleri üzerinde 48. saatte gen ifade düzeyleri üzerinde ayrı ayrı ve birlikte etkisine bakılmıştır. qRT-PCR metodu ile elde edilen veriler analiz edildiğinde Danusertib ve Viteksin'in ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı tüm deney gruplarında Casp3 gen ifade düzeyinde azalmaya neden olmuştur. Casp8 gen ifade düzeyinde artış ise sadece Danusertib ve Danusertib-Viteksin'in birlikte uygulandığı gruplarda tespit edilmiştir. Sadece Viteksin uygulanan deney gruplarında Casp8 gen ifade düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Casp9 gen ifade düzeyinde Danusertib ve Viteksin'in ayrı ayrı ve Danusertib-Viteksin'in birlikte uygulandığı tüm deney gruplarında azalma tespit edilmiştir. Metastaz ilişkili gen VEGF seviyesinde ise sadece Viteksin uygulanan grupta azalma tespit edilmiştir. Viteksin grubunun VEGF gen ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $0,1347 \pm 0,01$ ($P_{CV} < 0,001$) tespit edilmiştir. Bu elde edilen veri Viteksin'in metastazda hücre migrasyonunu azalttığını düşündürmektedir. Danusertib ayrı ve Danusertib-Viteksin birlikte uygulanan deney gruplarında VEGF gen ifade seviyesinde artış tespit edilmiştir. Hücre döngüsünde mitoz bölünmede etkili olan AURK-B gen ifade düzeyinde sadece Viteksin uygulanan deney gruplarında azalma tespit edilmiştir. Danusertib ve Viteksin'nin MCF-7 hücrelerinde metastazda hücre migrasyonuna etkisini incelemek için Wound Healing (yara iyileşme) metodu kullanılmıştır. Danusertib ve Viteksin'in ayrı ayrı ve Danusertib-Viteksin'in birlikte uygulandığı deney gruplarında 48.saatte yara açılan bölgede hücre göçleri sonucu kapanma tespit edilememiştir. Deney gruplarında yara açılan bölgeye doğru hücre migrasyonu durmuştur. Danusertib (0.3 µM) primer apoptotik etki göstermiştir fakat sekonder apoptotik etki göstermemiştir. Viteksin (1 µM) primer apoptotik etki göstermiştir fakat sekonder apoptotik etki göstermemiştir. Ancak Viteksin antimigratif ve antimetastatik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu etki ile de Viteksin'in potansiyel bir antimetastatik ajan olabileceği öngörülebilir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, MCF-7, Viteksin, Danusertib, WST-8 Kit, Apoptoz.

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Ata Özçimen, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCER EFFECTS OF APIGENIN 8-C GLUCOSIDE (VITEXIN) WITH THE PAN-AURORA KINASE INHIBITOR DANUSERLIB IN BREAST CANCER EPITHELIAL CELLS

Cancer is a disease that is difficult to treat because of its silent development and progression, and its resistance to treatment. Numerous studies are carried out with the aim of elucidating the formation and progression mechanisms of cancer. Different methods are sought to stop the proliferation of cancer cells. While developing treatment methods, many molecules are used for therapeutic purposes. In this project, the combined effect of Danusertib, a Pan-Aurora kinase inhibitor, and Apigenin 8-C Glucoside (Vitexin) was investigated. The cytotoxic IC_{50} value was determined at 24, 48 and 72 hours for Danusertib and Vitexin using the WST-8 kit. The dose values of 0.3 μ M for Danusertib and 1 μ M for Vitexin were applied to MCF-7 cells, which are breast cancer cells. AnnexinV /PI Staining method was used to examine the apoptotic effect of Danusertib and Vitexin in MCF-7 cells. The apoptotic effect of Danusertib and Vitexin on MCF-7 cells separately and together at 48 hours was examined in a flow cytometry device. When the data obtained from the flow cytometry device were analyzed, the apoptotic effect of Vitexin (1 μ M) was 2.24 ± 0.59 ($P_{KV} < 0.05$) compared to the control group. When the co-apoptotic effect of Danusertib-Vitexin was compared with the control group, primary apoptosis was found to be 3.07 ± 0.37 ($PK/D+V < 0.05$). The qRT-PCR method was used to examine the effects of Danusertib and Vitexin on the level of gene expression in MCF-7 cells. Caspase-3 (Casp3), Caspase-8 (Casp8), Caspase-9 (Casp9) from apoptosis-related genes by qRT-PCR method; Metastasis-associated VEGF; AURK-B gene expression levels, which are effective in mitosis in the cell cycle, were examined. With the qRT-PCR method, the effects of Danusertib and Vitexin on MCF-7 cells on the gene expression levels at 48th hour, separately and together, were examined. When the data obtained by the qRT-PCR method were analyzed, it caused a decrease in Casp3 gene expression level in all experimental groups in which Danusertib and Vitexin were applied separately or together. The increase in Casp8 gene expression level was detected only in the groups in which Danusertib and Danusertib-Vitexin were applied together. A decrease in Casp8 gene expression level was detected only in the experimental groups to which Vitexin was applied. A decrease in Casp9 gene expression level was detected in all experimental groups in which Danusertib and Vitexin were applied separately and Danusertib-Vitexin was applied together. On the other hand, there was a decrease in the level of the metastasis-related gene VEGF, only in the Vitexin group. VEGF gene expression of the vitexin group was 0.1347 ± 0.01 ($P_{CV} < 0.001$) when compared with the control group. These data suggest that Vitexin reduces cell migration in metastasis. These data suggest that Vitexin has an effect on cell migration in metastasis. An increase in VEGF gene expression level was detected in the experimental groups applied Danusertib separately and Danusertib-Vitexin together. A decrease in the AURK-B gene expression level, which is effective in mitosis in the cell cycle, was detected only in the experimental groups to which Vitexin was applied. Wound Healing method was used to examine the effect of Danusertib and Vitexin on cell migration in Metastasis in MCF-7 cells. In the experimental groups in which Danusertib and Vitexin were applied separately and Danusertib-Vitexin was applied together, closure could not be detected as a result of cell migration in the area where the wound was opened at 48th hour. Cell migration towards the wound site stopped in the experimental groups. As a result, Danusertib (0.3 μ M) showed a primary apoptotic effect but did not show a secondary apoptotic effect. Vitexin (1 μ M) showed a primary apoptotic effect but did not show a secondary apoptotic effect. However, it has been determined that Vitexin has an antimigratory and antimetastatic effect. With this effect, it can be predicted that Vitexin may be a potential antimetastatic agent.

Keywords: Cancer, MCF-7, Vitexin, Danusertib, WST-8 Kit, Apoptosis.

Advisor: Dç. Dr. Ahmet Ata Özçimen, Department of Biology, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen sayın danışmanım Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e, Biyoloji Bölüm Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Yasemin KAÇAR'a, İstanbul Atlas Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı, Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi sayın hocam Prof. Dr. Ayhan BİLİR'e teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda desteğini esirgemeyen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın hocam Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ'a, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet Burak Yavuz ÇİMEN'e, Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca bilgi, deneyim, sabır ve nezaketini esirgemeyen arkadaşım Dr. Aşkın Hasan UÇAR'a, Dr. Ersin ÖZTÜRK'e, Arş. Gör. Elif KALE'ye, Arş. Gör. Dr. Hatice ORUÇ DEMİRBAĞ'a, doktora öğrencisi Sinem DABAĞOĞLU PSAV'a, Öğ. Gör. Leyla Ersoy'a, Uzman Biyolog Levent SEYHAN'a, Uzman Biyolog Berrin ÇETİN'e teşekkür ederim.

Tez danışmanım Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN'in doktora ve yüksek lisans ekibindeki öğrencileri Uzman Biyolog Erkan ALABAŞ, Uzman Biyolog İ. Ayberk KIRBIYIK'a, Dr. Hamide DOĞAN'a, Arş. Gör. Kevser YAŞAR'a teşekkür ederim.

Tez çalışması süresince bilgisini ve manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Belsem DENİZ'e, Nur DEMİREL'e, Şeyda GEVENCİ'ye, Özlem YILMAZ'a, Cansu GÖV'e matematik öğretmeni Kağan CARAN'a ve matematik öğretmeni Mehmet Akif YÜKSEKAL'a teşekkür ederim.

Biyoloji öğretmeni olarak çalıştığım İz Eğitim Kurumları kurucusu İbrahim Kütük'e manevi destek ve anlayışından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince teknik donanımı ile çalışma ortamı oluşturan Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM) ile MEİTAM'ın idari ve akademik personellerine ve MEİTAM akademik personeli Öğr. Gör. Derya YETKİN'e ve Öğr. Gör. Ayşegül ÇETİNKAYA'ya, Öğr. Gör. Burcu DEMİRBAĞ'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen babama, anneme, abim İbrahim KILIÇ'a ve Mehmet KAPLAN'a teşekkür ederim.

Bu doktora tez çalışması, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi (BAP) tarafından TP-3 Doktora Tez Projesi kapsamında, 2019-2-TP3-3609 proje kodu ile desteklenmiştir. BAP Birimine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kanser Oluşumuna Neden Olan Risk Faktörleri	4
2.3. Meme Kanseri	4
2.4. Memenin Anatomik Yapısı	5
2.5. Hücre Döngüsü ve Aurora Kinazlar	6
2.5.1. Hücre Döngüsü	6
2.5.2. Aurora Kinazlar	8
2.6. Pan-Aurora Kinaz İnhibitörü Danusertib	10
2.7. Apigenin 8-C Glukozid (Viteksin)	11
2.8. Apoptoz	12
2.9. Kaspazlar	15
2.10. Metastaz	16
2.11. MCF-7 Hücre Soyunun Özellikleri	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Sarf Malzemeler	18
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	18
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	18
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Deney Kitleri	18
3.2. Hücre Kültürü	19
3.2.1. Besiyeri Hazırlanması	19
3.2.2. Hücre Çözme	19
3.2.3. Hücre Pasajlama	20
3.2.4. Hücre Sayma	21
3.2.5. Hücre Dondurma	22
3.3. Danusertib ve Viteksin Stok Konsantrasyonlarının Hazırlanması	22
3.4. MCF-7 Hücrelerinde Danusertib'in ve Viteksin'in IC ₅₀ Sitotoksik Doz Değerinin WST-8 Test Kiti ile Belirlenmesi	22
3.5. MCF-7 Hücrelerinde Apoptozun APC Anneksin-V/PI Boyama ile Flow Sitometrik Analizi	24
3.5.1. APC Anneksin-V /PI Boyama	26
3.6. MCF-7 Hücrelerinde Apoptoz Yolağı ve Metastaz Yolağı ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi	27
3.6.1. RNA İzolasyon Aşaması, cDNA Sentez Aşaması, RT-PCR Aşaması	27
3.6.1.1. RNA İzolasyon Aşaması	27
3.6.1.2. cDNA Sentez Aşaması	28
3.6.1.3. RT-PCR Aşaması	29
3.7. MCF-7 Hücrelerinin Metastazında Wound Healing Metodu ile Migrasyon Analizi	30
3.7.1. Wound Healing Protokolü	30
3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Bulgular	33

	Sayfa
4.1.1. MCF-7 Hücrelerinde Danusertib'in ve Viteksin'in IC ₅₀ Sitotoksik Doz Değerinin WST-8 Test Kiti ile Belirlenme Değerlendirmesi	33
4.1.2. MCF-7 Hücrelerinde Apoptozun APC Anneksin-V/ PI Boyama ile Flow Sitometrik Analizi	34
4.1.3. MCF-7 Hücrelerinde Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi	48
4.1.4. MCF-7 Hücrelerinde Apoptoz İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi	50
4.1.5. MCF-7 Hücrelerinde Metastaz İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi	56
4.1.6. MCF-7 Hücrelerinde Hücre Döngüsü İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi	58
4.1.7. Wound Healing Metodu ile MCF-7 Hücrelerinde Migrasyon Analizi	60
4.2. Tartışma	63
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69
EKLER	78
EK1 WST-8 Kit Protokolü	78
ÖZ GEÇMİŞ	79

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Apoptozu başlatan uyarıcı faktörler	13
Tablo 3.1. Caspaz-3, -8, -9, ACTB, AURK-B, VEGF primer gen dizileri	19
Tablo 3.2. Danusertib ve Viteksin'in sitotoksik (IC ₅₀) doz değeri belirleme deney grupları.	24
Tablo 3.3. Annexin-V ile apoptozun belirlenmesinde kadrandaki floresan boyalar ve hücre grupları.	25
Tablo 3.4. Apoptoz iç ve dış yolağında görev alan β- Actin, AURK-B, Caspaz -3, -8 ve -9, VEGF gen ifade düzeylerini belirlemek için düzenlenen qRT-PCR well plate düzeni	27
Tablo 3.5. MCF- hücrelerinin cDNA sentezi için hazırlanan mix miktarları ve eklenen RNA miktarları	29
Tablo 3.6. Termalcykler protokolünde kullanılan derece ve dakika değerleri	29
Tablo 3.7. RT-PCR aşamasında kullanılan reaksiyon karışımındaki madde miktarları	29
Tablo 3.8. PCR koşulları	30
Tablo 4.1. Danusertib 24, 48 ve 72. saat doz- absorbans grafikleri	33
Tablo 4.2. Viteksin 24, 48 ve 72. saat doz -absorbans grafikleri	34
Tablo 4.3. MCF-7 hücresinde 48. saat Danusertib (0,3 μM) ve Viteksin (1 μM) doz değerlerinin 3 tekrarlı deney gruplarındaki apoptoz verilerinin ortalamaları. Verilerin istatistik analiz ile hesaplanan ±SD ve P değerleri.	35
Tablo 4.4. MCF-7 hücrelerinin RNA izolasyonu sonrasında NanoQ cihazı ile total RNA kalitesi ve miktar ölçümü (48. saat)	48
Tablo 4.5. MCF-7 hücrelerinde ACTB ve CASP3 gen ekspresyonu verileri, ± SD ve P değerleri.	50
Tablo 4.6. MCF-7 hücrelerinde ACTB ve CASP8 gen ekspresyonu verileri, ± SD ve P değerleri.	52
Tablo 4.7. MCF-7 hücrelerinde ACTB ve CASP9 gen ekspresyonu verileri, ± SD ve P değerleri.	54
Tablo 4.8. MCF-7 hücrelerinde ACTB ve VEGF gen ekspresyonu verileri, ± SD ve P değerleri.	56
Tablo 4.9. MCF-7 hücrelerinde ACTB ve AURK-B gen ekspresyonu verileri, ± SD ve P değerleri.	58
Tablo 5.1. qRT-PCR analizi ile elde edilen gen ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre 2 ^{-ΔΔCT} 'deki artma (↑) ve azalma (↓) oranları.	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Memenin anatomik yapısının önden görünüşü	5
Şekil 2.2. Ökaryot hücre döngüsünün evreleri	8
Şekil 2.3. Aurora kinaz proteinlerinin şematik gösterimi	9
Şekil 2.4 Kromozomal passenger kompleksi	10
Şekil 2.5. Danusertib'in molekül yapısı	11
Şekil 2.6. Apijenin 8-C Glukozid (Viteksin)'in molekül yapısı	11
Şekil 2.7. Kaspaz enzimleri iç ve dış apoptoz yolaklarında etkisi	16
Şekil 3.1. MCF-7 hücre morfolojisi	26
Şekil 3.2. APC Annexin-V ve Propidium İodide (PI) PE grafiğinde hücre Q populasyonları; Q1 (UL), Q2 (UR), Q3 (LL), Q4 (LR)	25
Şekil 3.3. Wound Healing 12 well plate deney düzeni	31
Şekil 3.4. Wound Healing deney grupları ve well plate kuyucuklarına hücre ekimi	31
Şekil 4.1. Kontrol1 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	36
Şekil 4.2. Kontrol2 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	37
Şekil 4.3. Kontrol3 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	38
Şekil 4.4. Danusertib1.1 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	39
Şekil 4.5. Danusertib1.2 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	40
Şekil 4.6. Danusertib1.3 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	41
Şekil 4.7. Viteksin1.1 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	42
Şekil 4.8. Viteksin1.2 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	43
Şekil 4.9. Viteksin1.3 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	44
Şekil 4.10. Danusertib-Viteksin1.1 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	45
Şekil 4.11. Danusertib-Viteksin1.2 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	46
Şekil 4.12. Danusertib-Viteksin1.3 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler	47
Şekil 4.13. ACTB gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışımaya grafiği	49
Şekil 4.14. ACTB gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi	49
Şekil 4.15. ACTB gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri	49
Şekil 4.16. Casp3 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışımaya grafiği	51
Şekil 4.17. Casp3 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi	51
Şekil 4.18. Casp3 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri	51
Şekil 4.19. Casp8 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışımaya grafiği	53
Şekil 4.20. Casp8 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi	53
Şekil 4.21. Casp8 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri	53
Şekil 4.22. Casp9 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışımaya grafiği	55
Şekil 4.23. Casp9 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi	55
Şekil 4.24. Casp9 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri	55
Şekil 4.25. VEGF gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışımaya grafiği	57
Şekil 4.26. VEGF gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi	57
Şekil 4.27. VEGF gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri	57
Şekil 4.28. AURK-B gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışımaya grafiği	59
Şekil 4.29. AURK-B gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi	59
Şekil 4.30. AURK-B gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri	59
Şekil 4.31. Wound Healing metodu ile MCF-7 hücrelerinde migrasyon analizi deney	60

	Sayfa
gruplarının 0. saat mikroskop görüntüleri	
Şekil 4.32. Wound Healing metodu ile MCF-7 hücrelerinde migrasyon analizi deney gruplarının 24. saat mikroskop görüntüleri	61
Şekil 4.33. Wound Healing metodu ile MCF-7 hücrelerinde migrasyon analizi deney gruplarının 48. saat mikroskop görüntüleri	62



SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simgesi	Tanım
AIF	Apoptoz indükleyici faktör (Apoptosis Inducing Factor)
APC	Anafaz teşvik kompleksi (Anaphase Promoting Complex)
AURK-A	Aurora Kinaz A proteini (Aurora kinase A protein)
AURK-B	Aurora Kinaz B proteini (Aurora kinase B protein)
AURK-C	Aurora Kinaz C proteini (Aurora kinase C protein)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
°C	Santigrad derece
CDI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNAase	Deoksiribonükleaz Enzimi
FBS	Fetal Bovine Serum
MCF-7	Michigian Kanser Vakfı-7 (Michigan Cancer Foundation-7)
mikro	Mikro (10 ⁻⁶)
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mili	Mili (10 ⁻³)
mL	Mililitre
mM	Milimolar
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphat Buffer Saline)
PDT	Populasyon ikiye katlama süresi (Populasyon Doubling Time)
PI	Propidyum iyodür
PRC	Replikasyon öncesi kompleks (Prereplicative Complex)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon
RNA	Ribonükleik Asit
VEGFVasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endotelial Growth Factor)
WST-8 Kit	Hücre Sayma Kiti 8 (WST-8 / CCK8), Kolorimetrik Hücre Canlılık Kiti

1. GİRİŞ

Kanser, hücrenin kontrollü bölünme düzenindeki bozulmalar sonucu meydana gelen hücre çoğalması olarak tanımlanan moleküler alt yapısı karmaşık multifaktöriyel bir hastalıktır. Hücredeki bu kontrolsüz çoğalma yönünde değişen hücre sinyal yollarının işleyişinin anlaşılması kanserin tedavi edilebilmesinde yeni yöntem ve metodların geliştirilebilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla günümüzde hücre sadece canlılık yapıtaş oluştuktan çıkmış ve tedavi hedefi haline gelmiştir. Bu nedenle hücre fonksiyonlarının tespit edilebilmesi ve hücrelerin değişim geçiren işleyişinden kaynaklı meydana gelen hastalıkların hücre düzeyinde araştırılabilmesi önemlidir. Günümüzde bilim ve teknolojinin sağladığı giderek artan avantajları, çeşitli hastalıklara yönelik tedavilerin geliştirilmesinde yeni yöntemleri de beraberinde getirmektedir. Hücre düzeyinde yapılan çalışmalar hastalıkların önlenmesi ya da hastalıkların tedavisi için etkili yöntemlerin bulunmasına yardımcı olmaktadır ve ilerleyen zaman içerisinde yardımcı olmaya da devam edecektir (Koçaklı vd., 2015). Kanser tüm dünyada giderek artan önemli bir sağlık sorunu olmakla birlikte meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser çeşididir (IARC, 2012). Bu nedenle meme kanseri üzerinde araştırma yapılması oldukça önemlidir. Hem meme kanserinin kadınlarda sık gözleniyor olması hemde hücrelerin kansere yeni tedavi yaklaşımları geliştirmede hedef haline gelmesinden dolayı bu çalışmada meme kanseri epitel hücresi MCF-7 hücresi kullanılmıştır. MCF-7 hücresi İnvaziv Duktal karsinom türü kanser hücresidir köken aldığı dokudan başka dokulara metastaz yapabilmektedir ve en yaygın görülen meme kanseri türüdür.

Kanserin moleküler düzeyde işleyiş düzeninin çözümlenmesi bu hastalığa yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesine imkân sağlayabilecektir. Tedavi yöntemleri olarak cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapi kullanılmaktadır. Kemoterapi metodu ile tedavide çok sayıda antikanserojenik etkiye sahip ajanlar kullanılmaktadır ve antikanserojenik potansiyele sahip ajanlar üzerinde araştırma projeleri devam etmektedir. Son zamanlarda birkaç küçük molekül Pan-Aurora kinaz inhibitörü geliştirilmiştir ve bunlardan bazıları Faz I ve Faz II klinik deneylerinde klinik etki göstermiştir. Bunların en gelişmiş Danusertibdir. Danusertib çok sayıda kanser türünün tedavisinde dikkate değer ölçüde potansiyel terapötik özelliği Faz I, Faz II denemelerinde araştırılmıştır (Zi vd., 2015). Ancak Danusertibin etkisi ile hücrede şekillenen pek çok mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada potansiyel antikanser madde olarak Danusertib kullanılmıştır. Pan-Aurora kinaz inhibitörü Danusertib çok çeşitli kanser hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda anti-tümör etki göstermiştir. Bu nedenle bu tez çalışmasında MCF-7 hücresinde Danusertibin sitotoksik IC₅₀ değeri, apoptotik etkisi, gen ekspresyon düzeylerine etkisi ve metastazda hücre migrasyonuna etkisi araştırılmıştır. Danusertib hücre döngüsünde görev alan Aurora Kinaz B (AURK-B)'ye etki ederek hücrede sitotoksik etkiye neden olmaktadır (Steeghs vd., 2011). Danusertib'in insan mide kanser hücresi AGS ve NCI-N78 hücrelerinde apoptotik yolları tetikleyerek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücreyi otofajiye yönlendirdiği bilinmektedir (Yuan vd., 2011).

Kanserin yaygın tedavi yöntemi olarak uygulanan kemoterapi hedef tümör kitesini ya da yoğunluğunu azaltmaktır. Bu hedeflenirken diğer doku organlarda mümkün olduğunca zarar riskini en aza indirmek gerekmektedir. Kemoterapide İlaçlı Kombinasyon (kür) Tedavisi, daha güçlü bir yanıt oluşturma, tümör hücrelerinin direnç kazanma riskini azaltma, daha uzun sürecek iyileşme sağlayabilme gibi avantajlar sunar. Kombin Tedavide ilaç etkileşimleri ile bir ilacın terapotik etkisi diğer ilaçlarla arttırılırken zararlı etkileri azaltılabilmektedir (Hsueh vd., 2017). Çeşitli doğal kaynaklardan elde edilen farklı doğal içerikler potansiyel antikanser etkileri varsa tedavi amaçlı kullanım için geliştirilmektedir. Mevcut ilaçlarla birlikte yeni ajanların kullanılması ile umut verici yeni çözümler geliştirilmeye devam etmektedir. Bu çalışmada Danusertib ile kombin ajan Apigenin 8-C glukozid (Viteksin) kullanılmıştır.

Günümüzde hücre kültürü metodu ile çoğaltılan hücrelerin üzerinde yapılan bilimsel proje çalışmaları hücreyi kontrol eden mekanizmaların daha iyi anlaşılması ile hastalıkların önlenmesinde ve hastalıkların tedavisinde oldukça önemli olacaktır. Ayrıca, *in vitro* koşullarda yapılan moleküler çalışmalar hücrede karmaşık moleküler kaskadı şeklindeki sinyal yolaklarının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır (Koçaklı vd., 2015). Hücredeki moleküler kaskadın işleyişinde değişimler kanserleşmeye neden olmakla birlikte meydana gelen işleyişin değişimi de kanserli hücrede anlaşılması gereken yeni bir moleküler düzen oluşturmaktadır. Kanserli hücrenin işleyiş düzeninin çözümlenmesi kanserin tedavisine yeni yaklaşımların geliştirilmesine imkân sağlayabilecektir.

Bu amaçla bu çalışma Danusertib ve Viteksin'in meme kanseri MCF-7 hücresi üzerindeki IC₅₀ doz değerlerinin sitotoksik, apoptotik (apoptoz ilişkili Kapaz-3, -8, -9 gen ekspresyon düzeyine), hücre döngüsü (AURK-B ekspresyon düzeyine), metastatik (hücre migrasyonu ve anjiyogenez ilişkili VEGF gen ekspresyon düzeyine) etkisi araştırılmıştır. Danusertib ve Viteksin'in sitotoksitesinin belirlenmesi amacı ile güvenilir sonuçlar veren WST-8 Kiti kullanılmıştır. Apoptotik etkiyi araştırmak için APC Annexin-V/ PI kiti kullanılarak flow sitometri cihazında primer/sekonder ve nekroz analiz edilmiştir. Gen ekspresyon düzeylerine etkilileri qRT-PCR metodu ile ölçülmüştür. Metastazda MCF-7 hücrelerinin migrasyonuna etkisi ise Wound Healing (yara iyileşmesi) metodu ile incelenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda meme kanseri tedavisinde Danusertib ve Viteksin'in antiproliferasyon, antikanser etkiye sahip olması ve Viteksin'in antimetastatik potansiyel taşıması önemlidir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Kanser

Hücresinin kontrol mekanizmasının etkisinden çıkarak hızlı ve anormal bir şekilde çoğalmasıyla oluşan kitleler, hücrelerin sayı artışına bağlı doku büyümeleri tümör olarak ifade edilmektedir. Latince tümör kelimesi, “kitle, şişlik, ur” anlamına gelmektedir (Baykara, 2016). Vücuttaki şişlik, ben ve sivilce gibi oluşumlar da kapsam olarak tümör kavramına dahil edilmektedir. Günümüzde her ne kadar tümör denildiğinde kanser anlaşılrsa da her tümör kanser değildir. Tümörler benign veya malign tümör şeklinde gelişebilmektedirler. Benign tümörler; metastaz yapmazlar, yavaş gelişirler, tümör hücrelerinin çekirdeklerinde kromatin ağı yoğunluğu fazladır. Benign tümörü oluşturan hücreler köken aldıkları doku hücrelerine benzerlik göstermektedirler. Benign tümörün çevresinde fibröz bir kapsül vardır, tümörün hücreleri damar içine geçiş yapmazlar, tümör şekil olarak yuvarlak ve muntazam gelişim göstermektedir. Malign tümörler; metastaz yaparlar, hızlı gelişirler, tümör hücre çekirdeklerinde kromatin ağı yoğunluğu fazla değildir. Malign tümör hücreleri köken aldıkları doku hücrelerine benzemezler, malign tümörler infiltratif gelişirler. Malign tümörü çevreleyen fibröz kapsülleri yoktur, damar içine geçerek metastaz yaparlar, sınırları düzensiz bir gelişim göstermektedir. Malign tümör gelişimi hızlı olduğundan, hücreler normal şeklini kazanmadan gelişir ve gittikçe şekilsizleşirler (anaplazi), büyüme ve yayılmaları enzimler aracılığıyla bulunduğu dokunun yıkımı sonucunda gerçekleşmektedir. Malign tümörlerde metastaz kan ve lenf yoluyla gerçekleşir (Özkara vd., 2020). Tümör olarak gelişen yapıların kötü huylu olanları kanser olarak adlandırılmaktadır. Kanseri, tümör şeklindeki oluşumların içinden sadece yüzde onluk bir bölümü oluşturmaktadır.

Tıp dilinde köken aldığı dokuya göre malign tümörler sarkomlar, lösemiler, lenfomalar ve karsinomlar şeklinde başlıkta gruplandırılmaktadır. Sarkomlar vücudu destekleyen ve bağlayan dokularda başlar. Sarkom yağ dokuda, kaslarda, tendonlarda, eklemlerde, kan damarlarında, lenf damarlarında, kıkırdak ve kemikte gelişebilir. En yaygın sarkomlar liposarkom ve osteosarkom tipidir. Lösemiler kan kanseridir. Lösemi kanseri kan hücreleri kontrolsüz bir şekilde bölündüğünde başlar. Lösemiler de akut lenfositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, akut miyeloid lösemi, kronik miyeloid lösemi şeklinde farklı çeşitleri bulunmaktadır. Lenfoma ve Miyelomlar lenfatik sistemde başlayan kanserlerdir. Lenfomanın ise Hodgkin olan lenfoma ve Hodgkin olmayan lenfoma şeklinde çeşitleri vardır. Miyelom antikor üreten beyaz renkli plazma kan hücrelerinde başlar ve zamanla hücre antikor üretme yeteneğini kaybeder. Karsinomlar epitelial doku, deri, iç organların ve bezlerin yüzeyini kaplayan dokularda başlar. En sık görülen kanser türüdür. Karsinom türü kanserler akciğer kanseri, kolorektal kanser, pankreas kanseri, prostat kanseri ve meme kanseridir (Kareva, 2018).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2004 yılında tüm dünyada kanser nedeniyle ölüm 7.4 milyon (tüm ölümlerin %13'ü), bu ölümlerin %70 kadarı düşük veya orta sosyo-ekonomik gelir düzeyine sahip ülkelerde görülmektedir. Kanseri tanı sayısı 2005 yılında 11 milyon, kanser nedeniyle

ölüm 7 milyon, kanserle yaşayan 25 milyon hasta tespit edilmiştir. Gelecekte 2030 yılı için 27 milyon yeni tanı, 17 milyon ölüm ve kanserli hasta sayısının 75 milyon olacağı tahmin edilmektedir (Korkmaz, 2012). Kanser vaka sayısı 2040 yılı için yapılan tahminlerde 2020 yılındaki 19.292.789 olan kanser vaka sayısının 28.881.940 kadar yükseleceği tahmin edilmektedir (IARC, 2020). Uluslar Arası Kanser Araştırma Ajansı 2020 yılından 2040 yılına kadar kanserli vaka sayısındaki tahmini artış miktarının Asyada 5.627.068, Avrupada 5.323.597, Kuzey Amerikada 3.525.597, Afrikada 2.097.365 kadar olacağını öngörmektedir (IARC, 2020). Öngörülen bu kanser tahmini vaka sayılarında kadın hastalarda en çok rastlanan kanser türleri meme kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri, servikal kanserler, tiroid kanseri, mide kanseri şeklinde olup kadınlarda görülen kanser türleri arasında meme kanseri ilk sırada yer almaktadır (Korkmaz, 2012). Erkek hastalarda ise en sık rastlanan akciğer kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri, karaciğer kanseri, ösefagus kanseridir. Erkeklerde meme kanseri görülmede (%1) kadınlarda görülme oranına (%25.4) göre daha düşük değerlerdedir (IARC, 2020).

2.2. Kanser Oluşumuna Neden Olan Risk Faktörleri

Kanser oluşumuna pek çok faktör neden olabilmektedir. Kanserde risk faktörleri şunlardır: cinsiyet ve yaş, genetik yatkınlık veya aile öyküsü, bağışıklık sistemi zayıflığı, alkol tüketimi, aşırı kilo kaybı ve obez olma durumu, diyet ve beslenmedeki yanlışlıklar, fiziksel aktivite azlığı, sigara kullanımı, radyasyona maruz kalma, tehlikeli kimyasal ajanlar ve enfeksiyona neden olan bulaşıcı ajanlar. Bu risk faktörlerinin yanısıra erken menarş, geç menopoz gibi endojen östrojene maruziyeti artıran üreme faktörleri ve menopoz sonrası kullanılan östrojen-progesteron hormonlarının kombinasyonu meme kanseri riskini artırmaktadır (Akyolcu vd, 2019; Jacob, 2018).

2.3. Meme Kanseri

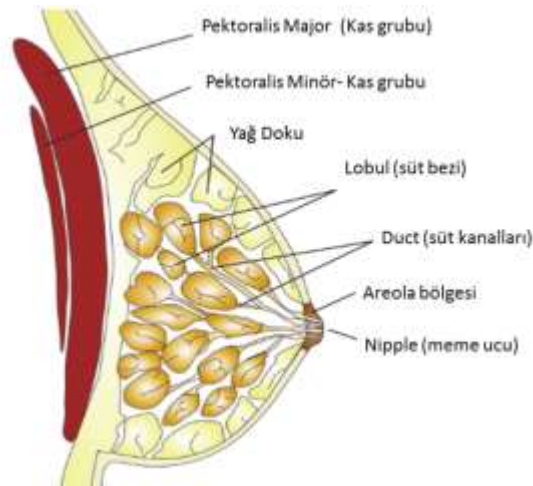
Kadınlarda meme kanseri türlerinde adlandırma yapılırken kullanılan ifadelerden duktal, memedeki süt kanallarıdır. Lobüler, memede süt üretimi yapılan süt bezleridir. Karsinoma, meme dokusuna ait hücrelerin anormalleşmesi, kansere dönüşmesidir. In situ, erken dönem meme kanserleri için kullanılan bir ifadedir. Bu kavram, kanserli hücrelerin buldukları süt kanalı ya da süt bezlerinin dışına henüz çıkmadığını, yayılmadığını ifade etmektedir. İnvaziv (infiltratif), kanser hücrelerin buldukları doku ortamından çıkıp meme dokusunun tamamına yayılmaya başlamasıdır. Bu ifadeler kullanılarak meme kanseri türleri adlandırılırken aynı zamanda kanserin hangi aşamada olduğu da ifade edilmektedir. Meme kanseri invaziv ve noninvaziv olmak üzere temelde iki gruba ayrılmaktadır. İnvaziv özellik gösteren İnvaziv Duktal Karsinoma (IDC) ve İnvaziv Lobüler Karsinoma (ILC)'dir. İnvaziv özellikte olmayanlar ise Duktal Karsinoma In Situ (DCIS) ve Lobüler Karsinoma In Situ (LCIS)'dür (Haydaroglu, 2015). Lobüler Karsinoma In Situ kanser grubunda ifade edilsede tam olarak

kanser değildir. İnvaziv meme kanseri için risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. En yaygın görülen meme kanseri türü, İnvaziv Duktal Karsinomdur.

Meme kanserlerinde kanserin türünü net olarak söyleyebilmek için hormon reseptörlerine de bakılması gerekmektedir. Meme Kanseri Hormon Çeşitleri; Östrojen, Progesteron ve Her2'dir. Her2 ise epidermal büyüme hormonudur bu hormonun bireyde pozitif durumda olması kanser hücresinin hızlı büyüdüğü anlamına gelmektedir. Meme kanseri, bu hormon çeşitlerine göre de dört grupta gruplandırılmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri; bahsettiğimiz üç hormon reseptörünü de taşımayan kanser türüdür. Meme kanserleri içerisinde yaklaşık %10-20'lik oranda bu kanser tipi görülmektedir. Üçlü pozitif meme kanseri; üç hormon reseptörünün de görüldüğü meme kanser türüdür. Meme kanserleri içerisinde yaklaşık %20-25'lik oranda bu kanser tipi görülmektedir. Dişi cinsiyet hormonları pozitif, Her2 negatif; en çok görülen meme kanseri türüdür. Meme kanserleri içerisinde yaklaşık %70-75'lik oranda bu kanser tipi görülmektedir. Dişi cinsiyet hormonları negatif, Her2 pozitif; bu kanser türü de dördüncü tip meme kanseridir (Akyolcu vd., 2019).

2.4. Memenin Anatomik Yapısı

Meme anatomik yapısı Şekil 2.1'de gösterildiği gibi vücut yağı (yağ dokusu), loblar, lobüller, süt kanalları, lenf düğümleri, kan damarları ve yağ dokusundan oluşmaktadır. Meme anatomik yapısı genellikle 12-20 lobdan oluşmaktadır. Bu lobların her biri, süt bezleri olarak bilinen ve lobüller denilen daha küçük alt ünitelerden oluşur. Loblar ve lobüller süt kanallarıyla bağlantılıdır (Başoğlu, 2010). Loblar, lobüller ve süt kanalları arasında kanser oluşma ihtimali yüksektir. Çalışmada kullanılan MCF-7 kanser hücresi metastaz yapabilen İnvaziv Duktal Karsinom (IDC, İnvaziv Duktal Carcinoma) türü kanser hücresidir. Duktal kanallarda (süt kanalları) gelişme göstermektedir (Haydaroğlu, 2015).



Şekil 2.1. Memenin anatomik yapısı yandan görünüşü (Feng vd., 2018).

2.5. Hücre Döngüsü ve Aurora Kinazlar

Aurora kinazlar hücre yaşam döngüsünün hücre bölünmesinde görev alan enzim grubudur.

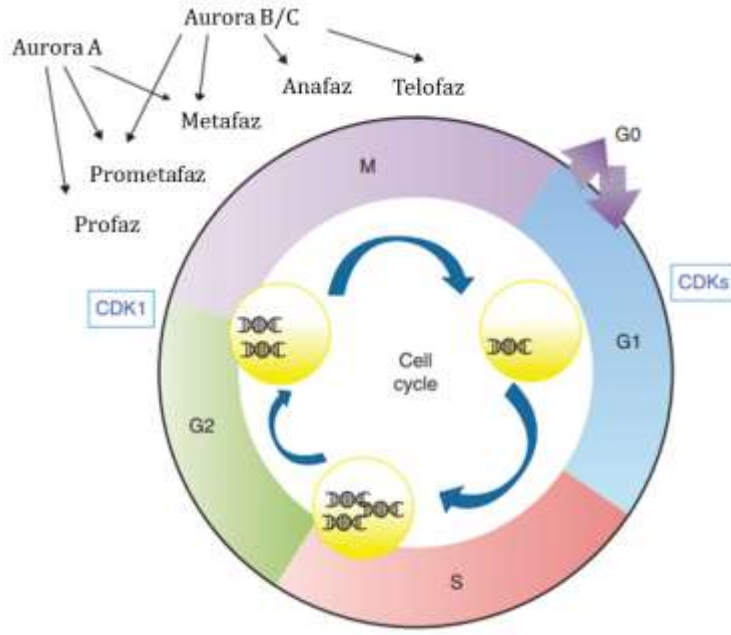
2.5.1. Hücre Döngüsü

Hücre yaşam döngüsü hücrenin yaşamı boyunca meydana gelen olayların sırasını ifade etmektedir. Hücre yaşam döngüsü Şekil 2.2’de gösterildiği gibi interfaz evresi ve mitotik evre olarak iki ana aşamadan oluşur. Bölünme özelliğini koruyan hücrelerde hücre döngüsünün interfaz evresi G_1 , S, G_2 aşamalarından oluşur. Mitotik evre ise mitoz evresi ve sitokinez evresinden oluşur. İnterfaz evresinde hücrenin uyarılması ve büyümesi meydana gelmektedir. İnterfaz evresinde hücre bölünme sinyali almadığı zaman hücre döngüsünden çıkarak G_0 fazında beklemektedir. Hücre yaşam döngüsünün interfaz aşamasına ait G_1 , S ve G_2 fazları döngünün %85’den fazla bir oranını kapsamaktadır ve interfaz evresi yaklaşık 18-24 saat kadar sürmektedir. Yaşam döngüsünün kalan 2-3 saatlik kısmı mitotik evrenin gerçekleştiği süredir (Cabadak, 2008).

İnterfazın G_1 fazında hücrede yeterli oranda büyüme meydana gelip gelmediği kontrol edilir. Her hücre doğal yaşam alanı olan mikroçevresinden sinyal moleküllerini alır ve büyüme sürecini destekleyen moleküler iletişim süreçlerini başlatır. G_1 fazında DNA replikasyonu için RNA ve protein sentezi gibi ön hazırlıklar yapılır. S fazında DNA replikasyon tamamlandıktan sonra G_2 fazında hücre büyüme faaliyetini devam ettirir. İnterfaz sürecinden sonra hücre mitotik sürece geçer. Mitotik süreç profaz, metafaz, anafaz, telofaz evrelerinden oluşmaktadır. Telofaz ile mitotik evre tamamlanır hücre sitokinez sürecine geçer. Sitoplazma paylaşımında tamamlanmasıyla birbirinin genetik kopyası olan yavru hücreler oluşur (Lai vd., 2020).

Hücre bölünme sürecinin düzgün ilerleyebilmesi için iki temel gereksinimin karşılanması gerekir: Birincisi hücre genom bütünlüğü korunmalıdır ve ikincisi hücre çekirdeği ile sitoplazma arasındaki oranın hücre yaşamıyla uyumlu sınırlar içinde olması gerekir. Hücre bölünme süreci DNA eşlenmesi, kromozom ayrılması, hücre kütesinin ikiye katlanması ve organel sayısının iki katına çıkması, sitoplazma bölünmesi gibi olaylar dizisini içermektedir. Hücreler, hücre döngüsünün her bir aşamasını yöneten moleküler kümelerinin doğru sıralı aktivasyonunu ve inaktivasyonunu sağlamak için bir moleküler kontrol sistemi geliştirmiştir. Hücre hem dıştan hem de içten gelen sinyallere uyum sağlamıştır. “Hücre döngüsü kontrol noktaları” olarak bilinen kontrol mekanizmaları, hücre döngüsü boyunca belli evrelerde ilerleyişi kontrol eder. Hücre döngüsü kontrol noktalarında DNA eşlenmesinde ve kromozom ayrılmasında olası hasarlar saptanır. Hücre döngüsü kontrol noktaları bu hasarlar onarıncaya kadar hücre döngüsünün ilerlemesini durdurur. Hücre döngüsünde sonraki aşamaya geçiş bir önceki sürecin uygun şekilde tamamlanmış olması durumunda gerçekleşmektedir (Kastan&Bartek, 2004). Ayrıca, hücrede bazı durumlarda hasarların çok büyük düzeyde olması ve tam olarak tamir edilememesi durumunda, aynı kontrol mekanizmaları hücre döngüsünün kalıcı olarak

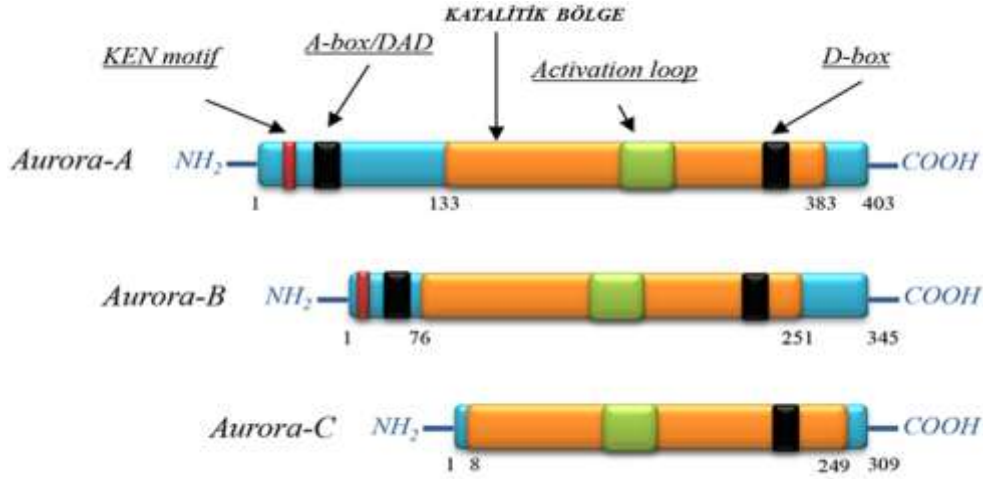
durdurulmasını veya hücre döngüsünde apoptozisi tetikler. G_1 kontrol noktasındaki duraklama, hasarlı DNA'nın hücre S evresine girmeden onarılmasına imkân sağlar. Böylece, bu aşamada DNA'nın hasarlı kopyalanması engellenir. G_2 kontrol noktasında genom tamamıyla kopyalanmadan veya hasara uğramış DNA tamir edilmeden M evresine geçiş engellenmektedir. Ancak, bundan sonra G_2 'deki engelleme ortadan kalkar ve hücre mitozla geçerek, tümüyle kopyalanmış kromozomları yavru hücrelere dağıtır. Diğer bir kontrol noktası, mitoz sonuna doğru ortaya çıkan M kontrol noktasıdır. M kontrol noktasında kromozomların mitotik iğ iplikleri üzerinde düzenli bir şekilde tutunup tutunmadıkları kontrol edilmektedir. İğ ipliklerinin kromozom üzerinde doğru tutunmaları sayesinde kromozomların paylaşımı ve yavru hücrelere tam bir kromozom seti halinde geçmeleri sağlanır. Mitotik iğ iplikleri üzerinde yer alan kromozomların biri veya birkaçı eksilirse kontrol noktası hücrenin mitoz metafaz evresinde kalmasını sağlamaktadır. Böylece kromozom sayısı eksik/fazla olan anormal genoma sahip yavru hücrelerin oluşması önlenmektedir (Massague, 2004). Onkogenler, tümör baskılayıcı genler, siklin- siklin bağımlı kinazlar ve Aurora kinazlar tarafından düzenlenmektedir. Hücre döngüsünde onkogen (Her 2, ras vb) grubu, kanser gelişimini doğrudan ve dolaylı olarak etkileyen gen grubudur. Tümör baskılayıcı genler ise kanser gelişimini baskılar. p53 geni işlevini kaybederse hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve DNA tamiri olmadan hücre döngüsü kontrolsüz devam eder. Normal hücrelerde DNA hasarı olduğunda, genomik kararlılığı sağlar ve hücre döngüsünü G_1 'de durdurur ve hücreye tamir için zaman kazandırır, hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptozise yönlendirilmektedir (Cabadak, 2008). Hücre döngüsünde siklin (cyc), siklin bağımlı kinazlar (Cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) de rol almaktadır. Bu proteinlerin düzeyleri hücre döngüsünün farklı evrelerinde değişkenlik gösterir. Siklin bağımlı kinazlar G_1 , S, G_2 ve mitozla geçisi kontrol eder. Memeli hücrelerinde hücre döngüsünün düzenlenmesinde fonksiyonları en iyi bilinen on bir tane siklin bağımlı kinaz (cdk 1-11) ve siklinD (D_1 , - D_2 ve - D_3); siklin E (E_1 , E_2), siklinA (A_1 , A_2) ve siklinB (B_1 , B_2) rol oynamaktadır. Siklin bağımlı kinazlar protein fosforilasyonu yapan enzimlerdir. Siklin bağımlı kinaz aktivitesi DNA sarmalının açılması içinde gereklidir. Replikasyon öncesi kompleksin (PRC: Prereplicative complex) birkaç bileşeni fosforillenmektedir. Yeni replikasyon orijinleri mitozun sonunda Cdk aktivitesi düşene kadar yeni PRC kompleksini oluşturamaz. Bundan dolayı her hücre siklusunda DNA bir kez replike olur. (Aslan vd., 2022). Aurora Kinazlar ise hücre yaşam döngüsünün mitoz bölünme evresinde rol almaktadırlar.



Şekil 2.2. Ökaryot hücre döngüsünün evreleri (Meulenbeld vd., 2012)

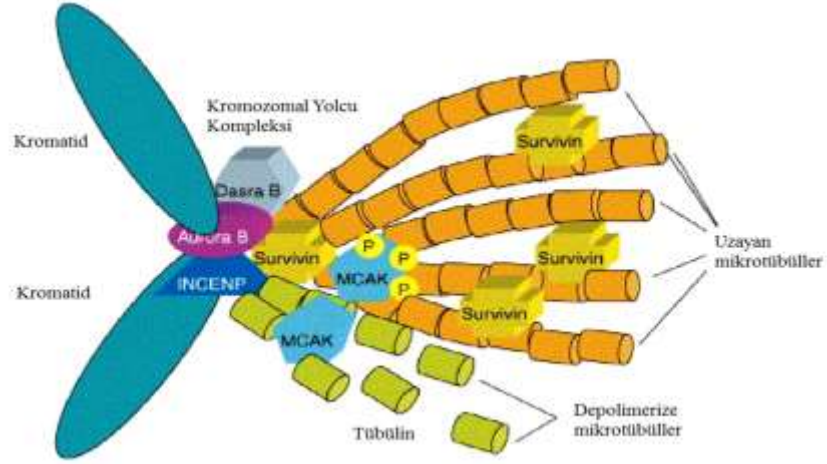
2.5.2. Aurora Kinazlar

Aurora kinazlar, hücre döngüsü düzenleyicileri olarak görev alan önemli protein kinazlar grubuna aittir. Mitoz bölünme sırasında DNA eşlenmesi ile iki katına çıkan kardeş kromatidlerin oluşacak yavru hücrelere tam olarak paylaşılması sağlanmalıdır. Mitoz bölünmede oluşan iğ iplikleri DNA parçalarının kromozom şeklinde paketlenmesi sonrasında kromozomların hücre ekvator düzleminde doğru bir şekilde sıralanması ve kardeş kromatidlerin doğru bir şekilde yavru hücrelere geçişinin sağlanmasında görev yapmaktadır (Hochegger vd., 2013). Aurora kinaz grubu moleküllerin mitoz hücre bölünmesinde mitotik iğ ipliklerinin bölünme sırasında görevlerinin düzenlenmesinde önemli rolleri tespit edilmiştir (Vader & Lens, 2008). Aurora kinazlar ilk kez Glover ve ark. tarafından 1995'te *Drosophila sp.* türü üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda tanımlanmıştır (Glover vd., 1995). Aurora kinaz grubu proteinlerin hücredeki fonksiyon kayıplarının hücre bölünmesinde iğ ipliği oluşumunda eksikliğe neden olduğu gösterilmiştir. Aurora kinazların memelilerde Aurora kinaz A, B ve C olmak üzere üç tipi tanımlanmıştır (Mutluay&Kozacı, 2021). Bu üç çeşit Aurora kinazın benzerliklerine rağmen Şekil 2.3'de gösterildiği gibi DNA üzerinde ayrı lokalizasyonda bulunurlar. Aurora kinaz A, B ve C hücre işleyişinde farklı fonksiyonlara sahiptirler.



Şekil 2.3. Aurora kinaz proteinlerinin şematik gösterimi. D-Box, imha kutusu; DAD, D kutusu Aktivasyon domain; KEN motifi, amino asidik K-E-N, Cdh1-anafaz teşvik kompleksi için hedefleme sinyali olarak hizmet eder (Baldini vd., 2014).

Hücre yaşam döngüsünün S evresinde sentrozomun eşlenmesinden sonra Aurora kinaz A sentrozomlarda birikmeye başlar. Sentrozom olgunlaşmasının gerçekleştiği geç G2 evesinde Aurora kinaz A'nın hücre mitoz bölünmesinde çekirdek zarı eridikten sonra sentrozomların ayrılmasında aktif rol aldığı tespit edilmiştir (Barr & Gergeley, 2007). Aurora kinaz A'nın mutasyona uğraması ya da az ifade edilmesi anormal yapıda, monopolar iğ iplikleri oluşumuna neden olmaktadır (Glover vd., 1995). Mitoz bölünmenin sonunda Aurora kinaz A, Anaphase Promoting Complex (APC)-ubiquitin-proteozom yolağında yıkılır Aurora Kinaz B, H3 histon proteini fosforillenmesi, mitoz bölünmede kromozomların ayrılması ve sitokinez için gerekli olan bir kromozom yolcu proteindir. Kromozom ayrılmasında meydana gelebilecek hatalar sayısal ve yapısal kromozom anormalliklerine neden olarak kanserli hücrelerin gelişimine neden olabilmektedir (Marumoto vd., 2003). Kromozom yapısında sentromer bölgesinde yer alan kinetokorlar kromozomun iğ ipliklerinin mikrotübüllerine bağlanmasını sağlayan multiprotein moleküllerdir. Hücre bölünmesinde çekirdek zarı eridiğinde prometafaz evresinde kromozomlar, iğ ipliklerine tutunurlar. Bu bağlantı sayesinde kromozomlar hücrenin ekvator bölgesinde metafaz plağı bölgesinde konumlanmaktadır. Yavru hücrelere geçirilecek olan genom kararlılığının sağlanmasında önemli rol alan kromozomal yolcu kompleksi Şekil 2.4'de gösterildiği gibi Aurora Kinaz B, Inner Centromere Protein (INCENP), Survivin ve Borealin moleküllerinden oluşmaktadır. Siklin B-Cdk1 kompleksinin aktive olması ile mitoz bölünme başladığında, Aurora kinaz B molekülü kromozom yolcu kompleksinin enzimatik yüzeyi olarak aktifleşir (Van Der Wall vd., 2012). Aurora Kinaz B'nin ekspresyonu hücre bölünmesinin G2-M geçişinde maksimum seviyeye çıkar ve mitoz bölünme süresinde maksimum seviyede kalır (Bischoff vd.,1998).



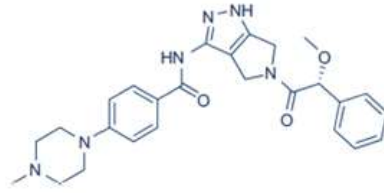
Şekil 2.4. Kromozomal passenger kompleksi, MCAK'ın Aurora B fosforilasyonu, mikrotübül dengesizleştirici aktivitesini önler ve iğ iplikleri oluşumunu destekler (Hoang, 2008).

Aurora Kinaz B kinetokor-mikrotübül etkileşimlerinin kararlılığını sağlar. İç sentromere bağlı Aurora Kinaz B aktif durumda iken mikrotübüllerin kinetokordan ayrılmasına neden olmaz. Buna karşın yeterli gerilim olmadığında kinetokor substratları Aurora Kinaz B'ye yeterince yaklaştığında fosforile edilir ve böylece mikrotübüllere olan ilgisi azaltılır böylece kinetokor-mikrotübül bağlantısının kararlılığı kaybolmaktadır (Liu vd., 2019; Mattei vd, 2020). Aurora Kinaz B yanlış mikrotübül-kinetokor bağlantıları üzerine yıkıcı etkisini Mitotic Centromere Associated Kinesin (MCAK) ağı üzerinden gösterir (Hochegger vd., 2013; Bildik, 2018). Aurora kinaz B, INCENP ve Survivin, tüm kromozomlarda uygun kromozom iğ ipliği bağlantılarını gerçekleştirene kadar mitozun ilerlemesine engel olan 'iğ düzeneği kontrol noktası'nı denetler (Carmena vd., 2009). Aynı zamanda kinetokor-kromatin oluşumunda mikrotübül organizasyonunun gerçekleşmesi için γ -tubulin proteini yoğunlaşması için Aurora kinaz A gereklidir. Aurora kinaz A geninin baskılandığı hücrelerde hücre bölünmesi sırasında iğ ipliklerinin morfolojilerinin bozulması sonucunda mitoz bölünmenin ilerleyişinde duraksama tespit edilmiştir (Katayama vd., 2008). Hücrenin mitoz bölünmesinin anafaz evresinde kromatidlerin farklı kutuplara çekilmesi sonrasında kromatidler ayrıldıktan sonra Aurora kinaz B, antiparalel mikrotübül iğ iplikleri tetramerik protein kompleksinin bir araya gelmesini sağlayarak sitokinez bölünmesinde görev alır (Law, vd., 2017).

2.6. Pan-Aurora Kinaz İnhibitörü Danusertib

Danusertib, tümör hücrelerinin gelişimini durduran (antineoplastic) potansiyele sahip küçük moleküllü bir 3-aminopirazol türevidir. Pan-Aurora Kinaz İnhibitörü Danusertib tüm Aurora kinazlara etki etmektedir bu nedenle farklı hücre sinyal yolları üzerinden hücrenin işleyişini etkilemektedir. Danusertib güçlü antikanser etkiye sahip olan üçüncü nesil bir Bcr-Abl tirozin kinaz inhibitörüdür. Danusertib, Aurora kinazların aşırı eksprese edildiği tümör hücrelerinde hücre büyümesinin durmasına neden olabilecek Aurora kinazlara bağlanmakta ve bunları inhibe etmektedir. Pan-Aurora Kinaz

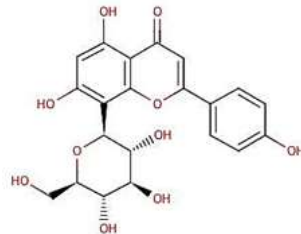
İnhibitörü olan Danusertib Aurora-A, -B, -C'ye etki etsede tercihen Aurora-B kinaza bağlanır ve onu inhibe eder. Aurora kinazlar, serin-threonin kinaz ailesindedir ve hücrel bölünmede önemli düzenleyici moleküller olarak görev almaktadırlar. Danusertib, pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunda artış meydana getirmekte fakat anti-apoptotik proteinlerde ise azalma ile birlikte mitokondri aracılı apoptozise neden olmaktadır (Yuan vd., 2015). Moleküler formülü $C_{26}H_{30}N_6O_3$ 'dür (Carpinelli vd., 2007). Kimyasal adı N-[5-(2-metoksi-2-fenil-asetil)-1,4,5,6-tetrahidro-pirrol[3,4-c]pirazol-3yl]-4-(4-metil-piperazin-1-yl) benzamiddir. Danusertib, düşük nano molar ve orta mikro molar derişimlerde etkili olan bir ilaçtır (Colotta & Mantovani, 2008). Danusertib (PHA-739358, NCT00335868) moleküler ağırlığı 474.6 olan Danusertibin molekül yapısı Şekil 2.5'de verilmiştir.



Şekil 2.5. Danusertibin molekül yapısı (Yuan, 2010).

2.7. Apijenin 8-C Glukozid (Viteksin)

Apijenin 8-C Glukozid (8-β-D-Glucopyranosyl-apigenin (Viteksin), apigenin flavon glikozitidir. Bazı şifalı bitkilerde doğal olarak bulunan bir flavonoid ve lignin bileşiği olan Viteksin pek çok geleneksel Çin ilacının aktif bileşeni olarak kullanılmaktadır. Viteksin'in anti-oksidatif, anti-kanser, anti-inflamatuar ve anti-tümör özellikleri olduğu belirtilmektedir (Öztürk, 2017; Zhang vd,2018; Bhardwaj vd, 2018; Liu vd.,2019). Vitex agnus-castus, Arum dioscoridis vb. pek çok bitki türlerinde yaprak ve meyve özütlerinden alınan örnekler ile yapılan çalışmalarda, Viteksin'in bu bitkilerdeki antioksidan maddelerden olduğu ve bazı bitki türlerinde önemli miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Gökbulut, 2010; Öztürk, 2017). Viteksinin moleküler ağırlığı 432.38'dir (Aslam vd.,2015). Molekül formülü $C_{21}H_{20}O_{10}$ şeklindedir ve molekül yapısı Şekil 2.6'da verilmiştir. Normal koşullarda oda sıcaklığında muhafaza edilir.



Şekil 2.6. Apijenin 8-C Glukozid (Viteksin)'in molekül yapısı (Gupta & Gupta 2016).

2.8. Apoptoz

Apoptoz, metabolik ve genetik açıdan kodlanmış hücrenin evrimsel olarak tercih ettiği hücre ölüm yolağıdır (Çelepli vd., 2020; Dağdeviren, 2021). Yunancada apo (=ayrı) ve ptosis (=düşen) kelimelerinin birlikte kullanılması ile sonbahardaki yaprak dökümü anlamında kullanılan hücre ölümü şeklinde tanımlanmaktadır. Bütün canlıların yaşam döngüsünde olduğu gibi hücre yaşam döngüsünde de hücre doğar, belirli bir süre yaşar ve sonra da ölür. Apoptoz ile hücre ölümü; yetişkinlerin dokularında ve embriyolojik gelişimde çok önemli rol oynar. Apoptoz, dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur, organizma için tehlike teşkil eden virüs vb. etkenlerle enfekte olmuş hücrelerin yok edilmesini sağlayarak savunma da oluşturur. DNA'da hasar meydana gelmesi durumunda, bu hasarın meydana geldiği hücre apoptoz mekanizması ile yok edilir. Böylece DNA yapısında zararlı mutasyona uğramış hücrelerin vücutta kanserleşme potansiyelini ortadan kaldırır (Kerr vd., 1972). Apoptozu uğrayan hücreler organizmanın birçok doku ve hücre gruplarında sürekli görülmektedir ve bu şekilde hücre yok edilme durumu ömür boyu devam etmektedir. Bu şekildeki hücre ölümü ve hücre yapımı dokuda dinamik yapıyı koruyabilmek için düzenli olarak gerçekleşmektedir. Böylece hücre ölümü (apoptoz) ve hücre yapımı (mitoz) dokularda homeostatik dengeyi korumak için dinamik bir denge halinde sürer. Bu hücre oluşumu ve hücre yok edilmesi arasındaki dengenin apoptoz lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın da ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Gerçekleşmemesi gereken bir durumda apoptoz gerçekleşir veya gerçekleşmesi gerekli olan bir durumda da apoptoz olmaz ise bu durum canlının metabolizmasında oldukça büyük sorunlar yaratabilir. Apoptozun metabolizmada normalden daha fazla hızda gerçekleşmesi AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı diyabet, hepatitC enfeksiyonu, miyokarda enfarktüsü, ateroskleroz vb durumlara neden olmaktadır. Apoptozun metabolizmada normalden daha düşük hızda gerçekleşmesi ise otoimmün hastalıklara ve kansere neden olmaktadır. Apoptozu neden olan faktörler Büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, kansere neden olan antineoplastik ilaçlar, radyasyon, yüksek dozda glukokortikoid düzeyi, hücre ölüm reseptörü membran proteini Fas, Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1 (TNFR-1) aktivasyonu, sitotoksik T lenfosit hücreleri, çok şiddetli olmayan oksidatif stresdir (Dağdeviren, 2021; Gökbayrak vd., 2021).

Nekroz; rastgele gelişen ve genler tarafından kontrol edilmeyen düzensiz bir süreçtir. Nekroza neden olan durumlar hipoksi, iskemi, hipertermi, yüksek konsantrasyonlu toksik maddeler, litik viral enfeksiyonlar, şiddetli oksidatif stresdir. Nekrozun en yaygın nedeni hipoksidir. Apoptoz hem sağlıklı hem hastalıkta görülen programlı bir hücre ölüm yolu olmasına karşın, fizyolojik bir hücre ölüm şekli olmayan nekroz ile çok karıştırılmaktadır. Apoptoz ile nekroz farkları; Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücreler tam tersine küçülür. Nekrozda kromatin görünümü hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatin ipliği çekirdek membranının etrafında toplanır ve yoğunlaşarak kondanse olmuş bir bölge oluşumuna neden olur. Nekrozda DNA parçalanması rastgele meydana gelirken, apoptozda DNA internükleozomal alanlarda

180 kb çiftinin katları olacak şekilde mono ve oligonükleozomlara parçalanır. Nekrozda DNA parçalanması post-litik dönemde gözlenir, apoptozda DNA parçalanması pre-litik dönemde gözlenir (Çelepli vd, 2020). Nekrotik hücrede hücre zarı bütünlüğünü kaybederken ve sitoplazmadan hücre içi materyallerinin hücre dışına çıkışı meydana gelmektedir. Oysa, apoptotik hücre, membranı bozulmamış yani intakt bütünlüğünü korur. Nekrotik hücrelerde büyük vakuoller oluşur, sonrasında hücre lizise uğrar fakat apoptotik süreçteki hücreler apoptotik cisimcikler denilen küçük cisimciklere parçalanır. Nekrozda plazma membranının bütünlüğünün bozularak zarar görmesinden dolayı hücre içeriğinin hücre dışı ortama çıkması sonucu inflamasyon süreci başlar. Apoptozda ise apoptotik hücre veya apoptotik cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan makrofajlar tarafından fagositoz ile yok edildiklerinden inflamasyon meydana gelmez. Hücre zarında bulunan Fosfatidilserin plazma membranının iç yüzünden dış yüzüne doğru geçerek konum değiştirir ve böylece makrofajlar zar yüzeyi değişen bu hücreleri tanır ve yok eder. Biyokimyasal olarak nekrozun olması için adenosin trifosfat (ATP) gerekmez iken, apoptozda ATP gerekir (Çelepli vd, 2020). Nekrozda hücrelerde gruplar halinde ölüm gerçekleşirken, apoptozda hücrelerin tek tek ölümü gerçekleşir. Apoptoz; radyasyon ve sitotoksik ilaçların alımı sonrası gelişen DNA hasarı, yanlış katlanmış proteinlerin birikimi ve apoptozun mitokondriyal yolunu aktive eden viral enfeksiyonlar sırasında görülebilir (Ansari vd., 2018).

Apoptozun regülasyonunda Apoptozise neden olan sinyal yollarında pek çok madde ve molekül rol alır. Bunlardan bazıları iyon (kalsiyum), molekül (seramid), gen (c-myc), protein (p53) yapıdadır. Mitokondri organel olarak apoptoz sinyal yollarında rol almaktadır. Apoptotik süreç boyunca, hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Apoptoz sürecinde belli kilit moleküller görev almaktadır. Bunlar; P53, Bcl-2 ailesi proteinleri, Kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) protein molekülleridir (Yang vd., 2013; Thu vd., 2018). Apoptozun indüklenmesi, hazır olan hücrelerde (primer) başlatılabilir ya da bir uyarıcı sonucu sekonder olarak gelişir. Apoptozu uyarıcı hücre dışı ve hücre içi faktörler tablo halinde Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Apoptozu başlatan uyarıcı faktörler.

Apoptozu Hücre Dışından Uyarıcı Faktörler	Apoptozu Hücre İçinden Uyarıcı Faktörler
TNF (Tümör Nekrozis Faktör)	Büyüme faktörleri
Fas/ FasL	Onkogenler
IGF (İnsülin benzeri Büyüme Faktörü)	Tümör baskılayıcı genler
Glukokortikoidler	
Radyasyon	
Çeşitli İlaçlar	
Bazı antijenik özellik taşıyan maddeler	

Hücre içi ve hücre dışı faktörlerin uyarması sonucunda hücreyi programlanmış hücre ölümü olan apoptoza yönlendiren üç farklı apoptoz süreci vardır. Birincisi Mitokondri yolağı, ikincisi TNF ve Fas ligand (ölüm reseptörleri) yolağı, üçüncüsü AIF (Apoptozu başlatan faktör) yolağıdır (Ross, 2014).

Mitokondri yolağında, apoptozun düzenlenmesinde Bcl-2/Bax gen ailesi rol almaktadır. Bu gen ailesinin 20 üyesi mevcuttur; bunlardan bazıları apoptoz inhibitörü (antiapoptotik) olarak rol almaktadır, bazıları ise apoptozu uyarıcı (preapoptotik) olarak rol almaktadır. Hücrenin yaşama durumu bu gen ailesindeki proapoptotik gen ile antiapoptotik gen ürünlerinin oranına bağlıdır. Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, hem mitokondri zarında hem çekirdek zarında hem de endoplazmik retikulum zarında bulunmaktadır (Elmore, 2007). Apoptozda mitokondri yolağının uyarılmasında DNA hasarı, Oksidanlar, Seramid, Büyüme faktörü eksikliği, Radyasyon, Kemoterapötikler etkilidir. Apoptozu baskılayan antiapoptotik genler Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1; Apoptozu uyarıcı apoptotik genler Bax, Bak, Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa. Proapoptotik Bcl-2 ve anti-apoptotik Bax geni arasındaki oransal denge, hücrenin yaşamı ile ölümü arasındaki durumu belirler. Bcl-2 proteini, mitokondrinin sitoplazmaya bakan dış zarı üzerindedir ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek dış zarı üzerinde bulunmaktadır. Bax proteinleri hücrede sitoplazma bölümünde bulunmaktadır. Apoptotik yolakta oluşan sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının ‘permeabilite geçiş poru’na yönelirler ve bu bölgeye bağlanırlar. Bu bağlanma seçici iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltıcı yönde etkili olur. Zardaki bu değişim nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptozis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan moleküller sitoplazmaya geçerler. Apoptoz mekanizmasının başlamasında tetikleyici bir faktör olan Apaf-1, Bcl-2 ile bağlı olduğu durumda apoptoz baskılanmış durumdadır. Hücre içi faktörlerin uyarımı sonucu, Sitokrom c sitoplazma proteinlerinden olan Apaf-1’e bağlanması prokaspaz-9’u aktive eder, oluşan bu kompleks ‘apoptosom’ olarak adlandırılır (Apaf-1 aynı zamanda ATP’ ye de bağlanır). Prokaspaz-9’ un aktivasyonu ise bir dizi kaspaz aktivasyonunu başlatır (Gökhan vd., 2020)

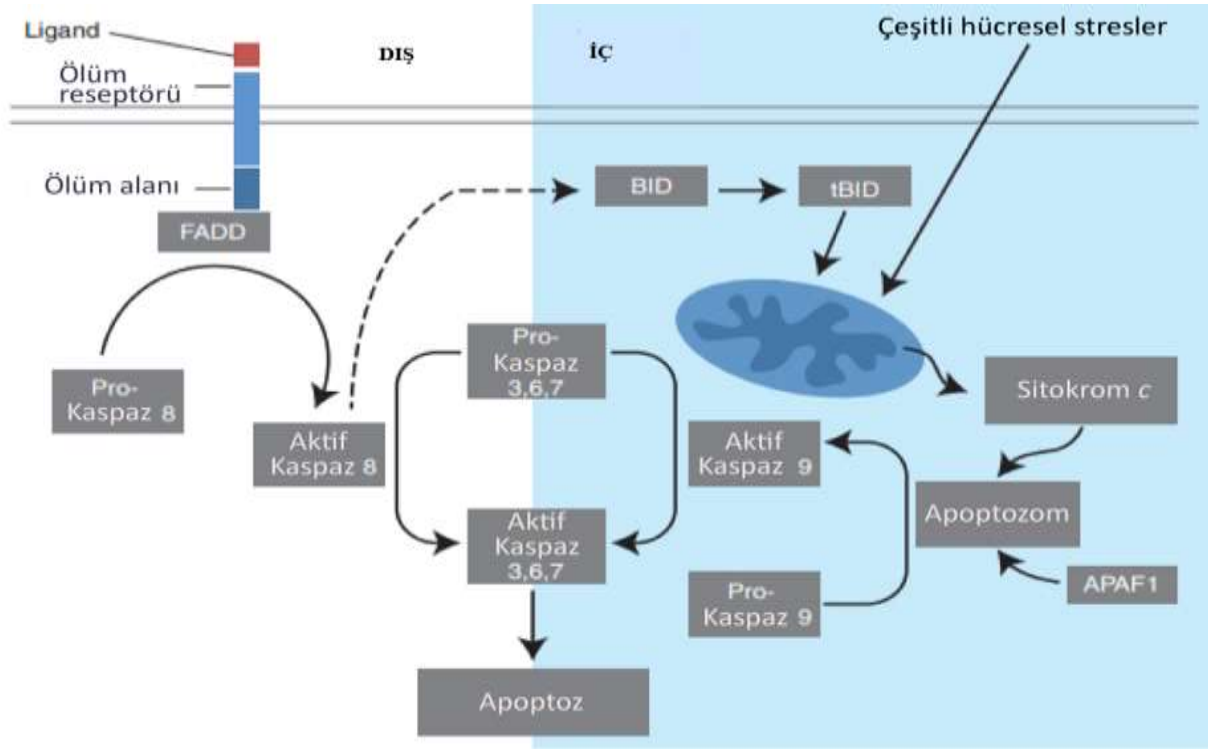
TNF ve Fas ligand (ölüm reseptörleri) yolağı, Fas ve TNF alfa reseptörleri hücrenin zarında yer almaktadırlar ve uygun ligandları ile bağlandıklarında normal şartlarda inaktif durumda bekleyen prokaspaz-8’i aktif hale getirerek kaspazların aktivasyonunu başlatırlar ve hücreyi programlı ölüm yolağına yönlendirirler. Bu yolak sıklıkla immün cevap oluşturma reaksiyonlarında ve infeksiyon durumlarında kullanılan bir yoldur (Gökhan vd., 2020).

Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF) yolağı, aşırı stres şartlarına maruz kalmış hücrelerin kaspaz bağımlı diğer 2 apoptoz yolağından farklı olarak kaspaz yoluna alternatif biçimde kullanıldığı bir apoptoz sürecidir. Normal şartlar altında mitokondri zarları arasındaki bölgede yer alan AIF proteini, hücrenin ölmesi gerektiğini belirten bir sinyal ile sitokrom-c molekülü mitokondriden sitoplazmaya çıkararak çekirdek içine girer ve DNA’ya bağlanır. DNA’ya bağlandığında nükleaz aktivitesine neden olarak DNA’nın fragmanlara parçalanmasını uyarır (Gökhan vd., 2020).

2.9. Kaspazlar

Kaspazlar apoptozda rol alan endoproteaz ailesinden olan bir enzim grubudur. Enzimin aktif yüzünde sistein aminoasidi buldukları için sistein proteaz ailesi grubuna dahil edilirler. Kaspazlar aktif bölgelerinde katalitik sistein rezidülerinin bulunmasının yanı sıra substratlarında aspartik asit rezidüsünün bulunması ile beraber etkinleşerek peptit bağlarını yıkmaktadırlar (McIlwain vd., 2013). Proteinlerin aspartik asit bulunan kısmından kestiklerinden dolayı, c-aspa-ases şeklinde adlandırılmışlardır. Bu enzim grubu ilk olarak sitoplazmada inaktif prokaspaz şeklinde sentezlenmektedirler. Prokaspazın inaktif yapısı apoptozun uyarılmasından sonra durdurularak aktif kaspaz formuna dönüşmektedir. Memelilerde kaspazların bilinen 14 çeşidi bulunmaktadır. Apoptoz mekanizmasını başlatıcı Kaspazlar -2, -8, -9, -10; apoptoz mekanizmasını sonlandırıcı Kaspazlar -3, -6, -7' dir (Bildik, 2018). Hücre içinde veya hücre dışında hücrenin işleyişinde görevleri olan enzimler belli bazı molekül gruplarının etkisiyle aktive olurlar. Kaspazlar substratlarına bağlanarak substratlarını etkinleştirirler de bazı süreçlerde substratların baskılanmasında da rol oynayabilmektedirler. Bunun yanı sıra, kaspaz enzimleri sinyal molekülleri üreterek inflamasyonda ve apoptoz mekanizmasında da rol almaktadırlar (Koçaklı, 2015; Şanlı, 2018). Kaspazlar, inflamasyonda ve apoptozdaki işlevlerine göre çeşitli gruplara ayrılmaktadır. Kaspaz -3, -6, -7, -8 ve -9 apoptoz süreçlerinde görev alırken Kaspaz -1, -4, -5 ve -12 ise inflamasyonda rol almaktadırlar. Apoptoz mekanizmasında görev alan kaspaz enzimleri kendi içlerinde de başlatıcı kaspazlar (Kaspaz -8, -9) normal süreçte etkin olmayan prokaspazlardır. Dimerizasyon süreci sonunda aktifleşirler ve başlatıcı rolleri gereği infazcı kaspazların etkinliğinde görev alırlar ve infazcı kaspazlar (Kaspaz -3, -6, -7) grubu, başlatıcı kaspazlar tarafından prokaspaz monomerlerine dönüştürülmektedirler. İnfazcı kaspazların biri aktifleştiğinde diğer infazcı enzimleri de kesebilir ve aktif hale dönüşmesini sağlayabilir. Bu özellikleri sayesinde infazcı kaspaz enzimleri kendi içlerinde feed-back mekanizması ile süreci kontrol edebilmektedirler (Muzio vd., 1998; Degterev vd., 2003; Martinon vd., 2007; Ceylan, 2020). Apoptoz süreci, başlatıcı kaspazların infazcı kaspazları aktifleştirmesiyle devam eden kaspaz kaskadı yollarının etkili olduğu aşamalı bir süreçtir. İnfazcı kaspazlar aktifleştiğinde hücrede proteinlerin yapısal bütünlüğünü korumada rol oynayan bazı protein gruplarını yıkar. Bu molekül yıkımı ile birlikte hücrede DNA fragmentasyonu, membranın şişmesi gibi apoptotik sürecin morfolojik belirtileri oluşmaya başlamaktadır (Boatright vd., 2003).

Kaspaz enzimleri Şekil 2.7'de görüldüğü gibi iç ve dış apoptoz yollarında etkilidirler. Kaspaz-8 dış apoptoz yolakta, Kaspaz-9 ise iç apoptoz yolağında rol almaktadır. Kaspaz -3, -6 ve -7 ise hem iç hem de dış apoptoz yolağında rol alarak apoptoz yolağının tamamlanmasını sağlamaktadır (Chang vd., 2003 ;McIlwain vd., 2013).



Şekil 2.7. Kaspaz enzimleri iç ve dış apoptoz yollarında etkisi. Kaspaz -8 dış apoptoz yolağında, Kaspaz -9 ise iç apoptoz yolağında görev rol alır. Kaspaz -3, -6 ve -7 ise hem iç hem de dış apoptoz yolağında rol alarak apoptoz yolağının tamamlanmasını sağlar (McIlwain vd., 2013).

2.10. Metastaz

Kanserli bir tümör büyüdükçe, kan dolaşımı veya lenf dolaşımı ile kanserleşmiş hücreler vücudun diğer bölgelerine taşınabilir. Metastaz tümör hücrelerinin kaynaklandıkları primer dokudan ayrılarak farklı bir dokuya göç etmeleri ve bu yeni dokuda sekonder tümör şeklinde büyümeleridir. Bu süreçte kanser hücreleri çoğalarak yeni organ ve dokularda tümör oluşumlarına neden olmaktadır. Kanser hücreleri sıklıkla lenf düğümleri veya kan dolaşımı yoluyla vücudun uzak bölgelerine yayılabilmektedir (Cheng vd., 2018). Kanser hücrelerinde invazyon ve metastazın aktifleşmesinde kanser hücrelerinde hücre-hücre bağlantılarını sağlayan E-Cadherin molekülünün eksikliği etkilidir. E-Cadherin ifadesinin fazla olması hücrelerin bir arada durmasını sağlar ve invazyon ya da metastaz sürecine girmesini engeller. Tümör anjiogenezi hızlı büyüme için gerekli olan besin ve enerjiyi sağlamanın yanı sıra tümör hücresinin dolaşım sistemi ile temasını da arttırmaktadır. Metastaz gelişiminde diğer bir önemli faktör hücreler arası iletişimin kaybolmasıdır. Tümör hücrelerinde hücreler arası adhezyonda etkili olan molekül miktarlarında (kaderinler, integrinler, selektinler) değişiklikler görülmektedir. Adhezyon özelliğini kaybetmiş olan metastatik tipte tümör hücreleri başlıca, vücut boşlukları ve yüzeyleri, lenf damarları ve kan damarları yoluyla yayılırlar. Lenf kanallarına giren tümör hücreleri bölgesel lenf düğümlerine ulaşır ve burada tutunarak bir süre için kanserin yayılmasına engel oluştururlar. Lenf düğümü kanser hücreleri ile dolduğunda veya lenf

düğümüne yerleşen tümör hücreleri burada büyümeye başladıktan bir süre sonra diğer lenf düğümlerine yayılmaktadır (Rizov vd., 2017).

Arter duvarları tümör invazyonuna karşı dirençlidir. Damar geçirgenliğini arttıran bir etmen olarak tanımlanan Vasküler Endotel Büyüme Etmeni (VEGF) endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik işlevini, sitokin sentezi ve salınımını, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ifade edilmesini ve düz kas hücre hiperplazisini düzenler. VEGF postnatal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retinada yeni damarlanma dahil olmak üzere çok sayıdaki patofizyolojik durumda önemlidir (Fernandez, 2002; Telenau vd., 2020). VEGF, birçok kanser türünde, anjiyogeneze rol oynayan en önemli etmenlerden biridir. VEGF mikrovasküler geçirgenliği artırır, endotel hücrelerin göçünü, anjiyogenezi uyarır. Gen ifadesini tekrar programlar ve endotel hücrelerinde apoptozu önler. VEGF Kanser tedavisinde önemli bir hedefdir (Gökhan, 2020). Hipoksi, VEGF mRNA ifade düzeyinde hızlı ve güçlü bir artışı tetikler. Bu durum özellikle, tümörlerin nekrotik alanları etrafında daha belirgin bir şekilde görülmektedir. Hipoksik hücrelerden salgılanan adenosin, adenosin A2 almaçlarına bağlanır ve c-AMP bağımlı protein kinaz (PKA) yolağı üzerinde VEGF'nin ifadesini artırır (Distler vd., 2003).

2.11. MCF-7 Hücre Soyunun Özellikleri

MCF-7 (ATCC no:HTB-22), insan meme kanseri epitel kökenli hücre soyudur, 69 yaşında invaziv duktal karsinomlu bir kadın hastanın metastatik özellikteki meme kanseri pleural efüzyonundan 1970 yılında izole edilmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre dizisinden alınan hücreler, yaygın olarak, kötü huylu (malign) tümörlerin büyümesini incelemek için mükemmel yakın bir model olarak kabul edilir. MCF-7 hücre dizisinden önce hiçbir meme hücresi birkaç aydan daha uzun yaşatılamamıştır. MCF-7, Luminal A meme kanseri hücre hatlarından biridir (Yanagawa vd., 2012). Adherent özellik taşımaktadır ve adenokarsinom hücreleridir. Bu hücre hattının isimlendirilmesi, Michigan Kanser Vakfı tarafından yapılmıştır ve geliştirilen hücrelerin 7. soyu olarak MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) şeklinde adlandırılmıştır. Hücre morfolojisi epitelyal kökenli, insülin benzeri çoğalma faktörü bağlanma proteinleri sentezler, WNT7B onkogeninin ekspresyonu mevcuttur. Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2) geninin ekspresyonu negatif, östrojen reseptör pozitif (ER+) ve progesteron reseptör pozitif (PR+)'tir. Hormon tedavisi için uygundur. MCF-7 hücrelerinin çoğalma mekanizmalarında, aşırı artmış östrojen ekspresyonu ve östrojene bağlı proliferasyon rol almaktadır. MCF-7 hücrelerinde çoğalarak hücre popülasyonunun ikiye katlanma zamanı (Populasyon Doubling Time -PDT) 29 saattir (Bozkurt, 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezinin (MEİTAM)'deki MERKÖK laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi (BAP)'nin TP-3 Doktora Tez Projesi kapsamında, 2019-2-TP3-3609 proje kodu ile desteklenmiştir. Bu projede çalışmasında kullanılan materyal ve yöntemler aşağıda verilmiştir.

3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Class-II tipi Vertical Laminar Air Flow Cabinet, Etüv (5040 BP, Elektro-mag Wise Cuba), Esco Cell Culture İnkübatör (CCL-170b-8) Esco, Singapore), Cedex XS Analyzer, Roche, Basel, İsviçre), BD FACSAria III Cell Sorter (BD Biosciences, USA), Termal Cykler (Bibby Scientific, USA), VIIA 7 Real Time PCR cihazı (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), Hettich Universal Masaüstü Santrifüj, Floresan Mikroskop (Zeiss, Jena, Almanya), NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Apigenin 8-C Glukozid (Viteksin, 10 mg., ChemCruz Biotechnology Inc.), Danusertib (PHA-739358) 10 mg., Mybiosource), RPMI-1640 Medium Biowest, USA), Fetal Bovine Serum (FBS; Biowest, USA), DPBS (Panbiotech, USA), PBS (Gibco, Termofischer Scientific- USA), Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich, USA), Trypsin-EDTA (Phenol Red, Sigma Aldrich, USA), Amphotericin B (Fungizone, Biowest, USA), BD FACS Flow Sheat Fluid (BD Biosciences, USA), Tripkan Blue (BD, USA), Etanol (%99.8'lik Absolute, Sigma Aldrich, USA), DMSO (dimetil sülfoksit).

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Deney Kitleri

Hücre Sayma Kiti 8 (WST-8 / CCK8) (ab228554, abcam, Japan), APC Annexin-V Apoptosis Detection Kit With PI (Cat:640932, Biolegend, USA), High Pure RNA İsolation Kit (Roche, Roche Cat. No: 1828665, Germany), High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), Fast Start Essential DNA Green Master Mix (Roche, Germany) kitleri kullanıldı. ACTB, AURK-B, VEGF, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 gen primer dizileri kullanıldı. Çalışmada

kullanılan ACTB, AURK-B, VEGF, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 gen primer dizileri Tablo 3.1' de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kaspaz -3, -8, -9, ACTB, AURK B, VEGF primer gen dizileri.

ACTB Forward	5' GAG GTG ATA GCA TTG CTT TCG 3'	(21 mer)
ACTB Reverse	5' CAA GTC AGT GTA CAG GTA AGC 3'	(21 mer)
Casp3 Forward	5' TCA TCA CCT GTT CAG ATC CAG AG 3'	(23 mer)
Casp3 Reverse	5' TCA GCC CTC CAT GTT GTG AA 3'	(20 mer)
Casp8 Forward	5' GAA ATA GAA CTA CAA GCG GAT GGT T 3'	(25 mer)
Casp8 Reverse	5' GGA AAA TGA GGG AAG GAC ACA AA 3'	(23 mer)
Casp9 Forward	5' CTT TGC TGC TTG CCT GTT AGT T 3'	(22 mer)
Casp9 Reverse	5' ATC CTG CCT TTC TTT CCA AAC AG 3'	(23 mer)
AURK B Forward	5' CCC ATC TGC ACT TGT CCT CAT 3'	(21 mer)
AURK B Reverse	5' AAC AGA TAA GGG AAC AGT TAG GGA 3'	(24 mer)
VEGF Forward	5' CTA CCT CCA CCA TGC CAA GT 3'	(20 mer)
VEGF Reverse	5' GCA GTA GCT GCG CTG ATA GA 3'	(20 mer)

3.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada MCF-7 (ATCC no: HTB-22) meme kanseri hücresi kullanılmıştır. MCF-7 hücresi Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

3.2.1. Besiyeri Hazırlanması

Hücre kültürleri için kullanılan mediumlar hücrelerin gelişimlerini desteklemek amacı ile laboratuvar ortamında hazırlanmış besleyici ortamlardır. Medium (besiyeri) hazırlanırken kullanılan üç önemli bileşen vardır. Bu üç temel bileşen Bazal medium, Fetal Bovine Serum (FBS) ve Penisilin-Streptomisin antibiyotikleridir. (Duruel vd., 2021). Hücrelerin kültüre alınması sırasında RPMI-1640 medium (2,5 mM L-Glutamin+) kullanıldı. Bazal mediumun içine inaktive edilmiş %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 Penisilin-Streptomisin, %1 Amphoteresin ilave edildi komplet medium hazırlandı. Hazırlanan komplet medium +4°C' de muhafaza edilerek hücrelerin kültüre alındığı sürede kullanıldı (Lueangamonara, 2017; Liu vd.,2019).

3.2.2. Hücre Çözme

Dondurulmuş hücreleri çözme işlemi aşağıda verilen işlem sırasına uygun olarak yapıldı. -80 °C'den kriyoviyal alındı donmuş hücreler 37°C'lik sıcaklıktaki su banyosunda hızlı bir şekilde eritildi.

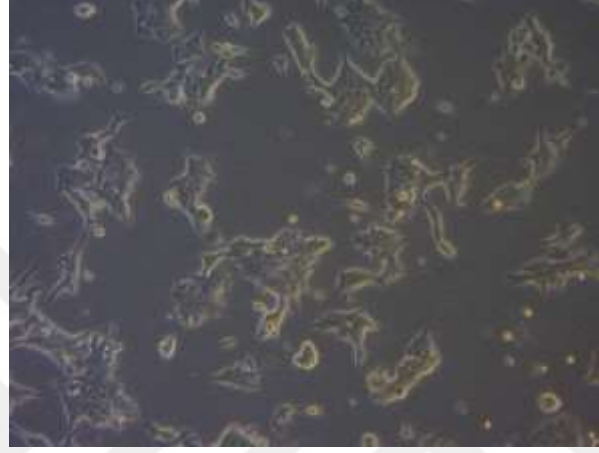
Çözülen kriyoviyal %70'lik alkol ile silinerek steril laminar kabine alındı. Steril koşullarda laminar kabinde kriyoviyal açıldı. Kriyoviyalin içindeki hücre süspansiyonu 6 mL (veya hücre süspansiyonu ile eşit miktarda) medium içeren falkon tüpe yavaşça aktararak yıkandı. Hücreler DMSO içerisinde oldukları için manupilyasyonlar nazikçe dikkatli bir şekilde yapıldı. Aynı zamanda işlemler hızlı yapıldı DMSO'nun hücelere zarar vermesi engellendi. Hücrelerin yıkanması tamamlandıktan sonra falkon tüp santrifüj cihazında 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstte biriken süpernatant kısmı atıldı ve falkon tüpün dibinde kalan pelete 1mL komplet medium uygulandı. Hücreler 1mL mediumda iyice çözdürüldükten sonra üzerlerine 4 mL medium eklendi, 5 mL'lik hücre süspansiyonu T25 (25 cm²) flaska serolojik pipetle aktarıldı, hücre ekilen flask 24 saat boyunca 37°C de ve %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyon işlemine bırakıldı, 24 saat sonra ertesi gün (2. gün) hücre kültürünün mediumu değiştirildi. Hücre kültür kabı her gün inverted mikroskop ile kontrol edilerek konfluent oldukları güne kadar mediumları 2-3 günde bir değiştirilerek inkübasyona devam edildi. T25'lik flaskın tabanındaki hücreler konfluent duruma gelince tripsinlenerek pasajlanma aşamasına geçildi.

3.2.3. Hücre Pasajlama

Hücre kültürü çalışmalarında hücreler çoğalarak plato fazına ulaştıklarında büyüme mediumunun yetersizliği ve hücrelerin yüzeye yapışması için yeterli alanın olmaması ölüm fazının başlamasına neden olmaktadır. Bu nedenle hücreler büyümenin ve bölünmenin maksimum düzeyde olduğu geç logaritmik fazda pasajlanmalıdır. Yüzeye yapışan hücrelerin kapladıkları alanın yüzde cinsinden ifade edilmesi olarak da bilinen konfluens durumuna yaklaşık olarak %80-90 düzeyinde ulaştıktan sonra hücreler pasajlandı. Hücrelerin pasajlanması yani yeni flaslara ekim yöntemi olarak aşağıda verilen işlem sırası kullanıldı.

Hücre flaslara inkübatörden (etüv) alındı ve konfluens olanları belirlemek için inverted mikroskopta görünimleri kontrol edildi. Konfluent olmuş flaslara tespit edildikten sonra flaslara dış yüzü alkollenerek steril hücre laminar kültür kabini içine alındı ve kültür kabindeki medium aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücreleri serumdan arındırmak için kültür kabına 1 mL'lik DPBS ile yıkama yapıldı ve DPBS de aspire edilerek uzaklaştırıldı. Tripsinizasyon için (tripsin bir proteaz enzimidir ve medium içerisinde bulunan FBS tripsin inhibitörlerini barındırmaktadır). Tripsinizasyon basamağından önce ortam Ca ve Mg içermeyen PBS ile yıkandı. Sonra üzerine 1.5 mL tripsin ilave edildi, 4-5 dakika etüvde bekletildi. Bu işlem hızlı yapılmalıdır aksi halde tripsin hücelere zarar verebilir. Etüvden alınan flask, inverted mikroskopta hücrelerin görünümü için kontrol edildi ve hücrelerin büyük bölümü yüzeyden kalkmış ise tripsinin etkisini durdurmak için 1 mL RPMI-1640 medium pipetle flaska eklendi, pipetle flastaki hücre süspansiyonu falkon tüpe (santrifüj) tüpüne alındı. Santrifüj tüpündeki hücre çözeltisini 8 mL'ye tamamlamak için 5 mL medium eklendi. Tüp santrifüj cihazına yerleştirildi ve 1200-1300 rpm de 5 dakika santrifüj edildi, sonra tüp santrifüjden alındı ve üzerindeki süpernatant kısmı atık kutusuna atıldı. Tüpün dibinde çökmüş hücrelerin

bulunduğu çökeltiyi (pelet) yerinden kaldırmak için parmakla nazikçe birkaç kez tüpe vuruldu. Santrifüj tüpündeki hücreleri resüspanse etmek için 1 mL medium eklendi, pipetaj yöntemi ile hücreler eşit biçimde flasklara bölünecek şekilde aktarıldı. Hücre bulunan flasklara 3.5 mL komplet medium eklendi. Pasajlanan hücrelerin flaskları yatay şekilde 37°C’de, %5 CO₂’li etüvde inkübe edildi. Önceki pasajın flaskları geri kalan hücreleri beslemek için 4 mL RPMI-1640 medium eklendi ve flask yatay şekilde 37°C’de, %5 CO₂’li etüvde inkübe edildi (Freshney, 2000). Pasajlanan MCF-7 hücre morfolojisi şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. MCF-7 hücre morfolojisi.

3.2.4. Hücre Sayma

Hücre sayımı hücre kültürü çalışmalarında en önemli işlemlerden biridir. Hücreler her deney aşamasında ve hücrelerin dondurulma prosedürü öncesinde sayılmaktadır. Bu sayma işlemi, Thoma lamında sayım yöntemi kullanılarak veya Cedex XS cihazında Cedex smart slide kullanılarak yapılmıştır.

Thoma lamı ile hücre sayımında büyüme mediumu ile homojen olarak çözünen hücrelerden sayım için 100 µL alındı ependorf tüpe konuldu ve üzerine 100 µL tripan blue eklendi pipetaj yapılarak karışması sağlandı. Çalışmalarda gereksinim duyulan kadar hücrenin işleme alınabilmesinde sayım yaparken kullanılan tripan blue ile boyamada boya canlı hücreler içine giremezken ölü hücreler içine boya girmektedir ve hücreler koyu mavi renge boyandı. Böylece tripan blue ile canlı ve ölü hücrelerin analizinin yapılmasına olanak sağlandı. Thoma lamı üzerinde çukur iki bölmeye lamel yerleştirildikten sonra ependorftan (mikrosantrifüj tüpü) çekilen sıvı lam üzerine yavaşça ve dikkatli bir şekilde aktarıldı. Thoma lamı inverted mikroskoba yerleştirildi ve hücrelerin sayımı yapıldı. Sayım işlemi yapılırken 4 büyük köşe kareler ve 1 tane büyük merkez karede (toplam 5 karede) sayım yapıldı. İlk kareden başlayarak hücreler sayıldı. En büyük karelerin üst ve sol kenar çizgilerine denk gelen hücreler sayıma dahil edilmedi bunun dışında kalan hücreler sayıma dahil edilerek tüm hücreler sayıldı.

Cedex XS cihazında hücre sayımı 10 µL hücre solusyonu ve 10 µL tripan blue endof tûpünde karıştırıldı ve nazıkçe pipetaj yapıldıktan 10 µL alındı smart slide bölmesine yerleştirilerek Cedex XS cihazında hücre sayımı yapıldı.

3.2.5. Hücre Dondurma

Hücrelerin beslendiği medium ortamı pastör pipeti ile uzaklaştırıldı. Hücreleri serumdan arındırmak için PBS ile yıkandı ve PBS pastör pipeti ile uzaklaştırıldı. Flastaki hücrelerin ortamına 1.5 mL tripsin ilave edilerek 5 dakika etüvde inkübe edildi. Bekleme süresinin sonunda etüvden flask alınır ve eklenmiş olan tripsinin iki katı kadar komplet medium eklenerek tripsinin hücreler üzerindeki etkisi inhibe edildi. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirildi ve bir falkon tüpe transfer edildi. Falkon tûp alınan hücrelerin üzerine 2-3 mL daha medium eklendi. Hücre süspansiyonu 1500 g' de 5 dakika santrifüj cihazında santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra hücreler falkon tûpte dibe çöktü ve üstte biriken süpernatant sıvısı uzaklaştırıldı. Falkon tûbün dibinde kalan pellet 1 mL besiyeri ile sulandırılarak Thoma lamı sayım yöntemi ile sayıldı. Sayım işleminden sonra dondurma için kullanılan kriyoviyal tüpleri içerisine 1:1 oranında dondurma mediumu ve hücre çözeltisi konuldu. Dondurma mediumunda DMSO (dimetil sülfoksit) kullanıldı, DMSO hücrelerin donarak patlamasını önlemektedir bu nedenle hücre dondurmada kullanımı tercih edildi. Kriyoviyal tüpleri aşamalı olacak şekilde soğutuldu önce 1-2 saat +4°C'de bekletildi sonra -20°C de 1 gün bekletildi ve sonraki gün -80°C'deki derin dondurucuya konuldu. Derin dondurucuda 24 saat kalma süresinden sonra kriyoviyal tüpleri sıvı nitrojen tankına konuldu.

3.3. Danusertib ve Viteksin Stok Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Viteksinin ve Danusertibin 10 mM stok solüsyonları DMSO ile hazırlandı ve hazırlanmış solüsyonlar -20°C'de saklandı. DMSO'nun kültürdeki son konsantrasyonu %0.1 oranını aşmamıştır (Nguyen vd., 2020). Viteksin ve Danusertib deneyde kullanımlarından hemen önce medium içerisinde seyreltilerek kullanıldılar. Danusertibin (5 µM, 10 µM, 40 µM, 80 µM, 100 µM) farklı 5 dozu hazırlandı ve kullanıldı (Li vd., 2015). Viteksin (10 µM, 20 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM) farklı 5 dozu hazırlandı (Gökbulut, 2015).

3.4. MCF-7 Hücrelerinde Danusertib'in ve Viteksin'in IC₅₀ Sitotoksik Doz Değerinin WST-8 Test Kiti ile Belirlenmesi

Danusertib ve Viteksin'in MCF-7 hücresi üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için hücre sayma kiti 8 (WST-8 / CCK8) (ab228554, abcam) test kiti kullanıldı. WST-8 testi suda çözünen

formazan8 boyalarını içerir. Oluşan formazanlar farklı absorpsiyon yapma kabiliyetindedir, spektrofotometrik okuma yapmaya imkân verir.

T25'lik flasklarda kültüre edilmiş hücrelerin mediumu aspire edildikten sonra hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak için 1,5 mL Tripsin/EDTA eklendi ve 4-5 dakika inkübatörde bekledikten sonra, hücreler kaldırıldı, flasklardaki hücreler üzerine tripsinin etkisini kırmak için tripsinin iki katı kadar medium eklenerek santrifüj tüpüne alındı. Santrifüj cihazında 1600 rpm'de 3-5 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki süpernant kısmı atıldı. Hücreler tekrar medium ile çözdürüldü ve hücre sayımı yapıldı. 96 well plate her bir kuyucuğuna 30000- 40000 kadar hücre olacak şekilde hücrelerin ekimi yapıldı. Hücrelerin 96 well plate kuyucuk tabanlarına yapışmaları için 96 well plate 24 saat 37°C de, %5 CO₂'li inkübatör ortamında inkübasyonda bekletildi. İnkübatörde bekletilen hücreler bir gün sonra inkübatörden alınarak well plate kuyucuklarındaki medium aspire edilerek alındı. Sonraki aşamada Danusertib'in (5 µM, 10 µM, 40 µM, 80 µM, 100 µM) ve Viteksin'nin (10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM, 100 µM) belirlenen ön dozları 24., 48. ve 72. saatlere kadar inkübe edilmek üzere MCF-7 hücresi üzerine 100 µL medium çözeltisi şeklinde her well plate kuyucuğuna eklendi. Her well plate için inkübasyon süreleri sonunda well plate kuyucuklarında hücrelerin üzerindeki medium uzaklaştırıldı ve well plate kuyucuklarına 10 µL WST8 olacak şekilde 100 µL free mediumda hazırlanmış hücre proliferasyon WST-8 kiti her kuyucuğa 110 µL olacak şekilde eklendi. ELİSA mikrolate Reader'da spektrofotometrik okuma yapmadan önce well plate kuyucuklarına 110 µL mediumlu WST-8 karışımı (24. saat için 20. saat de, 48. saat için 44. saat de ve 72. saat içinde 68. saat de) eklendikten sonra 96 well plateleri 3-4 saat süre ile ışıktan koruyarak 37°C'de CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı, 3-4 saat inkübasyondan sonra well platelerin 24., 48., 72. saatleri tamamlanınca Elisa readerda okundu. Elisa readerda okumadan önce karıştırıcı (shaker) ile renk yoğunluğunda homojenizasyon sağlamak amacı ile bir dakika orta hızda karıştırıldı. Well plateler absorbans değeri 460 (OD) nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu kullanılarak okundu.

Yüzde sitotoksik aktiviteyi belirlemek için aşağıda verilen formül kullanıldı.

$$\text{Formül} = (1 - \text{well absorbans/kontrol absorbans}) \times 100$$

Yüzde canlılık oranı belirlemek için de aşağıda verilen formül kullanıldı.

$$\text{Formül} = [(A \text{ sample} - A \text{ blank}) / (A \text{ control} - A \text{ blank})] \times 100$$

MCF-7 hücreleri için Danusertib ve Viteksin sitotoksik IC₅₀ değeri belirlemek için 96 well plate kuyucuk planı aşağıda verildiği düzende 24., 48. ve 72. saatiçin ayrı well plate kullanılarak her seçilen dozun 8'li tekrarı olacak şekilde deney planı hazırlandı. Deney grupları ve 96 well plate düzeni Tablo 3.2'de verildiği gibidir.

Tablo 3.2. Danusertib ve Viteksin'in sitotoksik (IC_{50}) doz değeri belirleme deney grupları.

GRUPLAR	GRUPLARIN İÇERİKLERİ	
Blank	100 μ L komplet medium, MCF-7 hücresi yok, WST8 Kiti	n=8
%0,1 DMSO Çözücü	100 μ L %0,01 DMSO'lu medium, MCF-7 hücresi, ilaç/madde yok, WST8 Kiti	tekrar
Kontrol grubu	100 μ L medium, MC7 hücresi, ilaç/ madde yok, WST8 Kiti	n=8 tekrar
1.doz grubu	5 farklı dozda Danusertib uygulanan 5 grup	
2.doz grubu		
3.doz grubu		
4.doz grubu		
5.doz grubu		
1.doz grubu	5 farklı dozda Viteksin uygulanan 5 grup	
2.doz grubu		
3.doz grubu		
4.doz grubu		
5.doz grubu		

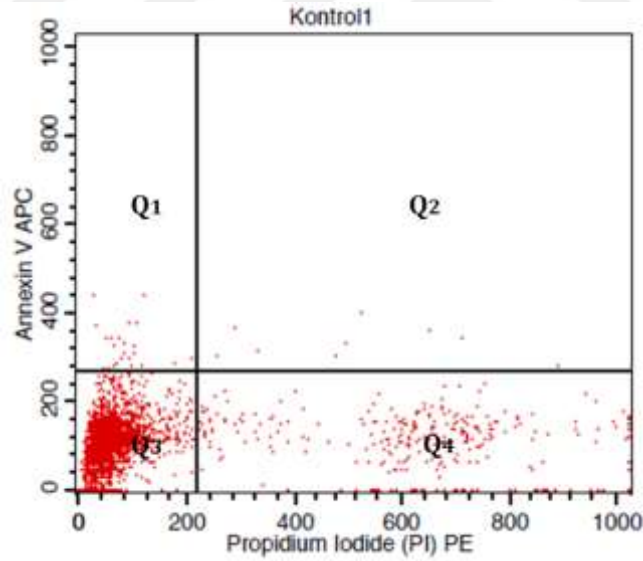
3.5. MCF-7 Hücresinde Apoptozun APC Annexin-V/PI Boyama ile Flow Sitometrik Analizi

Kanser hücrelerinde apoptoza bağlı hücre ölümlerini tespit etmek için APC Annexin-V Apoptosis Detection Kit With PI (Cat:640932, Biolegend) kullanılmaktadır. Bu kit ile APC Annexin-V ve PI ikili boyama yöntemi şeklinde uygulanmaktadır. PI boyama ile kullanılan APC Annexin-V Apoptoz Tespit Kiti, apoptotik ve nekrotik hücrelerin tanımlanması için özel olarak tasarlanmıştır. Annexin-V, kalsiyum bağımlı bir şekilde fosfatidilserine (PS) bağlanan hücre içi proteinlerin annexin ailesinin bir üyesidir. PS normalde sağlıklı hücrelerde hücre zarının hücre içine bakan kısmında bulunmaktadır, ancak erken apoptoz sırasında zar asimetrisi kaybolmaktadır ve PS dış kısma geçerek yer değiştirmektedir. Fosfatidilserinin hücre membranının dış yüzeyine geçiş yaparak konum değiştirmesi sonucu hücrenin komşu hücreler tarafından tanınarak, fagosite edilmesine neden olmaktadır. Apoptotik hücrelerin belirlenmesinde, apoptotik süreçte olan hücrelerde oluşan bu fizyolojik değişimlerden faydalanılmaktadır. Annexin-V antikoru, apoptoz dönemine geçmiş hücrelerin membranlarının dış yüzeyinde ortaya çıkan fosfatidilserin molekülüne bağlanabilme özelliği olan bir protein olduğundan dolayı, hücre yüzeylerine Annexin-V bağlanma oranı ile o hücre topluluğunda apoptoza uğramış hücrelerin oranı tespit edilebilmektedir (Karabekir, 2017; Biolegend, 2022).

Annexin-V ile primer apoptoz, APC Annexin-V ile PI birlikte kullanılarak sekonder apoptoz, sadece PI kullanılarak parçalanmış yani debri hücreler ile canlı hücreler belirlenebilmektedir. Bu yöntemde Annexin-V (+), Propidyum iyodür (-) hücreler apoptozise uğramış hücreler; olarak tanımlanmaktadır. Hem Annexin-V (+) hemde Propidyum iyodür (+) hücreler de nekroza uğramış hücreler; Annexin-V (-), PI (-) olan hüceler canlı sağlıklı hücreler; Annexin-V (-), PI (+) olan hücreler ölü (nekrotik) olarak değerlendirilmektedir (Biolegend, 2022).

Tablo 3.3. Annexin-V ile apoptozun belirlenmesinde kadradaki floresan boyalar ve hücre grupları. UL (Upper Left), UR (Upper Right), LL (Lower Left), LR (Lower Right).

	Annexin-V	PI	Hücre Populasyonunun Karakteri
Q1 (UL)	+	-	Erken Apoptoz
Q2 (UR)	+	+	Geç Apoptoz
Q3 (LL)	-	-	Canlı Hücre
Q4 (LR)	-	+	Ölü Hücre



Şekil 3.2. APC Annexin-V ve Propidium İodide (PI) PE grafiğinde hücre Q populasyonları; Q1 (UL), Q2 (UR), Q3 (LL), Q4 (LR) (Biolegend, 2022).

Florasın bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak, apoptozda hücrede salındığı bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması flow sitometri yardımıyla mümkündür. Kolay uygulanabilmesi ve kısa sürede sonuç vermesi nedeni ile tercih edilen bir yöntemdir. Ayrıca nicel olarak sonuç verebilmesi bakımından klinikte apoptozun tespit edilmesinde bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Karabekir, 2017).

Apoptoz, flow sitometri ile iki şekilde belirlenmektedir. Birinci yöntem floresan bir özelliğe sahip madde olan propidium iyodür kullanılarak, İkinci yöntem ise Annexin-V antikoru kullanılarak yapılmaktadır.

3.5.1 APC Annexin-V /PI Boyama

Apoptoz tespiti için aşağıda verilen işlem sırası takip edilmiştir. Deneyde her grup için 3 tekrar yapıldı. Deneyler için her dozdan iki adet 25 cm²'lik flasklara hücre ekimi yapıldı deney için hücreler çoğaltıldı. Flaskta konfluent duruma gelen hücreler alınarak 6 well plate kuyucuklarına 3 tekrarlı olacak şekilde 24 saat önceden hücrelerin ekimi yapıldı, well plate kuyucuk tabanına hücrelerin yapışması için beklendi. 24 saat sonra Danusertib 0,3 µM'lık dozu, Viteksin'in 1 µM'lık dozu ve Danusertib ile Viteksin aynı doz değerleri kullanılarak kombin doz konsantrasyonları hazırlanarak hücrelere bu dozlar uygulandı, deneyde kontrol olarak belirlenen grup ise sadece medium ile beslendi. Hücrelere doz uygulaması yapıldıktan sonra 48. saatteki etkiyi ölçmek için hücreler 48 saat inkübasyon için inkübatörde bekletildi.

Hücrelerin 48 saat inkübasyonda bekletilme süresinden sonra hücrelerin üzerindeki eski medium içerisindeki ölmüş hücre grupları ve atıklar medium atılarak uzaklaştırıldı. Kalan canlı hücreler 3 mL DPBS ile üç kez yıkandı. Son üçüncü yıkamada kullanılan DPBS çekilip uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin bulunduğu 6 well plate kuyucuklarına tripsinizasyon işlemi için 0.5 mL tripsin ilave edildi ve 5 dakika 37C'de inkübe edildi. Tripsinizasyon işlemi ile kaldırılan hücrelerin üzerine tripsinin inaktivasyonunu sağlamak için 2-3 mL kadar FBS katkılı komplet medium eklendi ve hücre süspansiyonu 15 mL'lik falkon tüpe alındı, hücreler nazikçe resüspanse edildikten sonra sayım işlemi için 10 µl kadar pipet ile alınarak ependorfa aktarıldı ve 10 µl tripan blue üzerine ilave edilerek Cedex XS cihazında hücre sayımları yapıldı.

Deneyin sonraki aşamaları kit protokolüne uygun yapılmıştır. Danusertib (0,3µM) ve Viteksin (1 µM) dozları uygulanan hücreler 48. saatin sonunda tripsinizasyon ile toplanıp sayım için 10 µL örnek alındıktan sonra üstte kalan mediumlu süpernatant kısmı da uzaklaştırıldı. Pelet olarak falkonda kalan hücreler sonra iki kez soğuk 2 mL PBS ile 500 g'de santrifülenecek şekilde yıkandı kalan medium kalıntıları da uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 100 µL'de 200.000 hücre olacak şekilde Buffer Binding ile resüspanse edildi. Seyreltilen 1 mL örnekten 100 µL alınarak 50 ml'lik facs tüplerine aktarıldı. Facs tüplerine alınan 100 µL örnek üzerine 5 µL Annexin-V ve ardından 10 µL PI eklendi. Örnekler boyalar eklendikten oda sıcaklığında sonra 15 dakika ışık görmeyecek şekilde karanlıkta inkübe edildi. En son üzerlerine 500 µL'ye tamamlamak için 400 µL Binding buffer eklendi. Bu işlemten sonra örnekler bir saat içinde flow sitometri cihazında (FACSCalibur, Becton Dickonson, CA, USA) CellQuest Pro programı kullanılarak örnekler 3 tekrarlı olacak şekilde okutuldu.

3.6. MCF-7 Hücrelerinde Apoptoz Yolağı ve Metastaz Yolağı ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi

Gen ekspresyonu qRT-PCR metodu ile β - Actin, AURK-B, Apoptotik kaspazların (Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9) ve VEGF gen ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. β - Actin geni kontrol geni olarak kullanıldı diğer genler ise bu gen kullanılarak normalize edildi. AURK-B geninin ekspresyon seviyesine bakılarak Danusertib ve Viteksinin hücre yaşam döngüsünde etkisinin olup olmadığı, Kaspazların (kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9) gen ekspresyon seviyelerine bakılarak Danusertib ve Viteksinin apoptozun hangi sinyal yolağından etki, VEGF gen ekspresyon seviyesine bakılarak Danusertib ve Viteksinin metastazda hücre migrasyonunda etkisinin olup olmadığı tespit edilmeye çalışıldı. Çalışmanın bu aşamasında kontrol grubu, Danusertib (0.3 μ M) grubu, Viteksin (1 μ M) grubu, Danusertib (0.3 μ M)-Viteksin (1 μ M) birlikte uygulandığı grup olarak 4 deney grubu kullanıldı. Deney düzeni içinde oluşturulan her grup üç tekrarlı olacak şekilde deney düzeni tasarlandı. Deney grupları ve RT-PCR aşamasında çalışılacak genler aşağıdaki Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.4. Apoptoz iç ve dış yolağında görev alan β - Actin, AURK-B Kaspaz-3, -8 ve -9, VEGF gen ifade düzeylerini belirlemek için düzenlenen qRT-PCR Well plate düzeni (n= 3 tekrarlı).

Gruplar	Gen	β - Actin	AURK-B	Kaspaz3	Kaspaz8	Kaspaz9	VEGF
Grup 1	Kontrol						
Grup 2	Danusertib (0.3 μ M)						
Grup 3	Viteksin (1 μ M)						
Grup 4	Danusertib (0.3 μ M) + Viteksin (1 μ M)						

48. saat
n= 3 tekrarlı

3.6.1. RNA İzolasyon Aşaması, cDNA Sentez Aşaması, RT-PCR Aşaması

RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRt-PCR yöntemleri ile apoptotik genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde; High Pure RNA izolasyon Kit (Roche Cat. No: 1828665), High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Appliedbiosystems-by Thermo Fisher Scientific) kullanıldı. Gen ekspresyonunda β -Actin, AURK-B, VEGF, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9 gen primerleri kullanılmıştır. β -Actin geni Housekeeping genidir ve bu çalışmada kullanılan diğer genler β -Actin geni ile normalize edildi.

3.6.1.1. RNA İzolasyon Aşaması

MCF-7 hücreleri kültüre alınarak bir hafta boyunca çoğaltıldı. Hücreler yeterli sayıda çoğaldıktan sonra flasklardaki hücreler tripsinizasyon işlemi ile toplandı ve santrifüjlenerek üstte kalan süpernatant kısmı atıldı. Cedex XS cihazında hücrelerin sayımları yapıldı. Sayımları yapılan hücreler 6 well plate kuyucuklarına 10^6 hücre olacak şekilde ekildi. Well plate kuyucuklarına ekilen hücrelerin

tutunması için 24 saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücreler 24 saat sonunda tutunduktan sonra eski medium uzaklaştırıldı ve Danusertib (0,3 µM) ve Viteksine (1 µM) ait dozlar kullanılarak hazırlanmış medium uygulandı. Medium uygulamasından sonra hücreler üzerinde Danusertib ve Viteksin'in etkisini ölçmek amacı ile hücreler 48 saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra 6 well plate kuyucuklarındaki eski medium uzaklaştırıldı, her well plate kuyucukların 0,5 µL tripsin eklenerek 5 dakika etüvde hücreler bekletildi. Bekleme süresinden sonra tripsini inaktive etmek için FBS katkılı komplet medium 1-2 mL olacak eklendi. Well plate kuyucuklarındaki hücreler toplanarak 15 mL'lik falkon tüplere alındı. Falkon tüplere alınan hücre süspansiyonu 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatan kısmı uzaklaştırıldı. Falkon tüpün dibinde kalan hücre peleti üzerine 200 µL DPBS eklenerek ve hücre örnekleri RNA izolasyon işlemine hazır hale getirildi.

RNA izolasyon aşaması High Pure RNA izolasyon kit protokolüne uygun olarak yapıldı. Hazırlanmış hücre örnekleri RNA izolasyon kitindeki Lysis Binding Buffer her örnek için 200 µl olacak şekilde ilave edildi. Resüspanse edilerek köpürtüldü. Örnek RNA izolasyon kolonuna aktarılarak alındı. Örnek sonra 15 saniye kadar 13500 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı kısım boşaltılarak uzaklaştırıldı. Kolona 90 µl DNase Incubation Buffer ve 10 µl DNase eklendi. Örnekler 15 dk 25°C'de inkübe edildi. Kolona 500 µl Wash Buffer I eklenir. 30 sn 13500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra toplama tüpüne geçen sıvı kısım atıldı. Kolona 200 µl Wash Buffer II eklendi. 2 dk 14500 rpm'de santrifüj edildikten sonra toplama tüpleri atıldı. RNA tutan kolonlar 2 ml'lik eppendorf tüplerine yerleştirildi. 75 µl Elution Buffer eklenir. 75 sn 13500 rpm'de santrifüj edildi. Eppendorf tüplerine transfer edilen RNA örneklerinde 4 µL farklı eppendorf tüplerine alınarak buz içeren bir taşıma kutusunda NanoQ cihazında RNA kalitesini belirlemek için örnekler taşındı. RNA kalitesinin 260 nm/280 nm'de 1,7-2,0 kalitede olması beklenir. RNA kalite ölçümünden elde edilen veriler Tablo 4.4'de verilmiştir. RNA'lar cDNA sentezi için hemen kullanılabilir veya RNA'lar -80°C'de saklanıp cDNA sentezi için sonra da kullanılabilir.

3.6.1.2. cDNA Sentez Aşaması

cDNA sentezi High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit protokolüne uygun yapıldı. Bu aşamada bir önceki RNA izolasyon aşaması sonunda elde edilen RNA örnekleri kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Kullanıma başlamadan önce derin dondurucudan alınan bütün reaktif ve RNA numuneleri oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı. Protokole göre işlemlere başlamadan önce erimiş numune ve reaktif kısa bir spin yapıldı. Bütün reaktif ve RNA numuneleri buz üzerinde muhafaza edildi. Her numune için ayrı ayrı 0.2 µM'lık PCR tüpleri kullanıldı. cDNA sentezi için hazırlanan mix miktarı ve kullanılan RNA miktarları Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.5. MCF-7 hücrelerinin cDNA sentezi için hazırlanan mix miktarları ve eklenen RNA miktarları.

10X RT Buffer	2 μ L
25X dNTP mix (100 mM)	0.8 μ L
10X RT Random Primer	2 μ L
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 μ L
Nuclease- free H ₂ O	7.2 μ L
Total RNA	7 μ L
Total hacim	20 μ L

Termalcycler protokolünde kullanılan sıcaklık ve dakika değerleri Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. Termalcycler protokolünde kullanılan derece ve dakika değerleri.

25 °C	10 Dakika
37 °C	120 Dakika
85 °C	5 Saniye
4 °C	1 Dakika

3.6.1.3. RT-PCR Aşaması

RT-PCR aşaması için gerekli olan reaksiyon karışımı protokole uygun hazırlandı ve reaksiyon karışımında kullanılan miktarlar Tablo 3.7'de verilmiştir

Tablo 3.7. RT-PCR aşamasında kullanılan reaksiyon karışımındaki madde miktarları.

PCR Bileşenleri	20 μL
Water PCR Grade	5 μ L
Master Mix	10 μ L
Reverse primer	1 μ L
cDNA	3 μ L

Multiwell plate içerisine her bir örnek için 17 μ L karışım ve karışımın üzerine 3 μ L cDNA eklendi ardından cihaza yükleme yapıldı. PCR koşulları Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8. PCR koşulları.

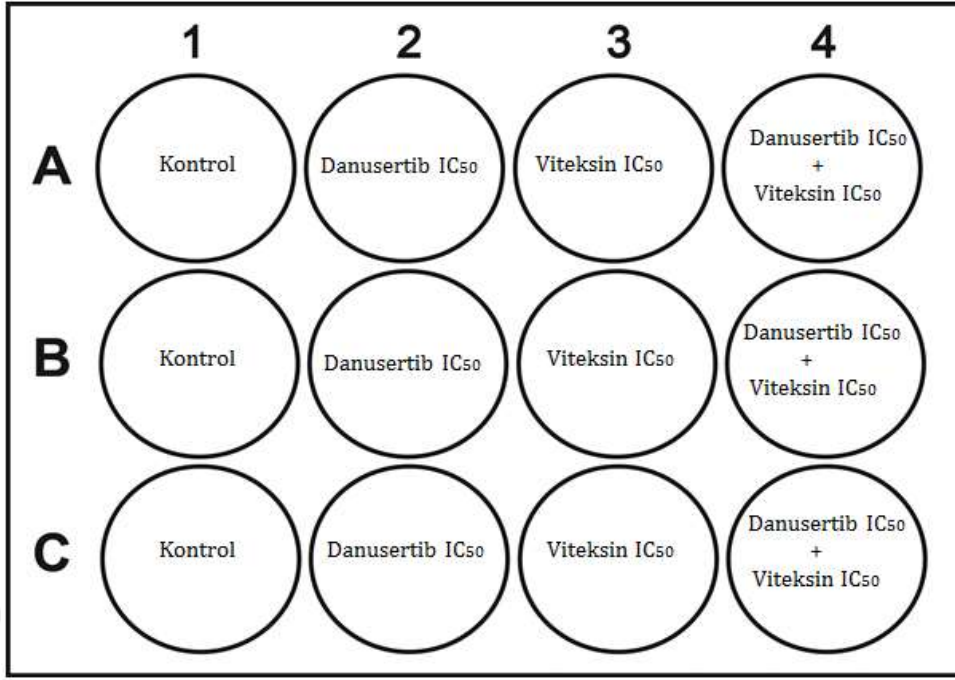
PCR aşamaları	Hedef Isı (°C)	Bekleme süresi (sn)
Pre İnkübasyon	95	600
Amplifikasyon (45 Döngü)	95	10
	60	10
	72	10
Melting	95	10
	65	60
	97	1
Soğuma	40	30

3.7. MCF-7 Hücrelerinin Metastazında Wound Healing Metodu ile Migrasyon Analizi

Metastaz ve migrasyon analizi için Wound Healing (yara iyileşmesi) metodu kullanıldı. Wound Healing metodu ve protokolü aşağıda verilmiştir. Çalışmanın bu aşaması Wound Healing metodunun protokolüne uygun yapıldı.

3.7.1. Wound Healing Protokol

Hücre kültüründe çoğaltılan MCF-7 hücreleri 12 well plate planı deney planı Şekil 3.3'deki gibi düzenlendi ve Şekil 3.4'de görüldüğü gibi her kuyucuğa $5 \cdot 10^5$ hücre ekildi. Deney planında 4 grup kullanıldı (1. Kontrol grubu, 2. Danusertib grubu, 3. Viteksin grubu ve 4. Danusertib + Viteksin grubu) ve her grup için 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Well plate ekilen hücrelerin tabana yapışması için 24 saat veya daha fazla etüvde inkübasyon için beklendi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki mediumlar alınıp uzaklaştırıldıktan sonra, well plate kuyucuklarındaki hücreler üzerine hızlıca 1 mL PBS eklendi. 200µL pipet ucuyla birbirine paralel düz çizgiler şeklinde yaralar (çizgi) açıldı, bu işlemin ardından soğuk DPBS ile 3 defa yıkanıp kalkan hücreler ortamdaki uzaklaştırıldı. Pipet ucu ile yara açılan bölgede kalkan hücreler uzaklaştırıldıktan sonra medium ile hazırlanmış ilaç dozları kuyucuklardaki hücrelerin üzerine eklendi. Danusertib ve Viteksin uygulanan hücrelerin karakterine, doubling zamanına ve yaranın kapanma durumuna göre 0., 24., 48. saatlerde hücrelerin durumunu gösteren fotoğrafları inverted mikroskop kamerası ile çekildi. Yara kapanması gözlenen hücre grupları kontrol grubuyla ve kendi aralarında karşılaştırıldı.



Şekil 3.3. Wound Healing 12 well plate deney düzeni.



Şekil 3.4. Wound Healing deney grupları ve well plate kuyucuklarına hücre ekimi.

3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi

Bu çalışmada deney setleri en az 3 tekrarlı olarak yapıldı. Tüm deneysel veriler ortalama \pm standart Sapma (\pm SD) olarak sunulmuştur. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Student t testleri, uygun şekilde istatistiksel anlamlılığı değerlendirmek için yapıldı. Bağımsız iki grup oranlarını karşılaştırmak için iki oran z test, Ortalamalarını karşılaştırmak için Student's t test, ikiden fazla bağımsız grup ortalamaları karşılaştırmak için de One Way ANOVA test istatistiği kullanılmıştır. ANOVA ile farklılık tespiti halinde Post Hoc test olarak Turkey istatistiği ile değerlendirilmiştir. $P < 0.05$, istatistiksel olarak anlamlı bir farkı belirtmek için kabul edildi.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

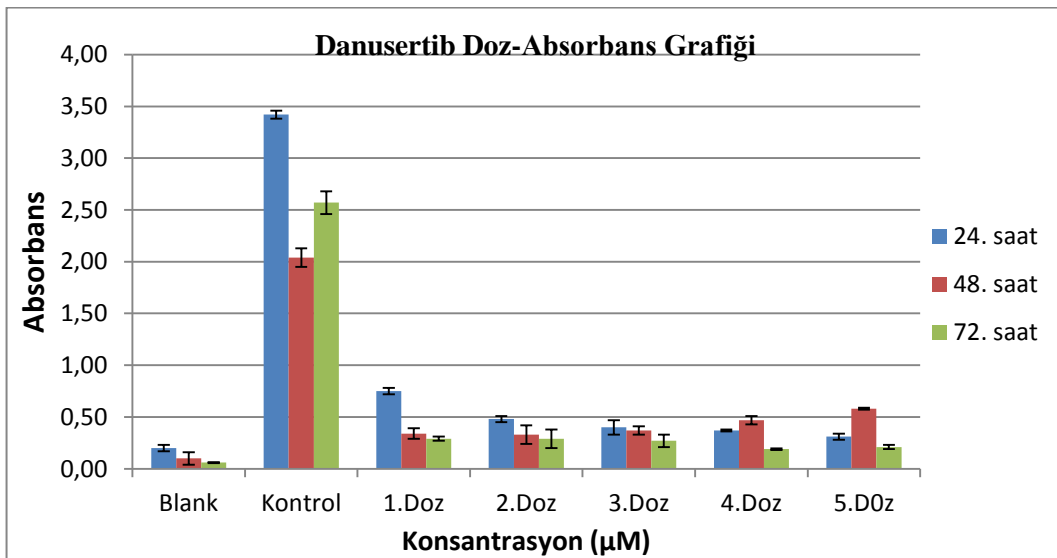
Doktora tez çalışması olarak yürütülen bu bilimsel araştırma projesi, Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM)'inde yürütülmüştür. Bu bilimsel araştırma projesi, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından BAP-2019-2-TP3-3609 numaralı TP3-Doktora Tez Projesi olarak desteklenmiştir.

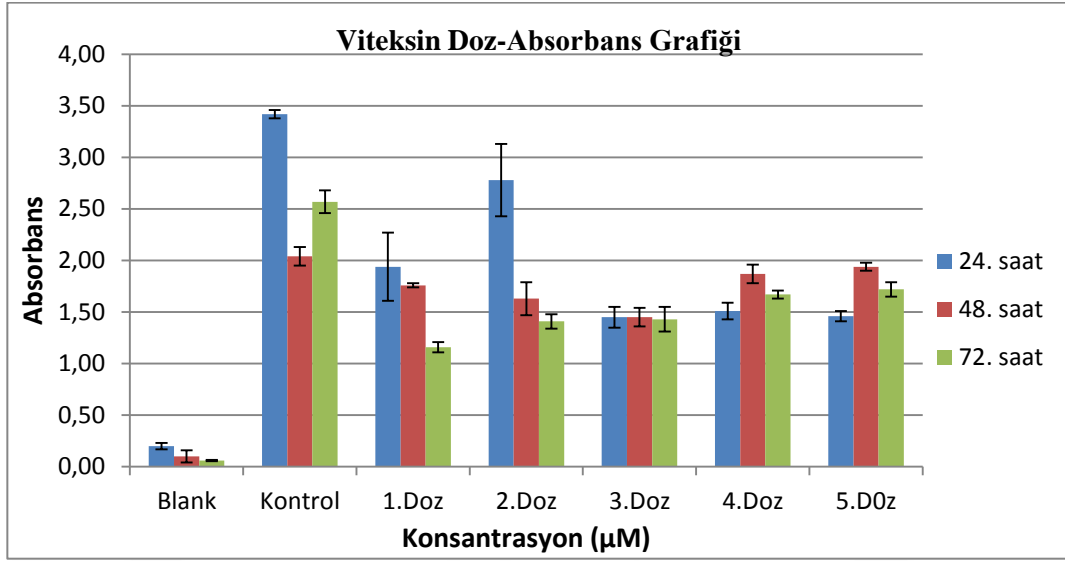
4.1.1 MCF-7 Hücrelerinde Danusertib'in ve Viteksin'in IC₅₀ Sitotoksik Doz Değerinin WST-8 Test Kiti ile Belirlenme Değerlendirmesi

Danusertib ve Viteksinin seçilen beş farklı doz değeri 8 tekrarlı olacak şekilde uygulanarak 24., 48. ve 72. saatte sitotoksik etkisine bakıldı. Deneş grupları olarak kontrol grubu, Danusertib doz grubu, Viteksin doz grubu ve Danusertib-Viteksin birlikte doz grubu olacak şekilde 4 grup oluşturularak uygulandı. Deneş well platede 8 tekrarlı WST8 test kiti kullanılarak yapıldı.

Danusertibin ve Viteksinin sitotoksik dozunun belirlenmesinde deneylerden elde edilen veriler uygulanan Danusertib ve Viteksin dozlarının absorbans değeri Elisa readerda ölçüldü. Danusertib'in ve Viteksin'in Sitotoksik IC₅₀ değerlerini belirlemek için yapılan deneylerin sonucunda elde edilen doz-absorbans verileri grafik şeklinde Tablo 4.1, Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Danusertib 24, 48 ve 72. saat doz- absorbans grafikleri.



Tablo 4.2. Viteksin 24, 48 ve 72. saat doz -absorbans grafikleri.

MCF-7 hücreleri üzerinde Danusertib'in ve Viteksin'in sitotoksik IC_{50} değerini hesaplamak için elde edilen absorbans değerleri kullanıldı ve IC_{50} değerleri hesaplandı. Danusertib için 24. saat IC_{50} değeri $3.09 \mu M$, Viteksin için 24.saat IC_{50} değeri $9,18 \mu M$ olarak belirlenmiştir. Danusertib için 48. saat IC_{50} değeri $3.27 \mu M$, Viteksin için 48. saat IC_{50} değeri $10,02 \mu M$ olarak belirlenmiştir. Danusertib için 72. saat IC_{50} değeri $2,77 \mu M$, Viteksin için 72. Saat IC_{50} değeri $5,43 \mu M$ olarak belirlenmiştir.

4.1.2. MCF-7 Hücresinde Apoptozun APC Annexin-V/ PI Boyama ile Flow Sitometrik Analizi

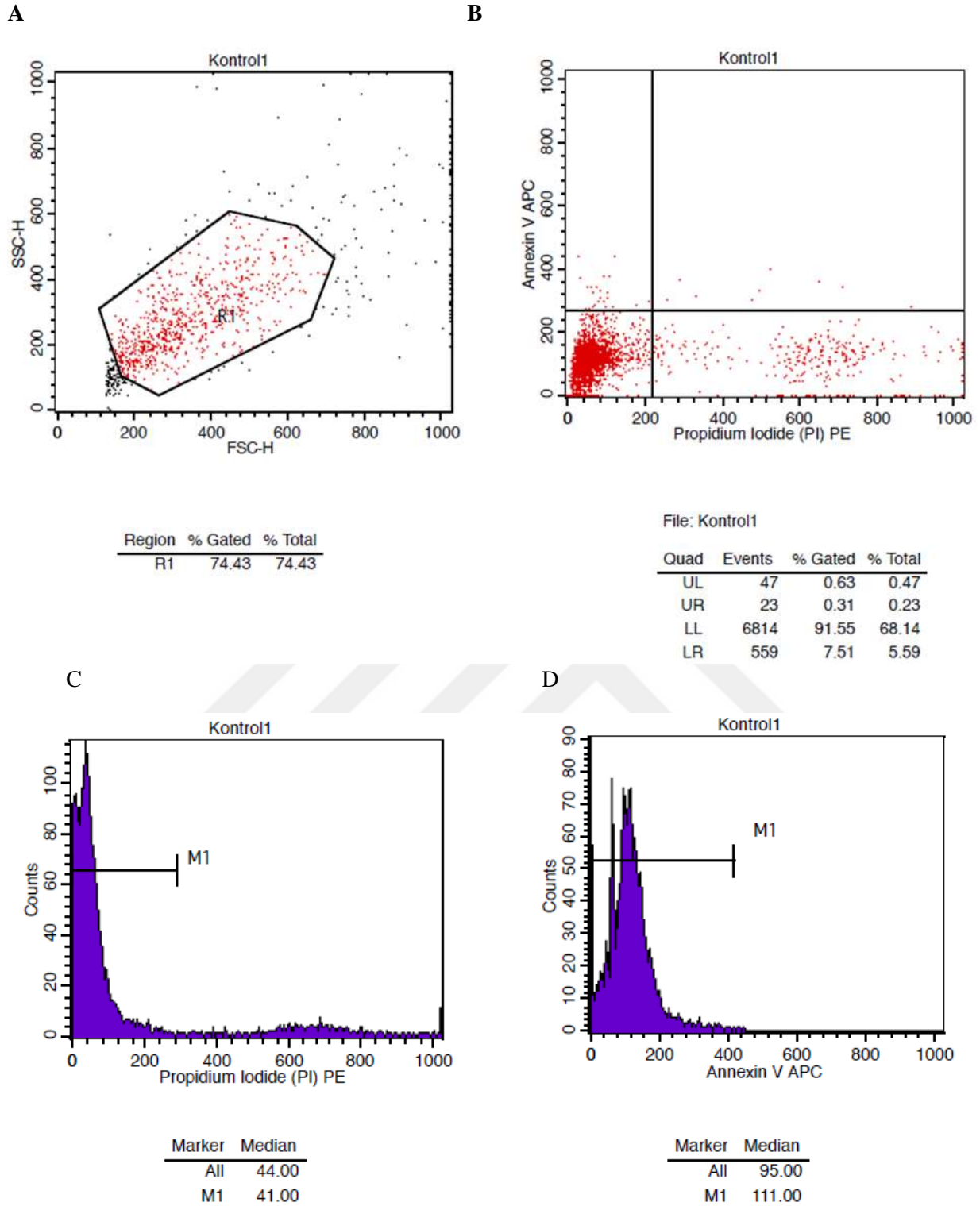
MCF-7 meme kanseri hücresinde Danusertibin ve Viteksinin seçilen sitotoksik doz değerlerinin apoptoz yolağındaki etkisini belirlemek için immünohistokimyasal yöntem olan APC Annexin-V/PI boyama metodu ile flow sitometrik analizi yapıldı. MCF-7 hücrelerinde doz/zaman bağımlı Danusertib, Viteksin ayrı ayrı ve Danusertib-Viteksin birlikte apoptotik etkisi APC Annexin-V kitinin protokolüne uygun olarak APC Annexin-V kullanılarak boyama sonrası ölçüldü. Çalışmanın bu aşamasında Danusertib ve Viteksinin IC_{50} doz değerlerini belirlemek için yapılan sitotoksikite deneyleri sonucunda bulunan sitotoksik IC_{50} doz değerleri kullanılarak apoptoz deneyleri yapılmıştır fakat Danusertib IC_{50} ve Viteksin IC_{50} doz değerleri kullanıldığında Danusertib hücrelerin %50 'ni öldürdüğünden dolayı hücrelerin canlılığının korunarak Danusertibin ve Viteksin'in MCF-7 hücreleri üzerinde apoptotik etkisi için apoptoz analizi yapıldığında canlılık değerleri çok düşük çıkmıştır bu nedenle yeni deney grupları tasarlanırken kullanılan doz değerleri bulunan Danusertib IC_{50} ve Viteksin IC_{50} doz değerlerinin onda biri bir değer olarak literatür araştırmaları da dikkate alınarak Danusertib için $0.3 \mu M$, Viteksin için ise doz değeri $1 \mu M$ olarak seçilmiş yeni doz değerleri deney gruplarında kullanılmıştır. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır. Apoptoz deney seti üçlü tekrar verilerininin Şekil 4.1-Şekil4.12'deki verilerden alınmıştır. Bu verilerin ortalamaları ve \pm Standart Deviasyon ($\pm SD$)'nu ve P

değerleri hesaplanarak analiz sonuçları Tablo 4.3’de sunulmuştur. P değerlerini hesaplamak için deney grupları ikili gruplar şeklinde kıyaslanmıştır. İkili kıyaslama yapılırken gruplar; Kontrol/Danusertib (K/D), Kontrol/Viteksin (K/V), Kontrol/Danusertib+Viteksin kombin (K/D+V), Danusertib/Viteksin (D/V), Danusertib/ Danusertib+Viteksin kombin (D/D+V), Viteksin/Danusertib+Viteksin kombin (V/D+V) grupları olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır. Tablo 4.3’deki akım sitometrik deney verileri şekil 4.1- 4.12’den alınmıştır.

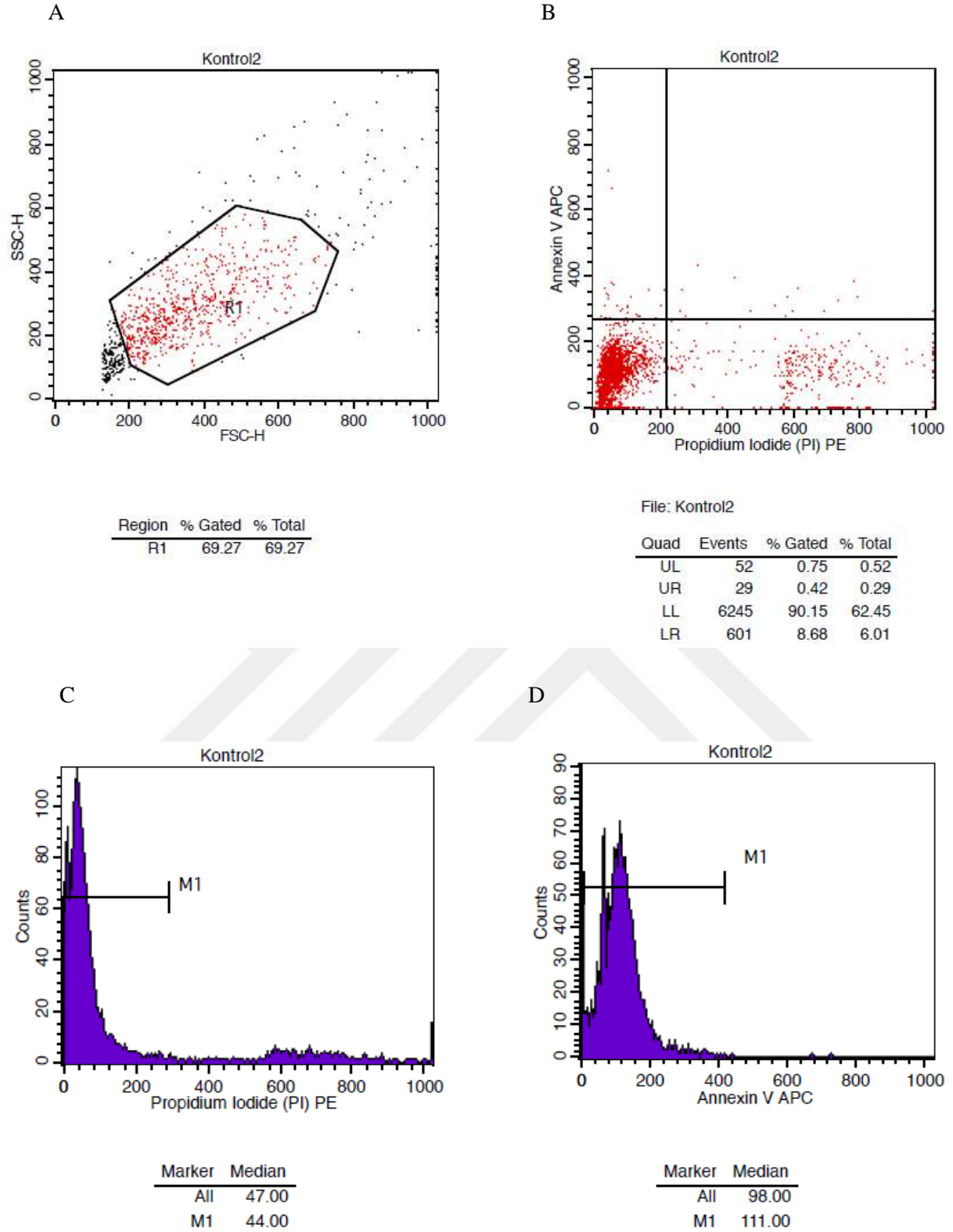
Tablo 4.3. MCF-7 Hücresinde 48. Saat Danusertib (0,3 μ M) ve Viteksin (1 μ M) doz değerlerinin 3 tekrarlı deney gruplarındaki apoptoz verilerinin ortalamaları. Verilerin istatistik analiz ile hesaplanan \pm SD ve P değerleri.

Kadran	Populasyon Karakteri	Populasyon Yüzde (%) Değerleri				
		Kontrol	Danusertib	Viteksin	Kombin	
Ortalama	Q1	Erken apoptotik Hücreler	0.70 \pm 0,07	3.15 \pm 0,96	2.24 \pm 0,59	3.07 \pm 0,37
	Q2	Geç apoptotik Hücreler	0.34 \pm 0,07	1.23 \pm 0,43	0.96 \pm 0,37	0.74 \pm 0,42
	Q3	Canlı Hücreler	90.34 \pm 1,13	85.99 \pm 7,71	82.97 \pm 2,32	88.97 \pm 5,17
	Q4	Nekrotik Hücreler	8.61 \pm 1,07	15.10 \pm 7,99	13.82 \pm 1,75	7.22 \pm 4,95
P Değeri		Populasyon Karakteri	P Değeri İstatistiksel Analiz Sonucu			
		Erken apoptotik Hücreler	1. $P_{K/D} < 0.05$, 2. $P_{K/V} < 0.05$, 3. $P_{K/D+V} < 0.05$, 4. $P_{D/V} < 0.05$, 5. $P_{D/D+V} > 0.05$, 6. $P_{V/D+V} < 0.05$			
		Geç Apoptotik Hücreler	1. $P_{K/D} > 0.05$, 2. $P_{K/V} > 0.05$, 3. $P_{K/D+V} > 0.05$, 4. $P_{D/V} > 0.05$, 5. $P_{D/D+V} > 0.05$, 6. $P_{V/D+V} > 0.05$			
		Canlı Hücreler	1. $P_{K/D} > 0.05$, 2. $P_{K/V} > 0.05$, 3. $P_{K/D+V} > 0.05$, 4. $P_{D/V} > 0.05$, 5. $P_{D/D+V} > 0.05$, 6. $P_{V/D+V} > 0.05$			
	Nekrotik Hücreler	1. $P_{K/D} > 0.05$, 2. $P_{K/V} > 0.05$, 3. $P_{K/D+V} > 0.05$, 4. $P_{D/V} > 0.05$, 5. $P_{D/D+V} > 0.05$, 6. $P_{V/D+V} > 0.05$				

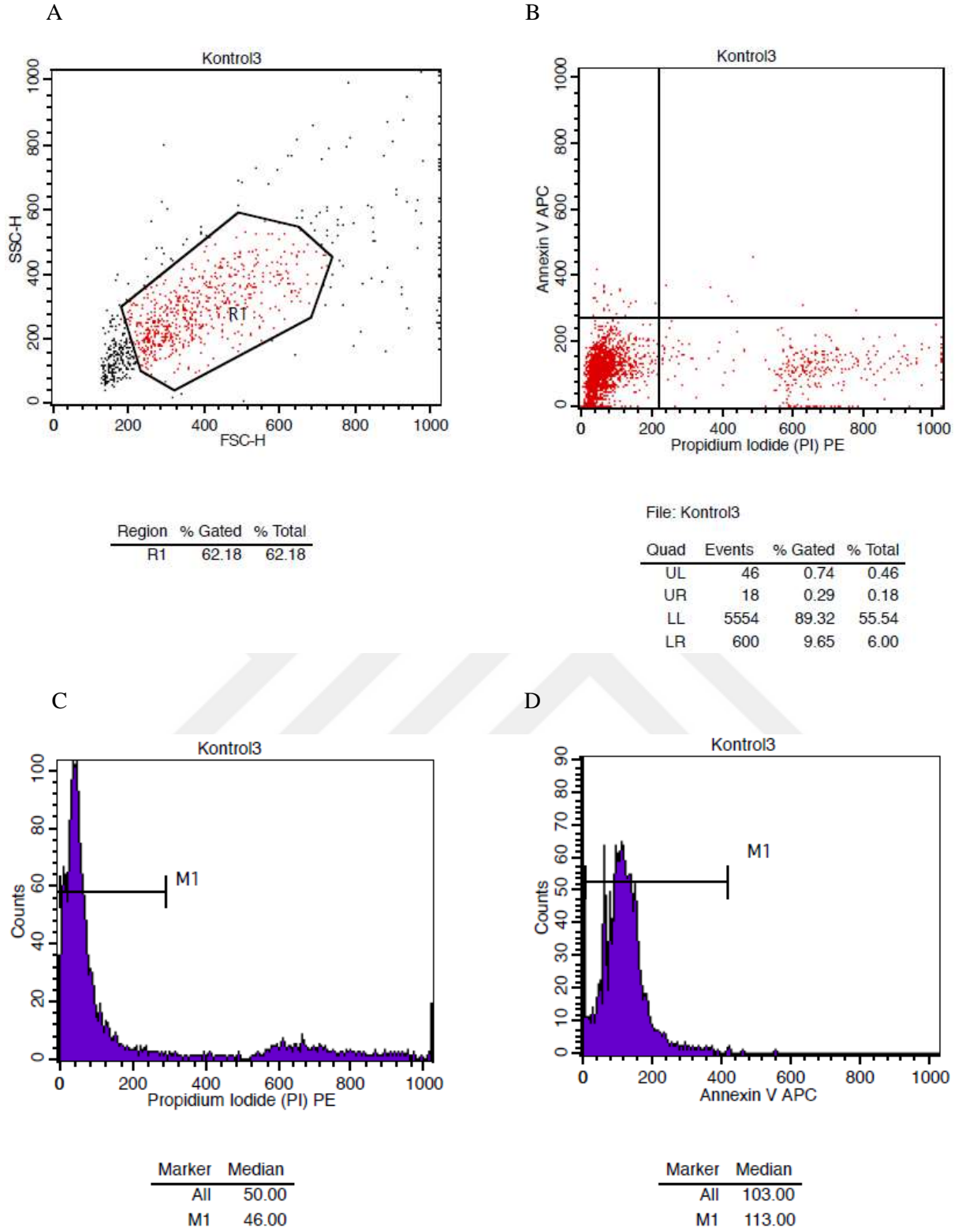
MCF-7 hücreleri üzerinde Danusertib’in (0.3 μ M) ve Viteksin’in (1 μ M) apoptotik etkisinin incelenmesi için yapılan deney gruplarında; kontrol grubunda erken apoptoza (Q1) uğrayan hücreler 0.70, geç apoptoza uğrayan hücreler (Q2) 0.34, canlı hücre oranı (Q3) 90.34, Nekrotik hücre oranı (Q4) ise 8.61’dir. Danusertib uygulanan hücre gruplarında erken apoptoza uğrayan hücreler (Q1) 3.15, geç apoptoza uğrayan hücreler (Q2) 1.23, canlı hücre sayısı (Q3) 85.99, Nekrotik hücre oranı (Q4) ise 15.10’dur. Viteksin uygulanan hücre gruplarında erken apoptoza uğrayan hücreler (Q1) 2.24, geç apoptoza uğrayan hücreler (Q2) 0.96, canlı hücre sayısı (Q3) 82.97, nekrotik hücre oranı (Q4) ise 13.82’dir. Danusertib ve Viteksinin birlikte uygulandığı deney gruplarında erken apoptoza uğrayan hücreler (Q1) 3.07, geç apoptoza uğrayan hücreler (Q2) 0.74, canlı hücre sayısı (Q3) 88.97, nekrotik hücre oranı (Q4) ise 7.22’dir.



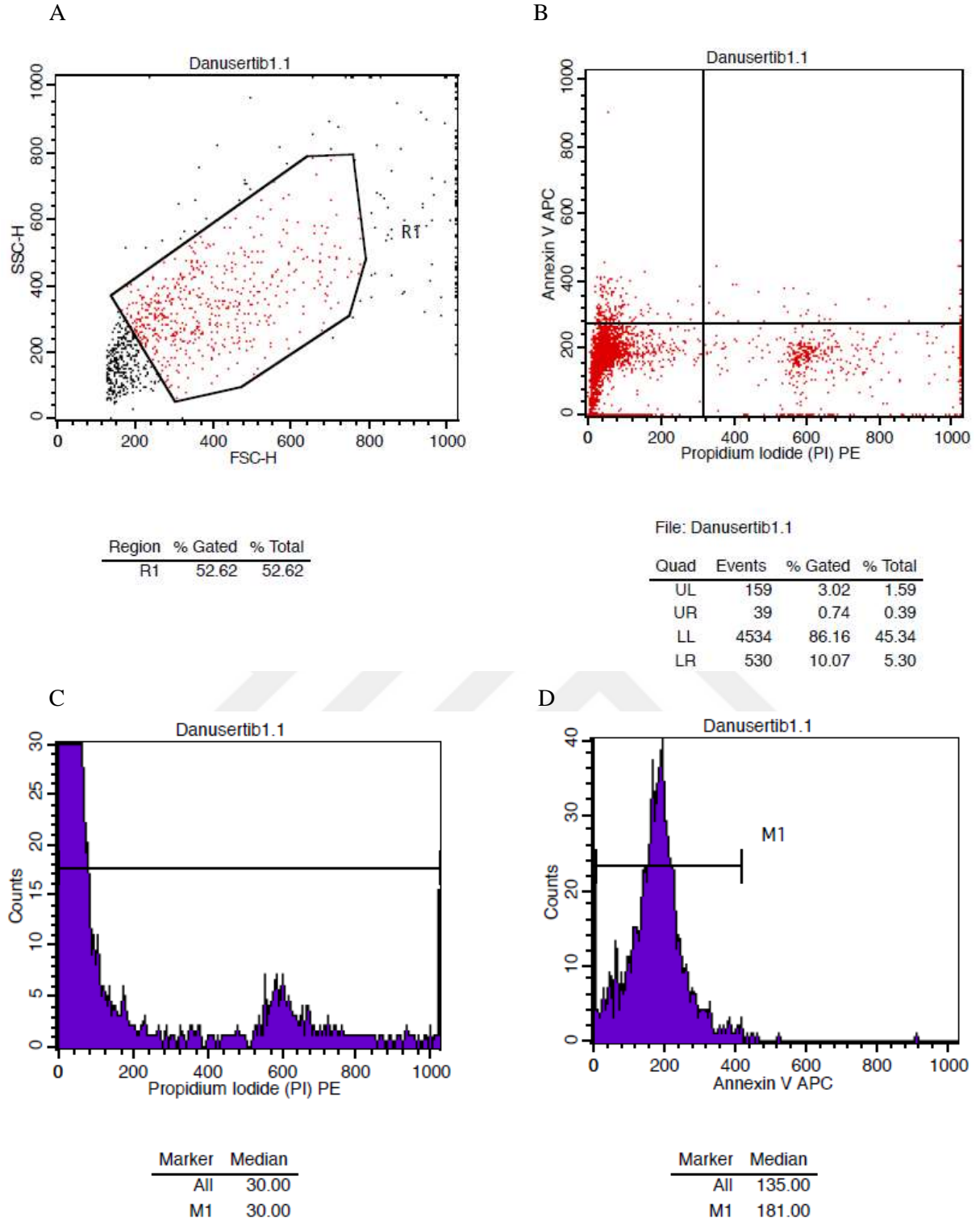
Şekil 4.1. Kontrol1 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin -V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



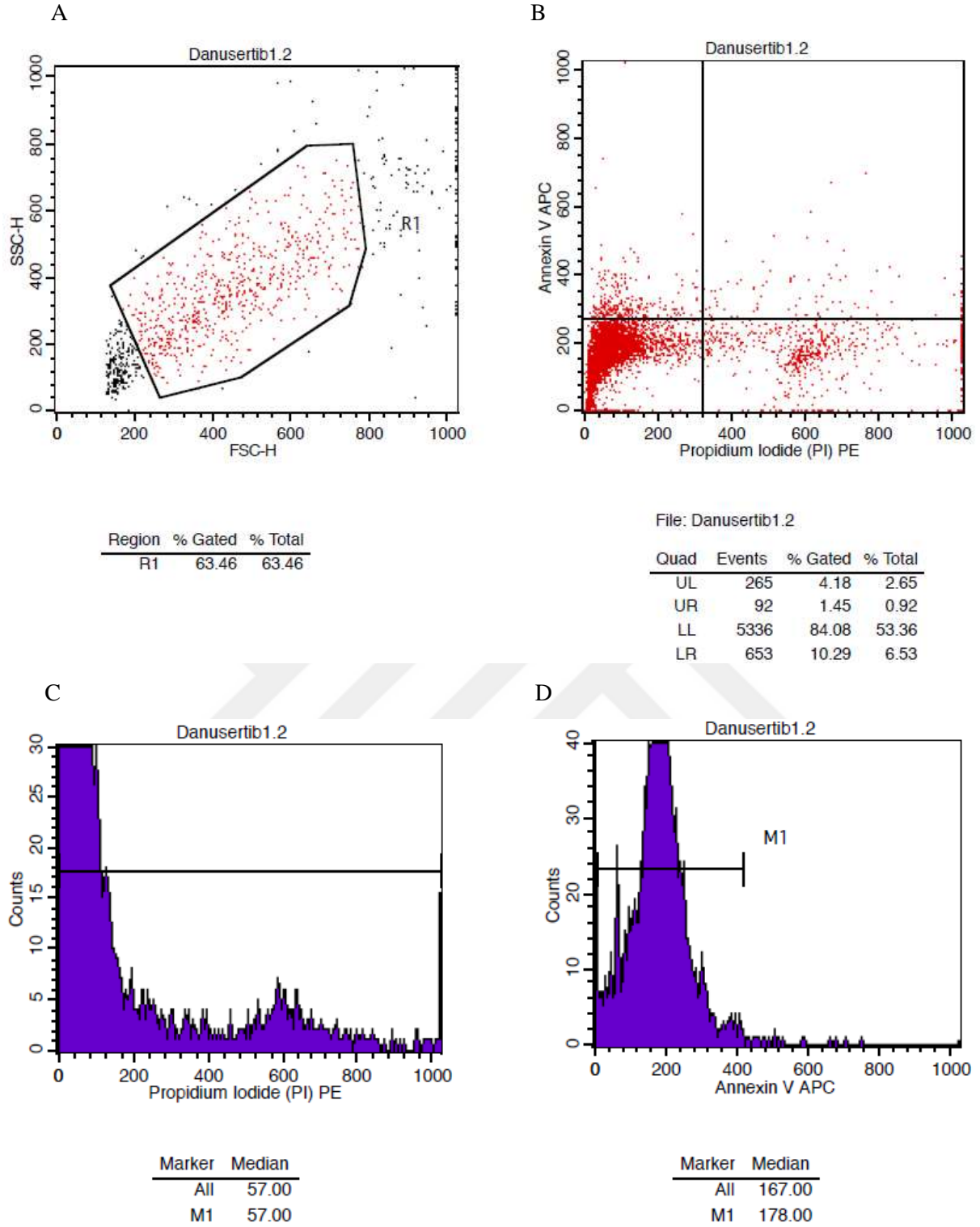
Şekil 4.2. Kontrol2 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyonu grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin -V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



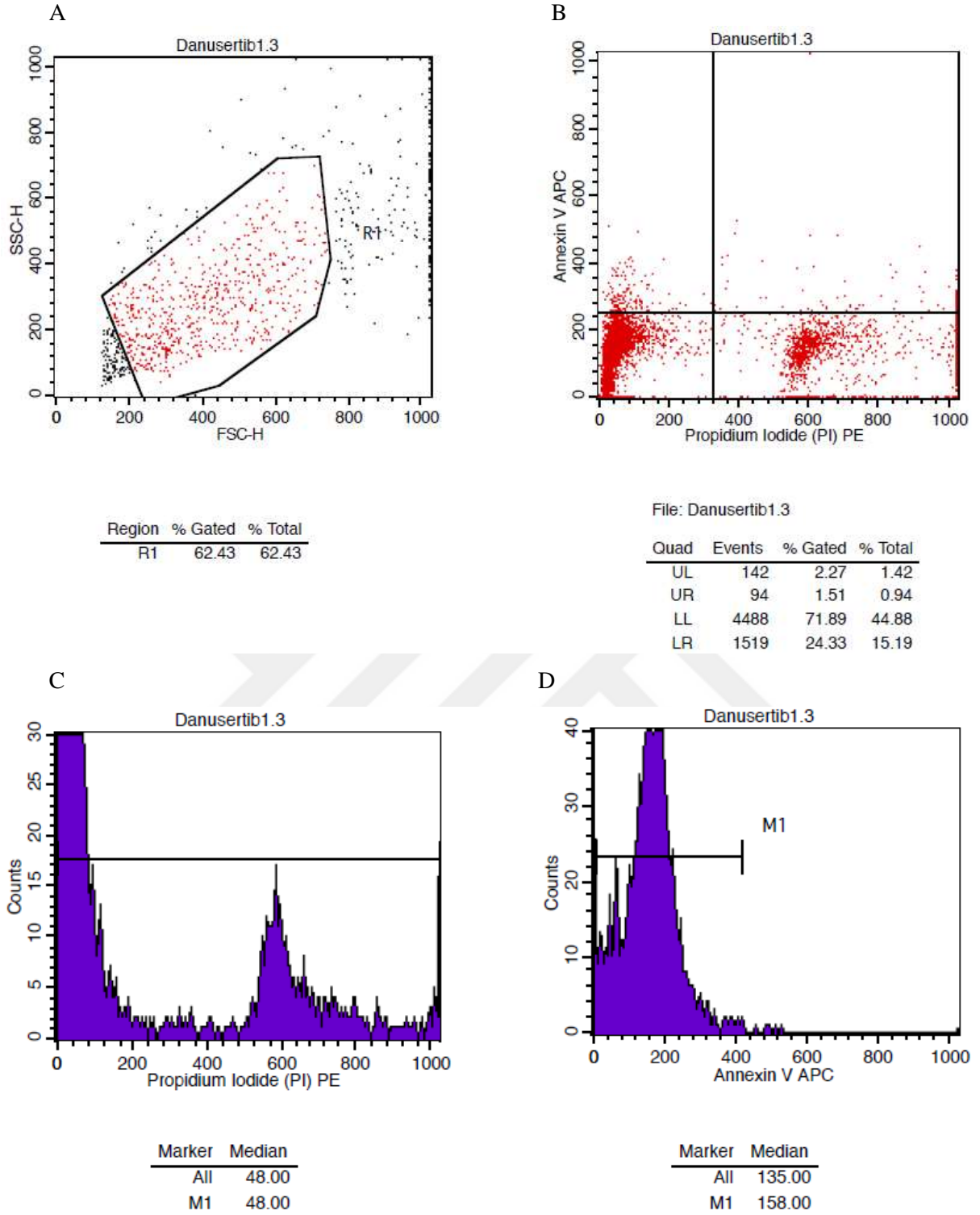
Şekil 4.3. Kontrol3 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin-V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



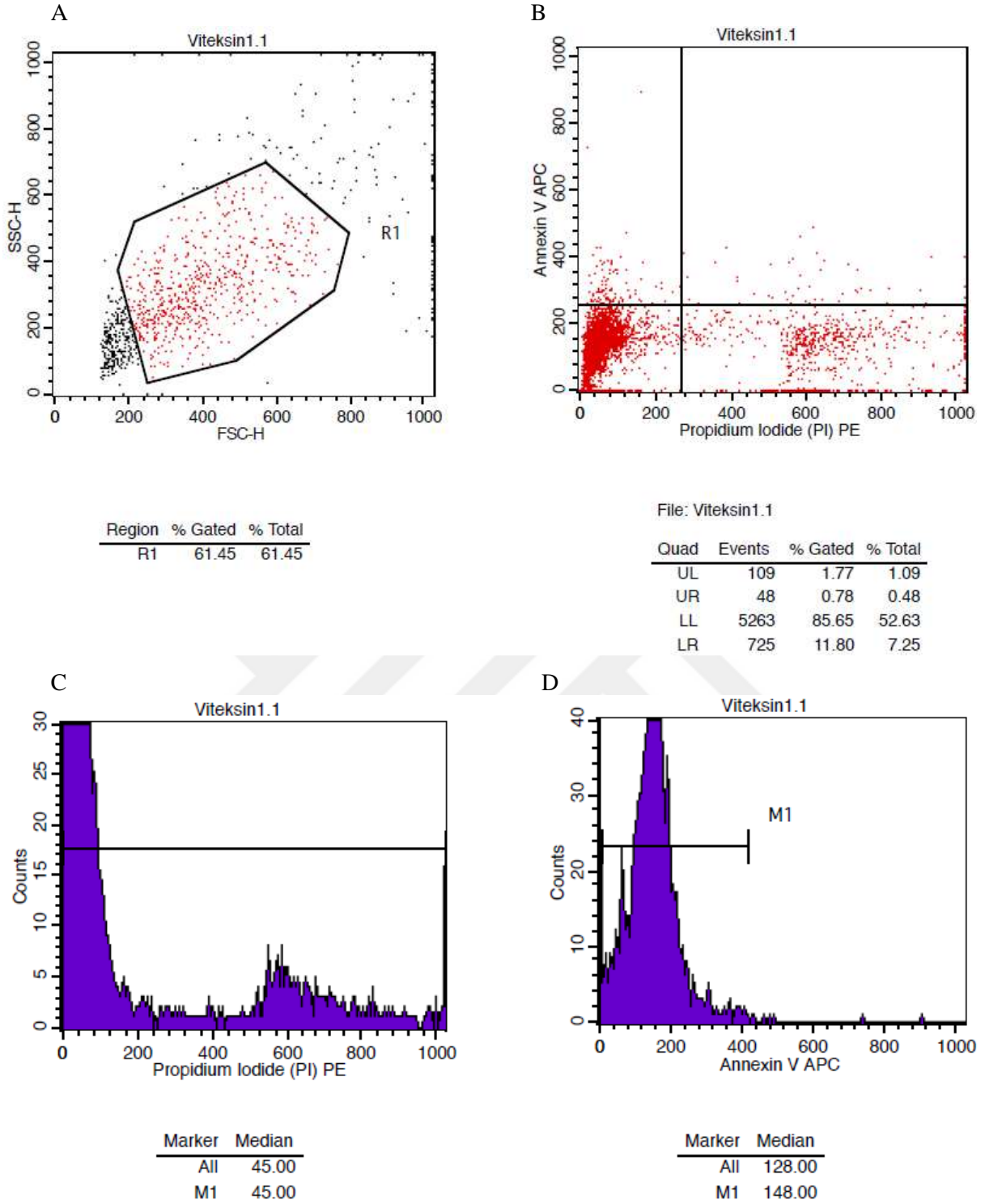
Şekil 4.4. Danusertib1.1 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin-V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



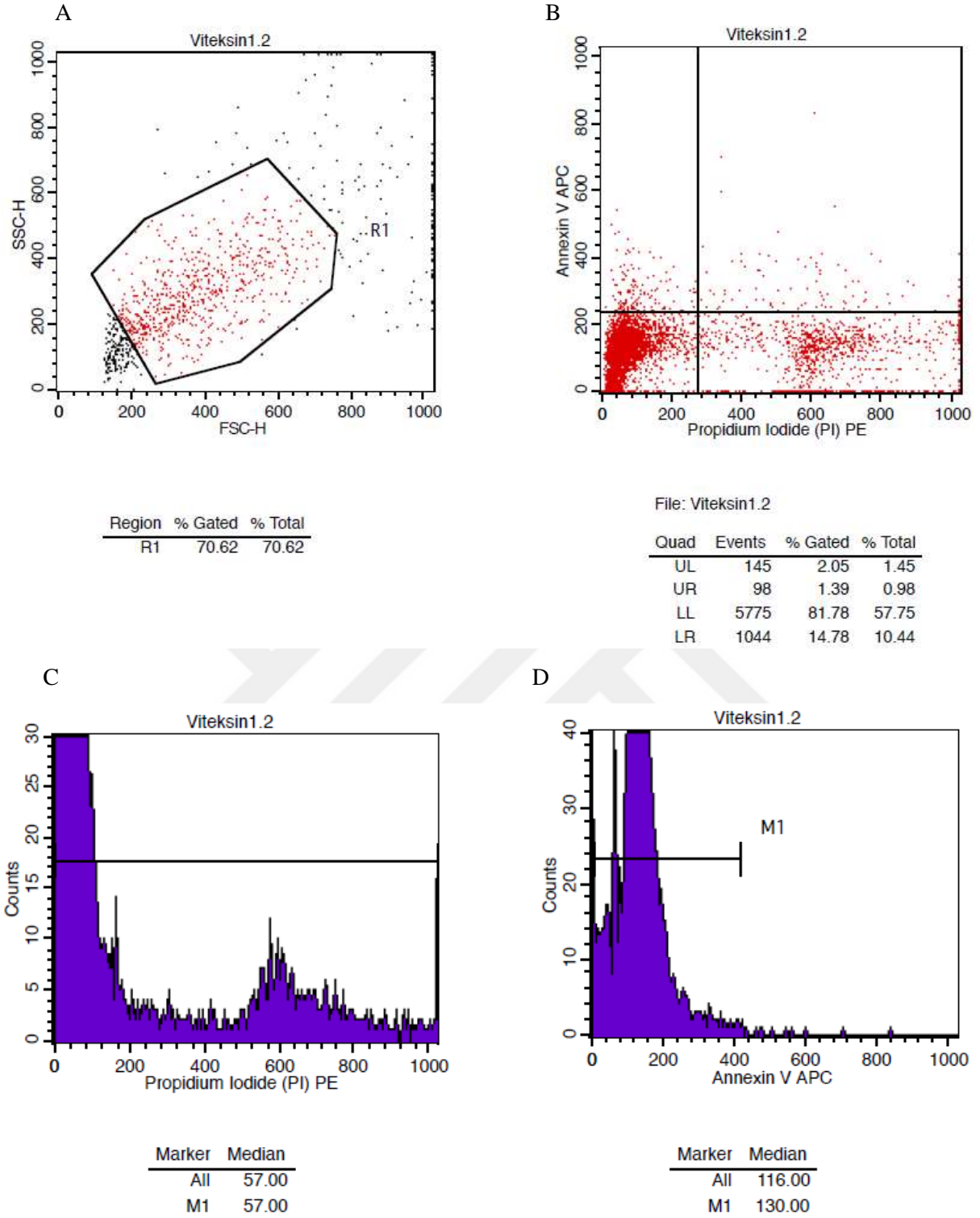
Şekil 4.5. Danusertib1.2 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin-V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



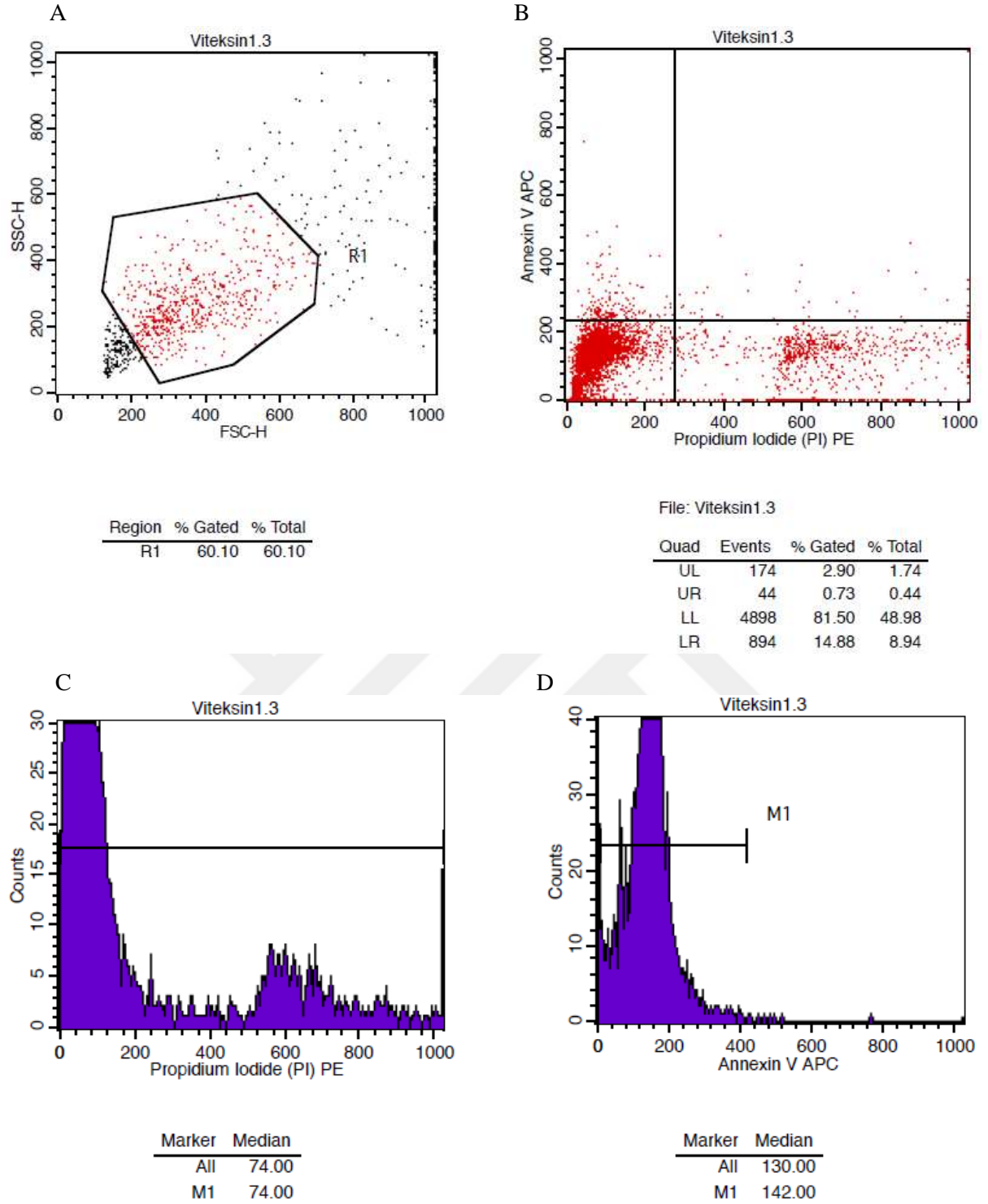
Şekil 4.6. Danusertib1.3 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin-V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



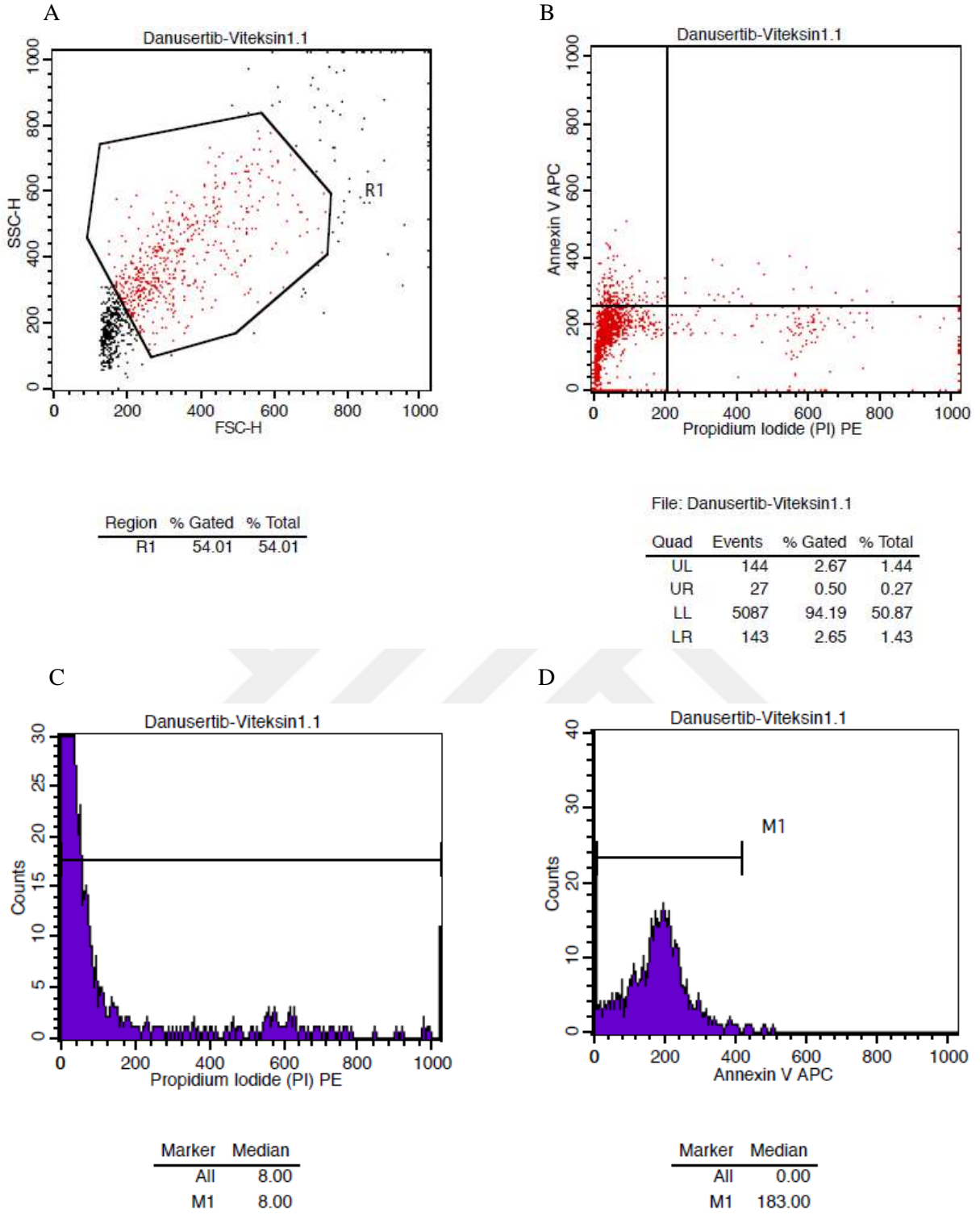
Şekil 4.7. Viteksin1.1 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin -V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



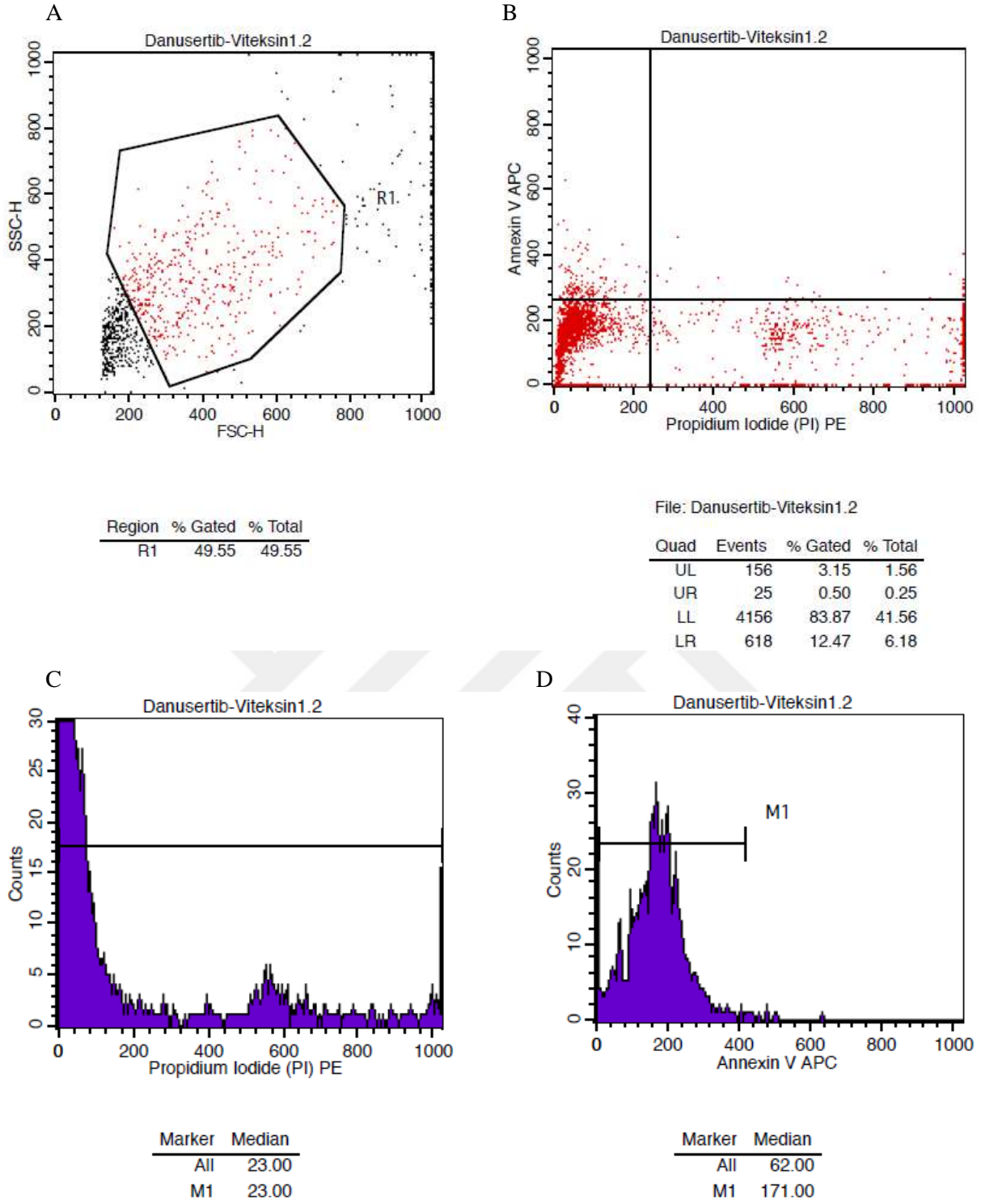
Şekil 4.8. Viteksin1.2 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin -V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



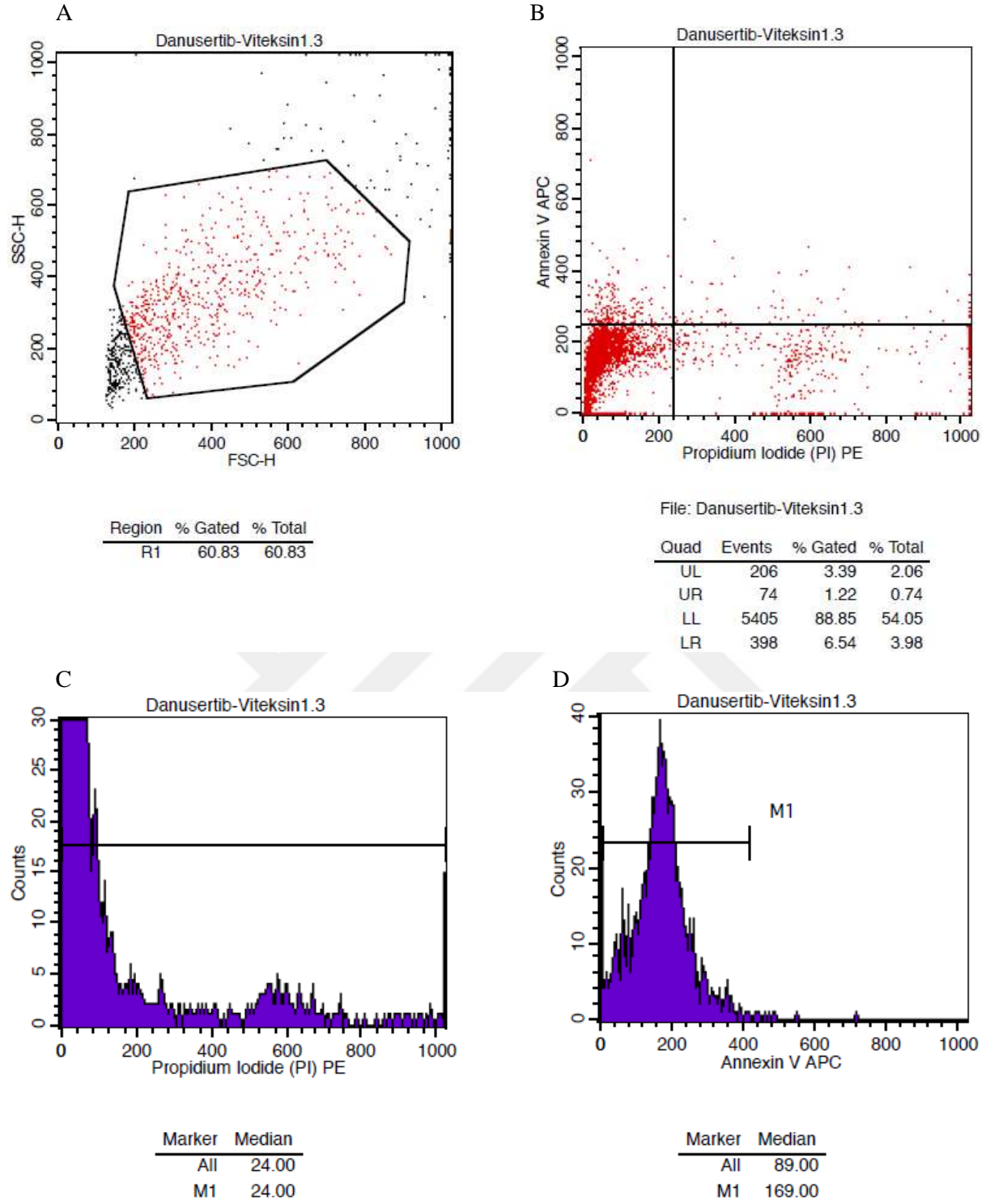
Şekil 4.9. Viteksin1.3 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin -V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



Şekil 4.10. Danusertib-Viteksin1.1 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin-V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



Şekil 4.11. Danusertib-Viteksin1.2 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin-V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.



Şekil 4.12. Danusertib-Viteksin1.3 deney grubunda 48. saat flow sitometri ile analiz sonucu oluşan grafikler. (A) SSC-H ve FSC-H grafiğinde R1 kapısı alınan hücre popülasyon grafiği; (B) APC Annexin-V ve Propidium İodide (PE) grafiğinde hücre Q popülasyonları; (C) PI boyasının, PE filtresinde oluşturduğu histogram grafiği. (D) APC Annexin-V boyasının, APC filtresinde oluşturduğu histogram grafiği.

4.1.3. MCF-7 Hücrelerinde Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi

Gen ekspresyonu, MCF-7 hücrelerinde Apoptoz bağlantılı gen ifade düzeylerinin belirlenmesi MCF-7 hücrelerinden elde edilen total-RNA'lerden cDNA'lar çalışmanın materyal ve metod kısmında verilen protokol işlem sırasına göre sentezlenmiştir. Gen ifade düzeyleri ACTB geni ile normalizasyon sağlanarak ölçüm yapılmıştır.

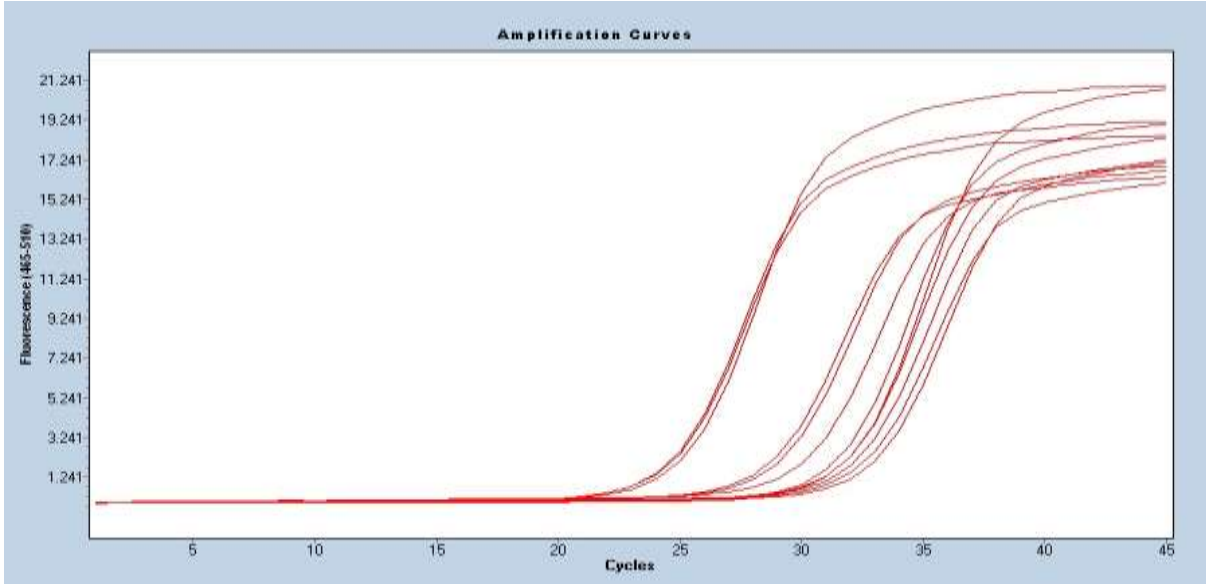
RNA izolasyon protokolündeki işlem sırasına uygun olarak izole edilen RNA'ların kalitesi NanoQ cihazında NanoDrop2000 Software programı ile ölçüm yapılarak belirlendi. RNA kalitesi 1,7-2,0 aralığında olan total RNA'lar işleme alındı. Ölçüm sonucu elde edilen veriler aşağıdaki Tablo 4. 4' de verilmiştir.

Tablo 4.4. MCF-7 hücrelerinin RNA izolasyonu sonrasında NanoQ cihazı ile total RNA kalitesi ve miktar ölçümü (48.saat).

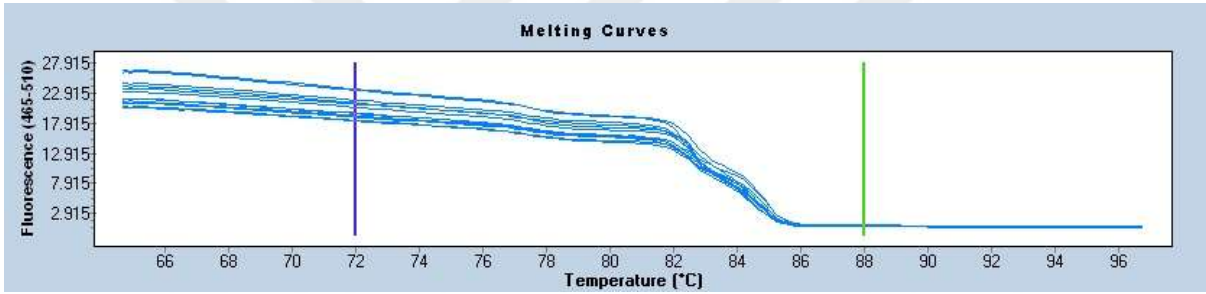
Gruplar	Örnek	260/280 nm	Konsantrasyon ng/µl
Blank (Kör)	RNA	-2,3	-0,10
Kontrol	RNA	2,1	157,3
Danusertib	RNA	2,0	35,70
Viteksin	RNA	1,9	34,10
Danu + Vitex	RNA	2,1	19,20

qRT-PCR metodu kullanılarak hücrede ekspresyon seviyelerine bakılan β -Actin (ACTB), Kaspaz -3, -8, -9 (Casp3, -8, -9) , AURK-B, VEGF genlerine ait Δ CT, $\Delta\Delta$ CT, $2^{-\Delta\Delta$ CT değerleri her gen için tablo şeklinde verilmiştir. Her gen için deneylerin üçlü tekrarlarından elde edilen verilerin ortalamaları alınarak tablolar şeklinde verilmiştir. Her genin Floresan ışımaya grafiği, Erime eğrileri ve Erime pikleri de tablo bilgilerinin sonunda verilmiştir.

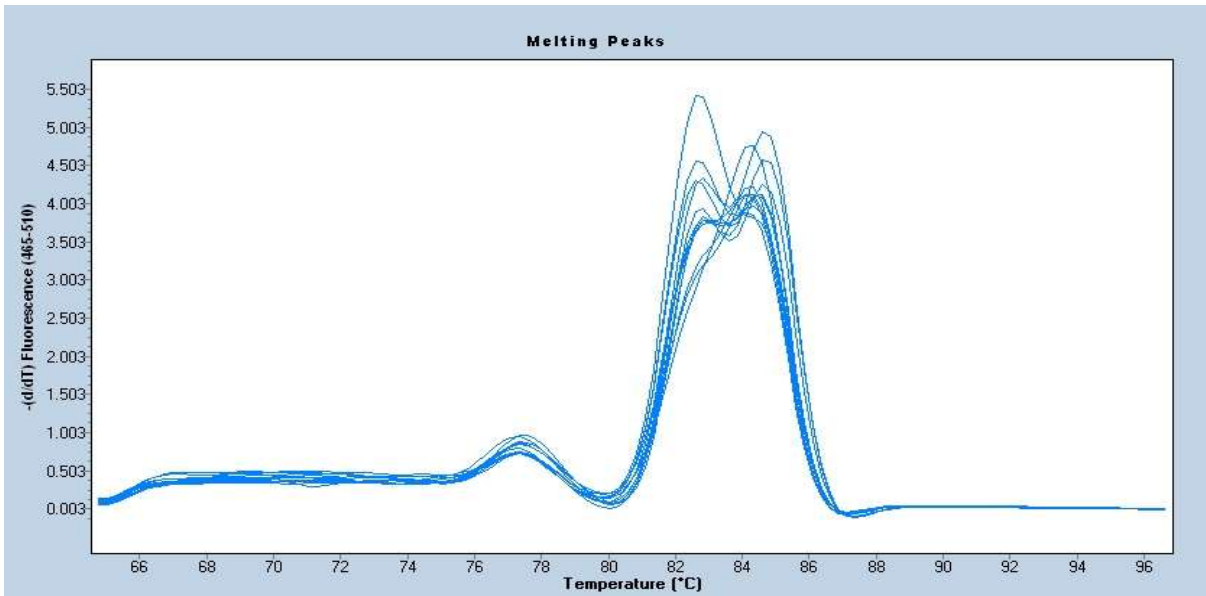
ACTB geni housekeeping bir gen olarak kontrol amacı ile kullanılmıştır. Diğer genler ACTB geni kullanılarak normalize edilmiştir. β -Actin geninin floresan ışımaya grafiği Şekil 4.13'de, erime eğrileri Şekil 4.14'de ve erime pikleri Şekil 4.15'de sırasıyla verilmiştir.



Şekil 4.13. ACTB gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışıma grafiği.



Şekil 4.14. ACTB gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi.



Şekil 4.15. ACTB gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri.

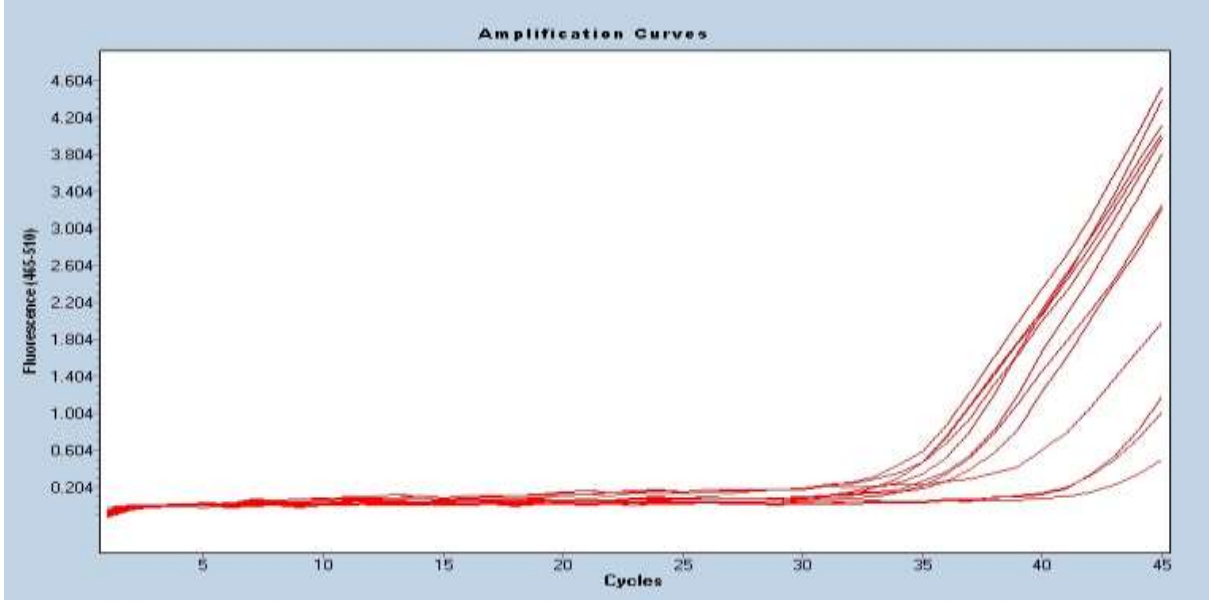
4.1.4. MCF-7 Hücrelerinde Apoptoz İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi

qRT-PCR metodu kullanılarak MCF-7 hücresinde 48. saatte ekspresyon seviyelerine bakılan β -Actin, Kaspaz-3 (Casp3) genine ait Δ CT, $\Delta\Delta$ CT, $2^{-\Delta\Delta$ CT değerleri karşılaştırmalı olarak tablo şeklinde verilmiştir. Deneylerin üçlü tekrarlarından elde verilerin ortalamaları alınarak \pm SD hesaplanmıştır. Veri setlerinin istatistiksel analizi ile P değerleri hesaplanarak tablonun alt satırında olacak şekilde Tablo 4.5’de veriler sunulmuştur. Kaspaz-3 (Casp3) geninin floresan ışımaya grafiği Şekil 4.16’da, erime eğrisi Şekil 4.17’de ve erime piki Şekil 4.18’de tablo bilgilerinin sonunda sırasıyla verilmiştir.

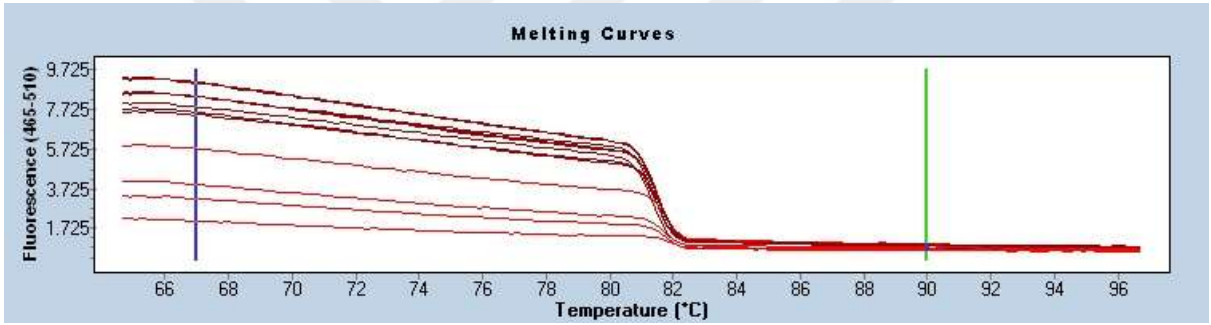
Tablo 4.5. MCF-7 hücrelerinde ACTB ve CASP3 gen ekspresyonu verileri, \pm SD ve P değerleri.

Gruplar	ACTB	CASP3	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
Kontrol	22,70	26,14	3,12	0	1
Danusertib	26,34	35,77	9,44	6,31	0,0126 \pm 0,0015
Viteksin	19,26	35,68	16,42	13,30	0,0002 \pm 0,0003
Danu + Vitex	27,79	40,00	12,21	9,08	0,0019 \pm 0,00005
ACTB- CASP3 gen ekspresyonu veri setinin istatistiksel analiz sonuçları					
P Değeri	Karşılaştırılan İkili Gruplar		P Değeri İstatistiksel Analiz Sonucu		
	Kontrol/Danusertib		$P_{K/D} < 0,0001$		
	Kontrol/Viteksin		$P_{K/V} < 0,0001$		
	Kontrol/Danusertib+Viteksin		$P_{K/D+V} < 0,0001$		
	Danusertib/Viteksin		$P_{D/V} < 0,0001$		
	Danusertib/Danusertib+Viteksin		$P_{D/D+V} = 0,0007$		
	Viteksin/Danusertib+Viteksin		$P_{V/D+V} < 0,0001$		

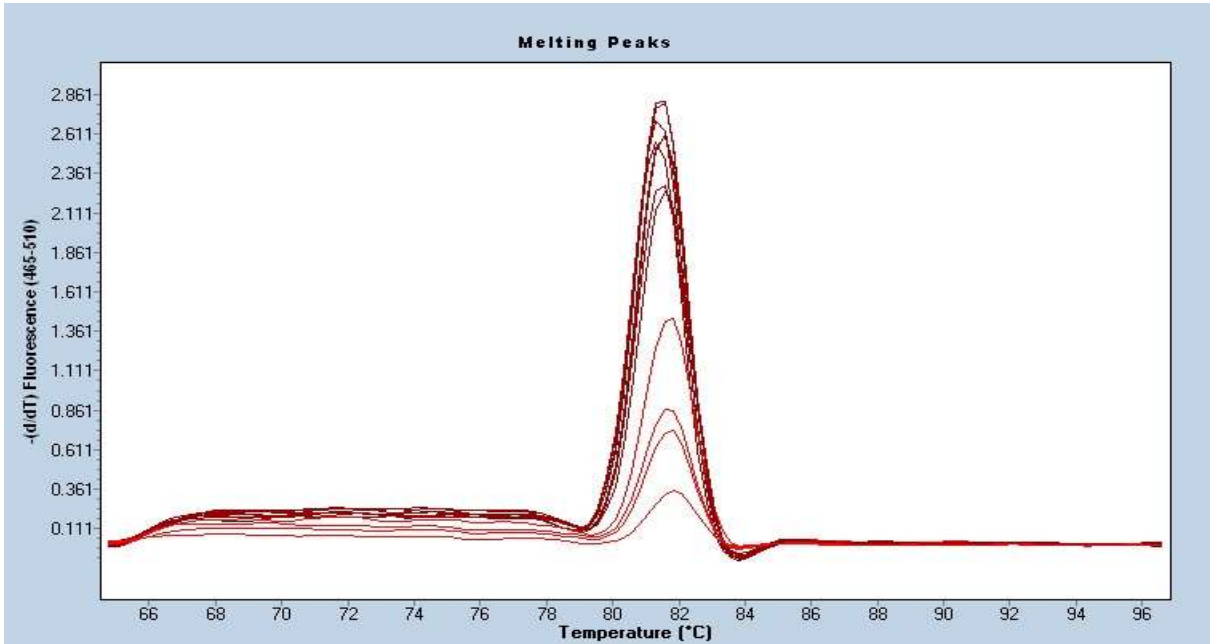
Apoptoz ilişkili Kaspaz-3 gen ifadesinin Tablo 4.5’de verilen qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta$ CT değerlerine göre 48.saatte Danusertib uygulanan deney grubunda (0,0126) kontrol grubu olan ACTB genine (1) göre 0.98 kat azalma, Viteksin uygulanan deney grubunda (0,0002) ACTB genine (1) göre 0,99 kat azalma, Danusertib ve Viteksinin birlikte uygulandığı deney grubunda (0,0019) ACTB genine (1) göre 0.99 kat azalma görülmektedir.



Şekil 4.16. Casp3 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışma grafiği.



Şekil 4.17. Casp3 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi.



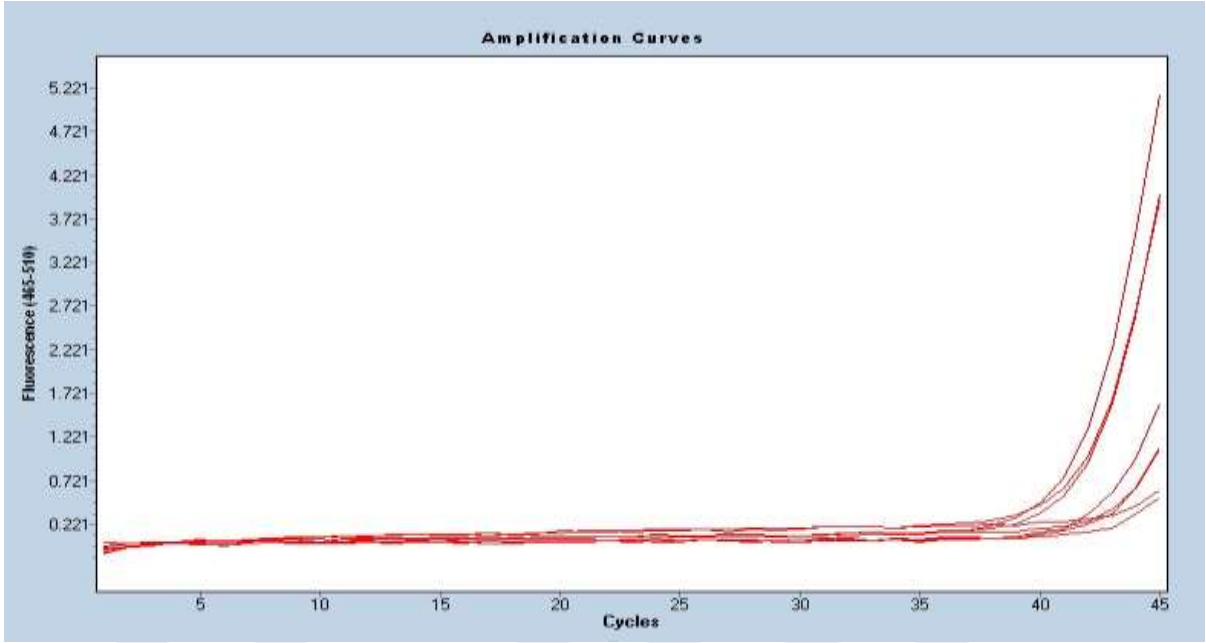
Şekil 4.18. Casp3 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri

qRT-PCR metodu kullanılarak MCF-7 hücresinde 48. Saatte ekspresyon seviyelerine bakılan β -Actin, Kaspaz-8 (Casp8) genine ait Δ CT, $\Delta\Delta$ CT, $2^{-\Delta\Delta$ CT değerleri karşılaştırmalı olarak tablo şeklinde verilmiştir. Deneylerin üçlü tekrarlarından elde verilerin ortalamaları alınarak \pm SD hesaplanmıştır. Veri setlerinin istatistiksel analizi ile P değerleri hesaplanarak tablonun alt satırında olacak şekilde Tablo 4.6’da veriler sunulmuştur. Kaspaz-8 geninin floresan ışıma grafiği Şekil 4.19’da, erime eğrisi Şekil 4.20’de ve erime piki Şekil 4.21’de tablo bilgilerinin sonunda sırasıyla verilmiştir.

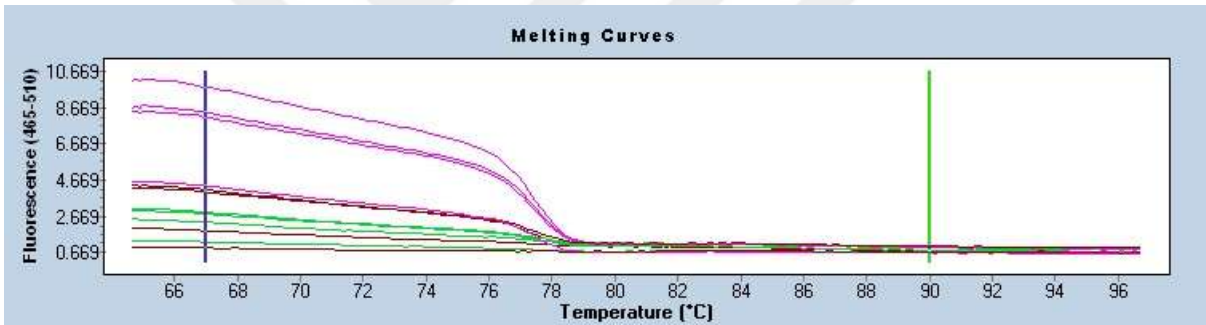
Tablo 4.6. MCF-7 hücrelerinde ACTB ve CASP8 gen ekspresyonu verileri, \pm SD ve P değerleri.

Gruplar	ACTB	CASP8	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
Kontrol	22,70	37,43	14,74	0	1
Danusertib	26,34	40,00	13,66	-1,07	2,3123 \pm 0,8828
Viteksin	19,26	35,40	16,14	1,40	0,4767 \pm 0,4111
Danu + Vitex	27,79	40,00	12,21	-2,53	5,8876 \pm 1,3696
ACTB- CASP8 gen ekspresyonu veri setinin istatistiksel analiz sonuçları					
P Değeri	Karşılaştırılan İkili Gruplar		P Değeri İstatistiksel Analiz Sonucu		
	Kontrol/Danusertib		P _{K/D} : 0,06		
	Kontrol/Viteksin		P _{K/V} : 0,09		
	Kontrol/Danusertib+Viteksin		P _{K/D+V} : 0,003		
	Danusertib/Viteksin		P _{D/V} : 0,03		
	Danusertib/Danusertib+Viteksin		P _{D/D+V} : 0,02		
	Viteksin/Danusertib+Viteksin		P _{V/D+V} : 0,0003		

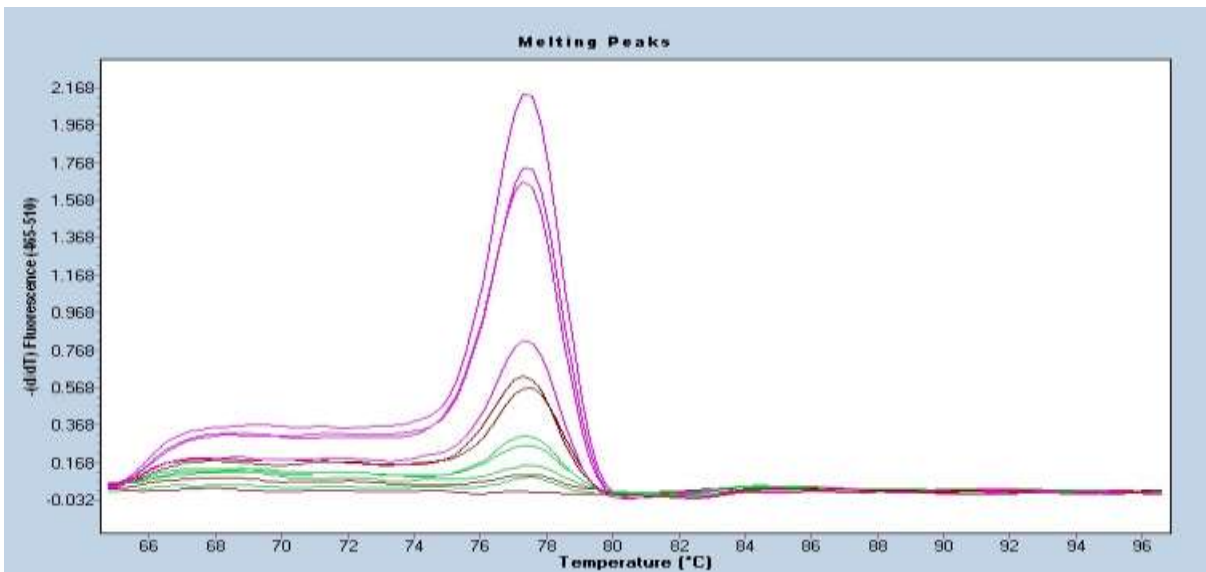
Apoptoz ilişkili Kaspaz-8 gen ifadesinin Tablo 4.6’da verilen qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta$ CT değerlerine göre 48. saatte Danusertib uygulanan deney grubunda (2,3123) kontrol grubu olan ACTB genine (1) göre 2.31 kat artış, Viteksin uygulanan deney grubunda (0,4767) ACTB genine (1) göre 0,52 kat azalma, Danusertib ve Viteksinin birlikte uygulandığı deney grubunda (5,8876) ACTB genine (1) göre 5,88 kat artış görülmektedir.



Şekil 4.19. Casp8 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışımaya grafiği.



Şekil 4.20. Casp8 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi.



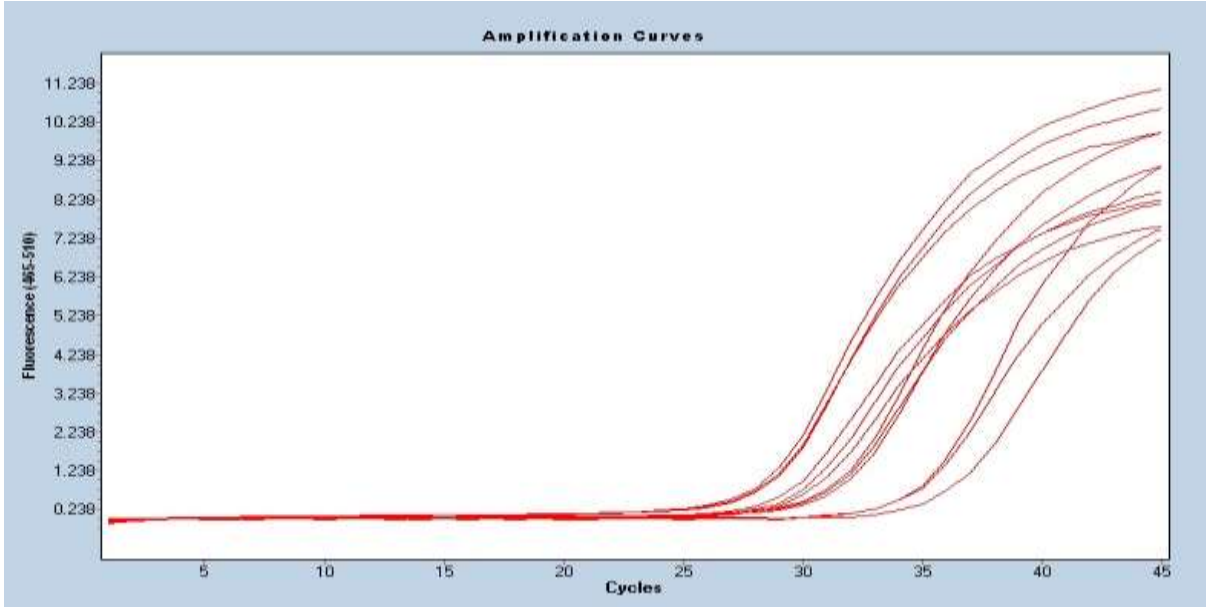
Şekil 4.21. Casp8 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri.

qRT-PCR metodu kullanılarak MCF-7 hücresinde 48. saatte ekspresyon seviyelerine bakılan β -Actin, Kaspaz-9 (Casp9) genine ait Δ CT, $\Delta\Delta$ CT, $2^{-\Delta\Delta$ CT değerleri karşılaştırmalı olarak tablo şeklinde verilmiştir. Deneylerin üçlü tekrarlarından elde verilerin ortalamaları alınarak \pm SD hesaplanmıştır. Veri setlerinin istatistiksel analizi ile P değerleri hesaplanarak tablonun alt satırında olacak şekilde Tablo 4.7’de veriler sunulmuştur. Kaspaz-9 geninin floresan ışımaya grafiği Şekil 4.22’de, erime eğrisi şekil 4.23’de ve erime piki Şekil 4.24’de tablo bilgilerinin sonunda sırasıyla verilmiştir.

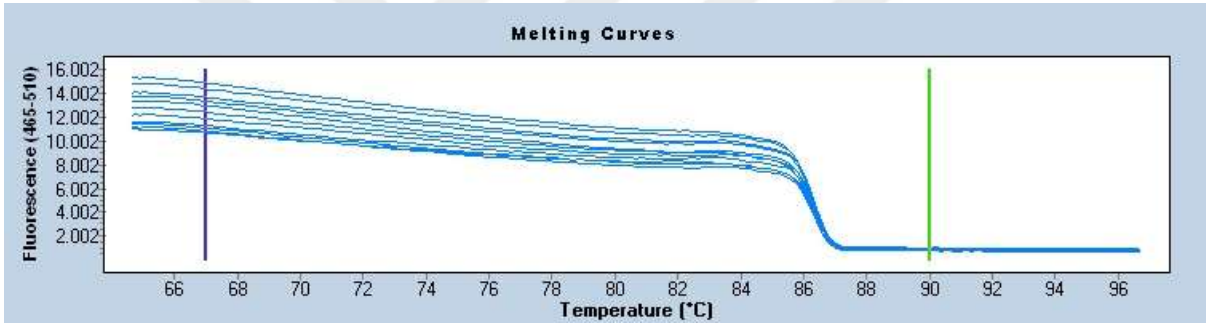
Tablo 4.7. MCF-7 hücrelerinde ACTB ve CASP9 gen ekspresyonu verileri, \pm SD ve P değerleri.

Gruplar	ACTB	CASP9	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
Kontrol	22,70	22,57	-0,12	0	1
Danusertib	26,34	29,29	2,95	3,07	0,1355 \pm 0,0889
Viteksin	19,26	29,56	10,30	10,42	0,0011 \pm 0,0012
Danu + Vitex	27,79	31,08	3,29	3,41	0,0966 \pm 0,0276
ACTB- CASP9 gen ekspresyonu veri setinin istatistiksel analiz sonuçları					
P Değeri	Karşılaştırılan İkili Gruplar		P Değeri İstatistiksel Analiz Sonucu		
	Kontrol/Danusertib		P _{K/D} < 0,001		
	Kontrol/Viteksin		P _{K/V} < 0,0001		
	Kontrol/Danusertib+Viteksin		P _{K/D+V} < 0,0001		
	Danusertib/Viteksin		P _{D/V} : 0,06		
	Danusertib/Danusertib+Viteksin		P _{D/D+V} : 0,51		
	Viteksin/Danusertib+Viteksin		P _{V/D+V} : 0,0004		

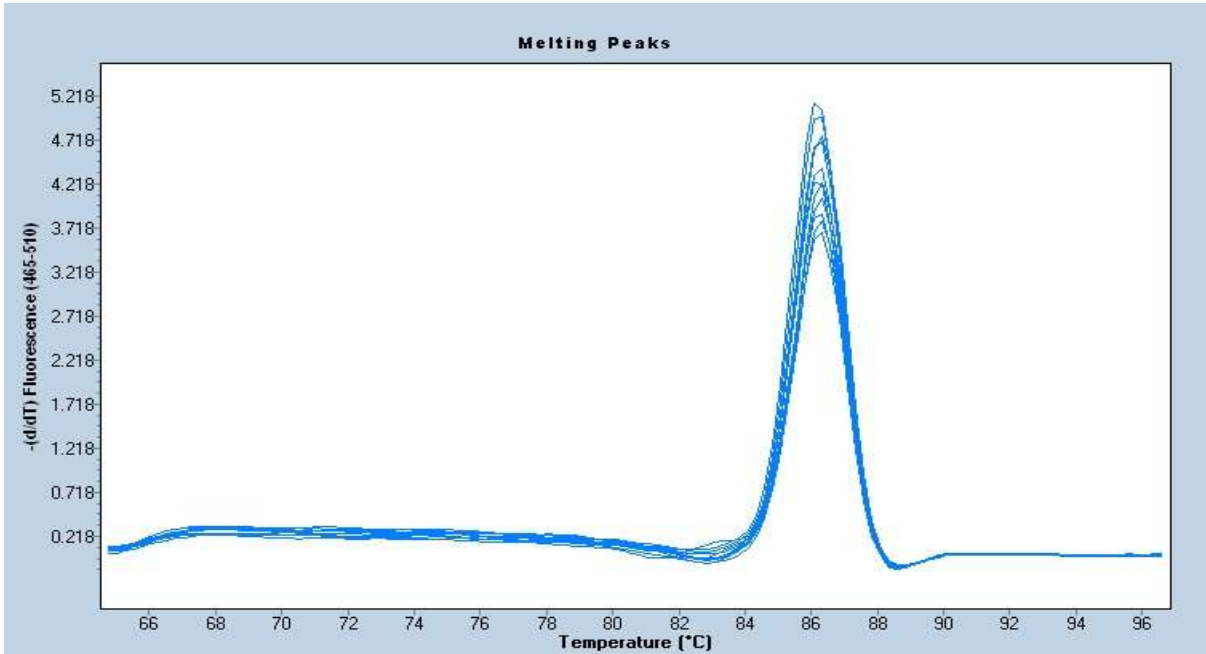
Apoptoz ilişkili Kaspaz-9 gen ifadesinin Tablo 4.7’de verilen qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta$ CT değerlerine göre 48.saatte Danusertib uygulanan deney grubunda (0,1355) kontrol grubu olan ACTB genine (1) göre 0.86 kat azalma, Viteksin uygulanan deney grubunda (0,0011) ACTB genine (1) göre 0,99 kat azalma, Danusertib ve Viteksinin birlikte uygulandığı deney grubunda (0,0966) ACTB genine (1) göre 0.90 kat azalma görülmektedir.



Şekil 4.22. Casp9 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışım grafiği.



Şekil 4.23. Casp9 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi.



Şekil 4.24. Casp9 gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri.

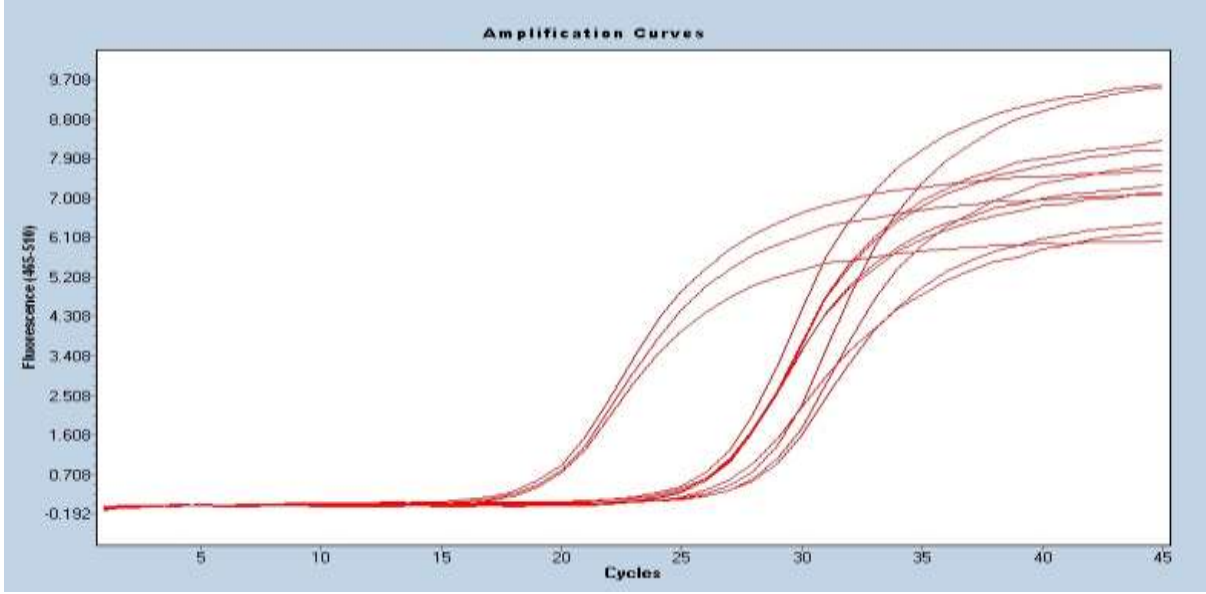
4.1.5. MCF-7 Hücrelerinde Metastaz İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi

qRT-PCR metodu kullanılarak MCF-7 hücresinde 48. saatte ekspresyon seviyelerine bakılan β -Actin, VEGF genine ait Δ CT, $\Delta\Delta$ CT, $2^{-\Delta\Delta$ CT değerleri karşılaştırmalı olarak tablo şeklinde verilmiştir. Deneylerin üçlü tekrarlarından elde verilerin ortalamaları alınarak \pm SD hesaplanmıştır. Veri setlerinin istatistiksel analizi ile P değerleri hesaplanarak tablonun alt satırında olacak şekilde Tablo 4.8'da veriler sunulmuştur. VEGF geninin floresan ışına grafiği Şekil 4.25'de, erime eğrisi Şekil 4.26'da ve erime piki Şekil 4.27'de tablo bilgilerinin sonunda sırasıyla verilmiştir.

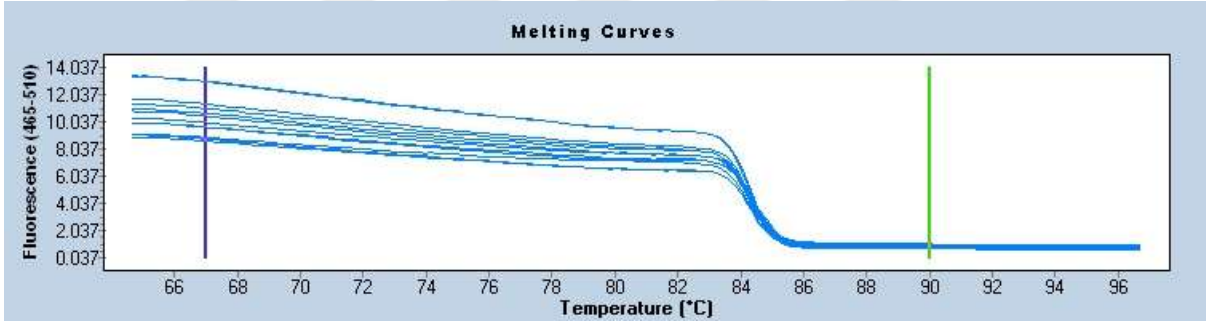
Tablo 4.8. MCF-7 hücrelerinde ACTB ve VEGF gen ekspresyonu verileri, \pm SD ve P değerleri.

Gruplar	ACTB	VEGF	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
Kontrol	22,70	20,12	-2,57	0	1
Danusertib	26,34	20,69	-5,64	-3,07	9,3641 \pm 4,5953
Viteksin	18,44	18,77	0,33	2,90	0,1347 \pm 0,01
Danu + Vitex	27,79	23,48	-4,31	-1,74	3,4920 \pm 1,3331
ACTB- VEGF gen ekspresyonu veri setinin istatistiksel analiz sonuçları					
P Değeri	Karşılaştırılan İkili Gruplar		P Değeri İstatistiksel Analiz Sonucu		
	Kontrol/Danusertib		P _{K/D} : 0,03		
	Kontrol/Viteksin		P _{K/V} < 0,001		
	Kontrol/Danusertib+Viteksin		P _{K/D+V} : 0,03		
	Danusertib/Viteksin		P _{D/V} : 0,02		
	Danusertib/Danusertib+Viteksin		P _{D/D+V} : 0,1		
	Viteksin/Danusertib+Viteksin		P _{V/D+V} : 0,001		

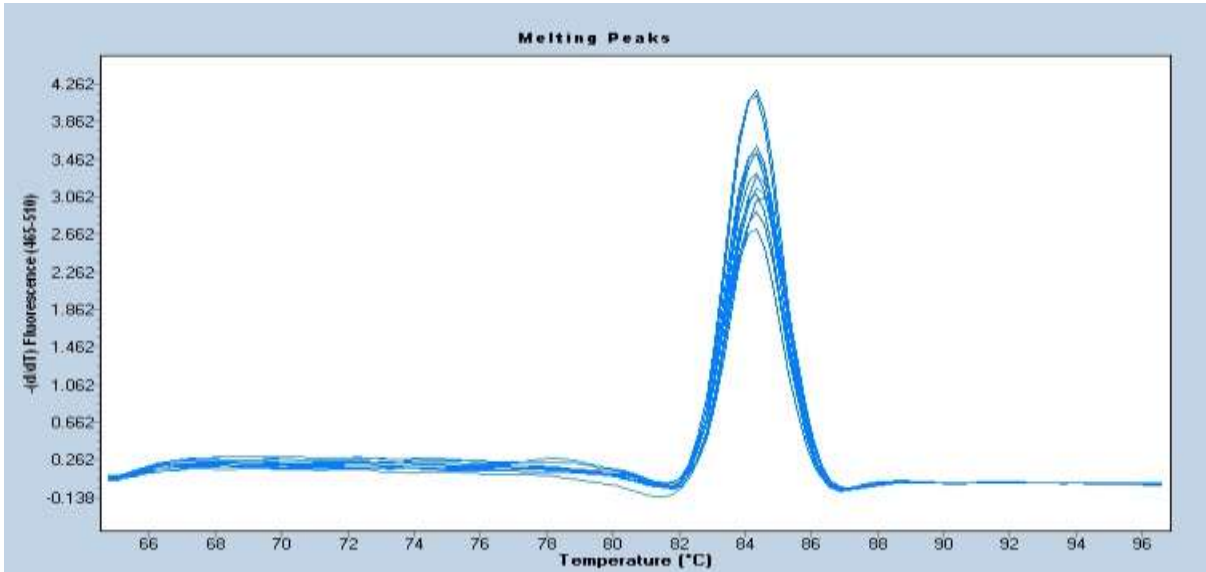
Metastaz ilişkili VEGF gen ifadesinin Tablo 4.8'da verilen qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta$ CT değerlerine göre 48. saatte Danusertib uygulanan deney grubunda (9,3643) kontrol grubu olan ACTB genine (1) göre 9,36 kat artma, Viteksin uygulanan deney grubunda (0,1347) ACTB genine (1) göre 0,86 kat azalma, Danusertib ve Viteksinin birlikte uygulandığı deney grubunda (3,4920) ACTB genine (1) göre 3,49 kat artma görülmektedir.



Şekil 4.25. VEGF gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışımaya grafiği.



Şekil 4.26. VEGF gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi.



Şekil 4.27. VEGF gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri.

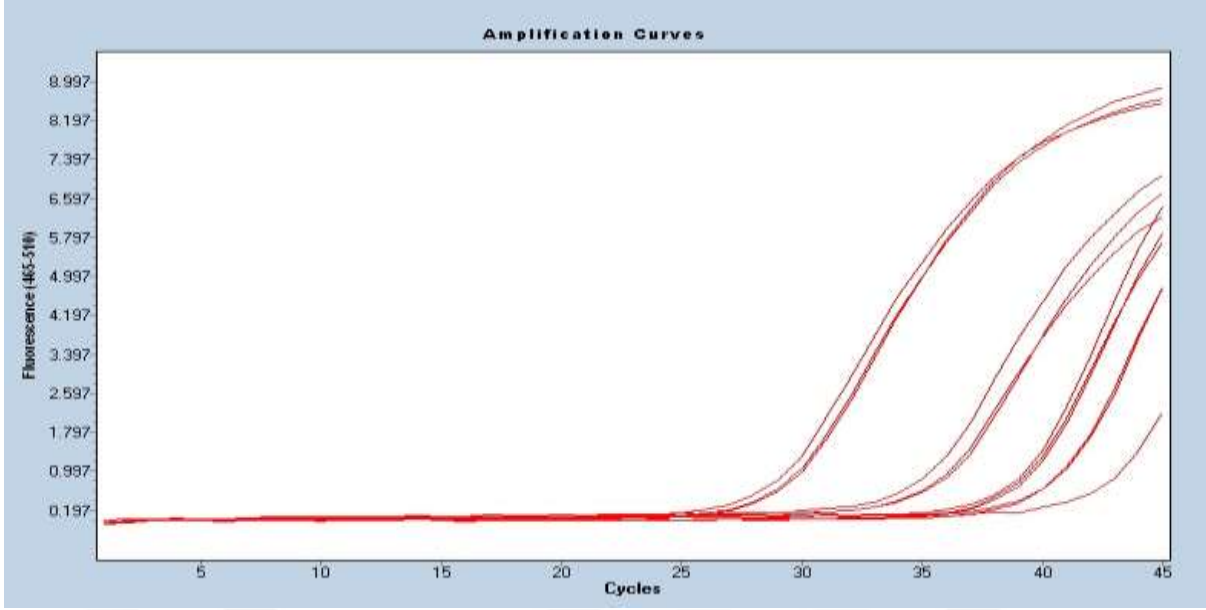
4.1.6. MCF-7 Hücrelerinde Hücre Döngüsü İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin qRT-PCR ile Analizi

qRT-PCR metodu kullanılarak MCF-7 hücresinde 48. saatte ekspresyon seviyelerine bakılan β -Actin, AURK-B genine ait ΔCT , $\Delta\Delta CT$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri karşılaştırmalı olarak tablo şeklinde verilmiştir. Deneylerin üçlü tekrarlarından elde verilerin ortalamaları alınarak $\pm SD$ hesaplanmıştır. Veri setlerinin istatistiksel analizi ile P değerleri hesaplanarak tablonun alt satırında olacak şekilde Tablo 4.9’da veriler sunulmuştur AURK-B geninin floresan ışımaya grafiği Şekil 4.28’de, erime eğrisi Şekil 4.29’da ve erime piki Şekil 4.30’da tablo bilgilerinin sonunda sırasıyla verilmiştir.

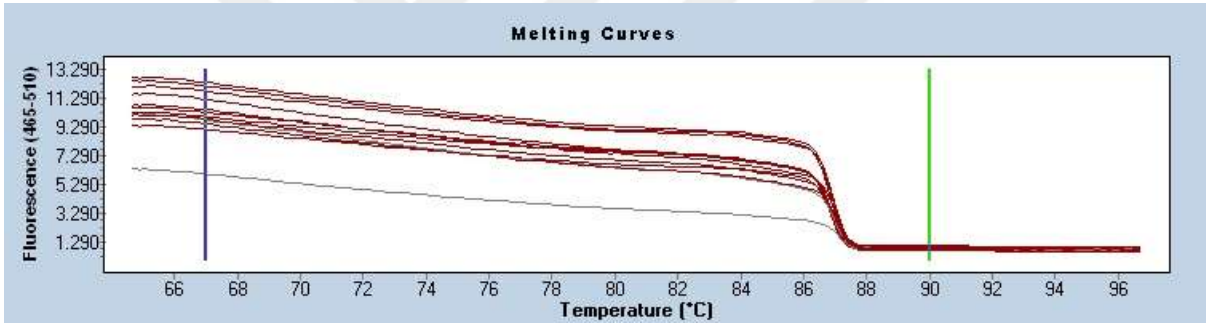
Tablo 4.9. MCF-7 hücrelerinde ACTB ve AURK-B gen ekspresyonu verileri, $\pm SD$ ve P değerleri.

Gruplar	ACTB	AURK-B	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
Kontrol	22,70	29,77	7,08	0	1
Danusertib	26,34	30,87	4,53	-2,55	6,1390 \pm 2,4794
Viteksin	19,26	27,78	8,52	1,44	0,3738 \pm 0,0677
Danu + Vitex	27,79	32,33	4,54	-2,54	5,8808 \pm 1,0303
ACTB- AURK-B gen ekspresyonu veri setinin istatistiksel analiz sonuçları					
P Değeri	Karşılaştırılan İkili Gruplar		P Değeri İstatistiksel Analiz Sonucu		
	Kontrol/Danusertib		P _{K/D} : 0,02		
	Kontrol/Viteksin		P _{K/V} < 0,01		
	Kontrol/Danusertib+Viteksin		P _{K/D+V} : 0,001		
	Danusertib/Viteksin		P _{D/V} : 0,02		
	Danusertib/Danusertib+Viteksin		P _{D/D+V} : 0,88		
	Viteksin/Danusertib+Viteksin		P _{V/D+V} : 0,001		

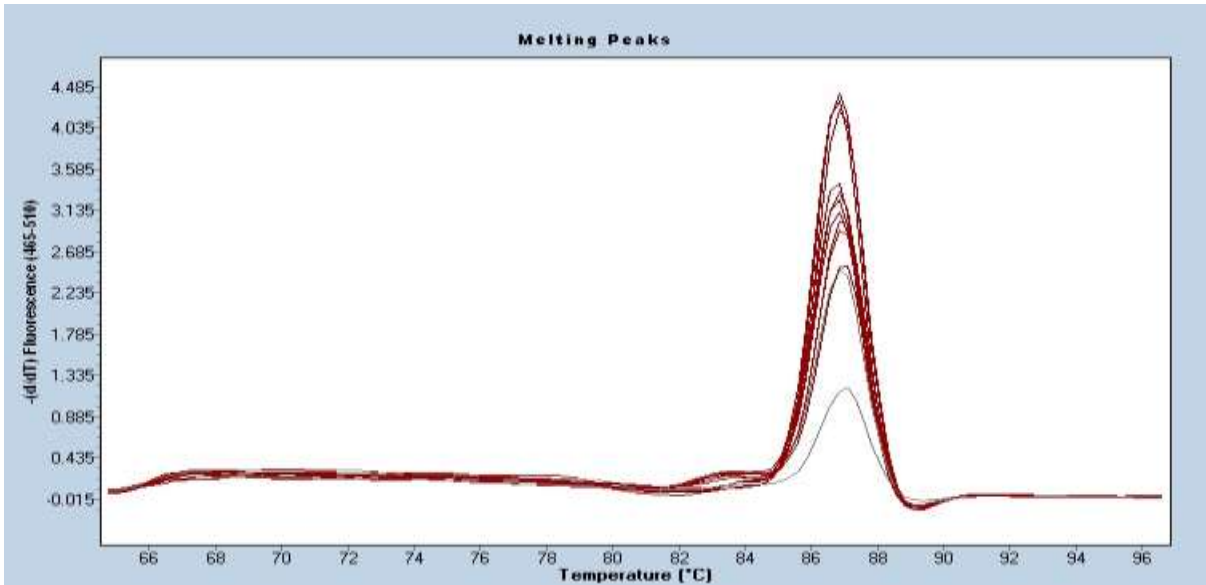
Hücre döngüsü ile ilişkili AURK-B gen ifadesinin Tablo 4.9’da verilen qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine göre 48.saatte Danusertib uygulanan deney grubunda 6.13 kat artma, Viteksin uygulanan deney grubunda 0,63 kat azalma, Danusertib ve Viteksinin birlikte uygulandığı deney grubunda 5,88 kat artma görülmektedir.



Şekil 4.28. AURK-B gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR floresan ışına grafiği.



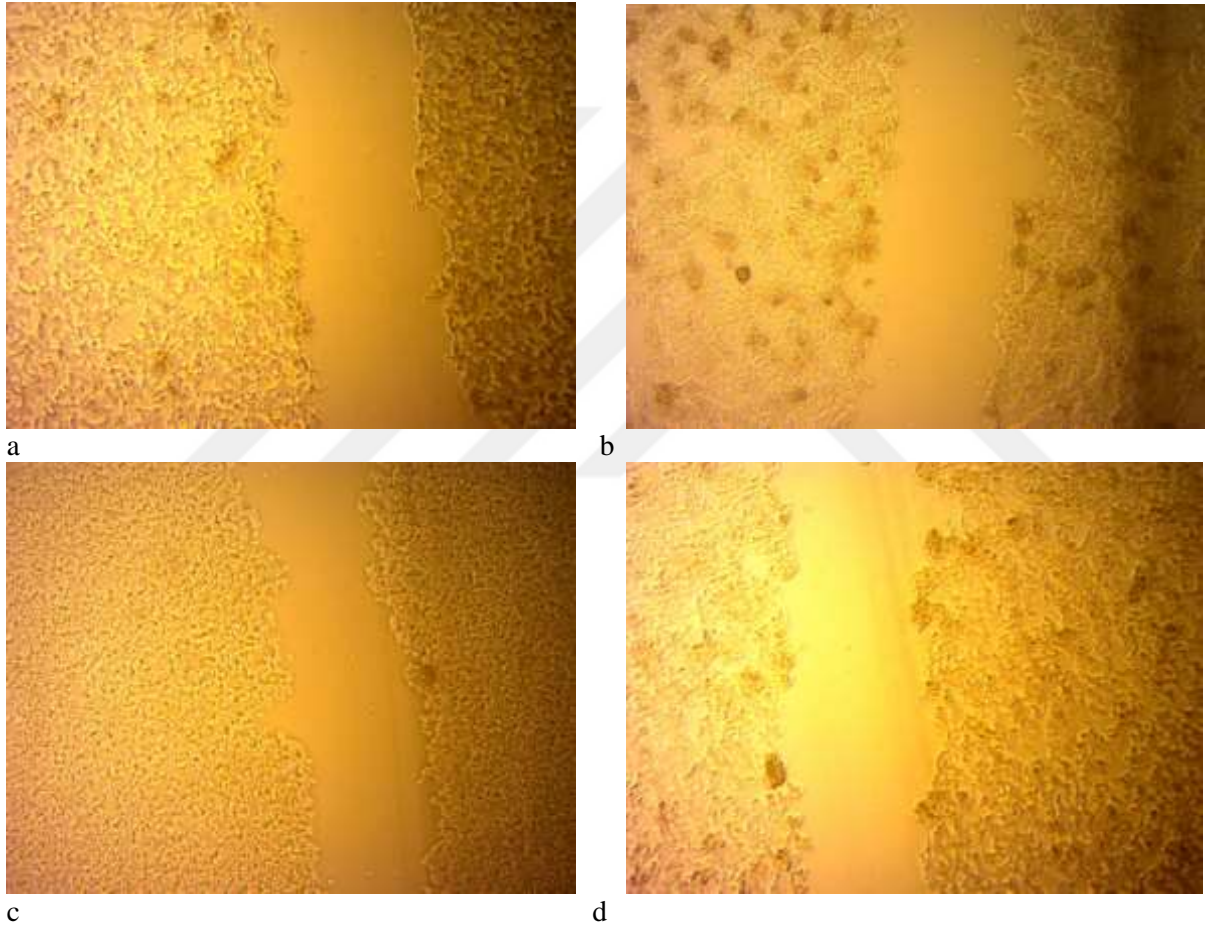
Şekil 4.29. AURK-B gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime eğrisi.



Şekil 4.30. AURK-B gen ifadesinin zamana bağlı qRT-PCR erime pikleri.

4.1.7. Wound Healing Metodu İle MCF-7 Hücrelerinde Migrasyon Analizi

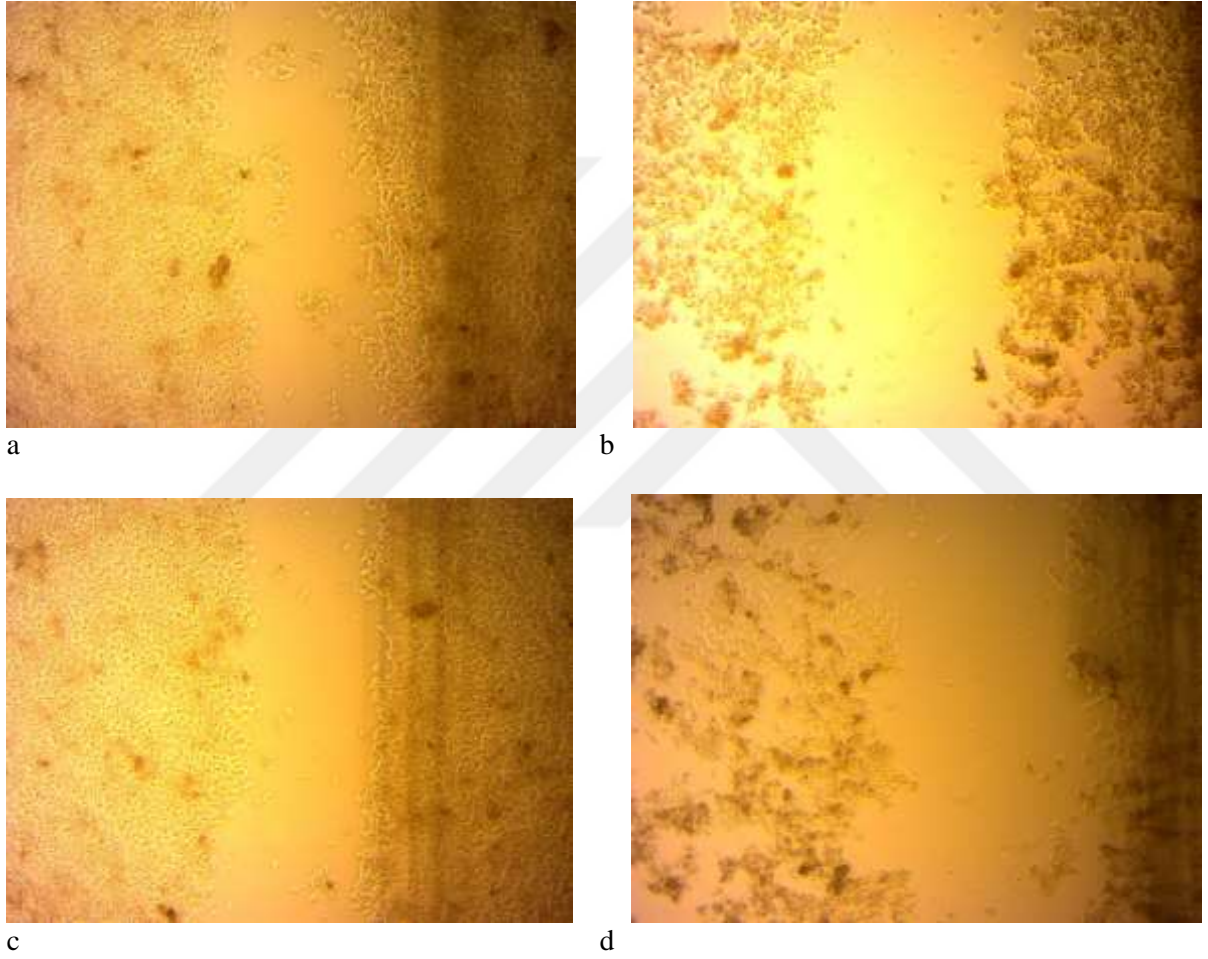
MCF-7 hücrelerinde metastaz aşamasında hücrelerin migrasyonunun incelenmesi için çalışmanın materyal ve metod kısmında verilen 3.7.1.'deki Wound Healing metodunun protokol işlem sırasına uygun inceleme yapılmıştır. Yapılan Wound Healing deney planı ile hücreler 0. saat, 24. saat ve 48. saatlerde mikroskopta görüntülenmiştir. Mikroskopta görüntülenen resimler 0. saate ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.31'de, 24. saate ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.32'de, 48. saate ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.33'de sıralı olacak şekilde aşağıda verilmiştir. Wound Healing deneyinde deney grupları kontrol gruplarıyla ve deney grupları kendi aralarında karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.31.Wound Healing metodu ile MCF-7 hücrelerinde migrasyon analizi deney gruplarının 0. saat mikroskop görüntüleri a-Kontrol grubu, b-Danusertib (0,3 µM), c-Viteksin (1 µM), d-Danusertib + Viteksin grupları (x400 büyütme).

Wound Healing deneyinden 24. saate ait elde edilen veriler şekil 4.32.'de sunulan mikroskopta görüntülenmiş görseller şeklindedir. Bu görsellerden de de belirgin şekilde fark edileceği gibi kontrol grubu (a) hücrelerinde yara açılan bölgeyi kapatmak için hücre göçleri gözlenmiştir. Danusertib doz değeri uygulanan deney grubunda (b) ise yara açılan bölgede kapanmanın olmadığı gözlenmiştir

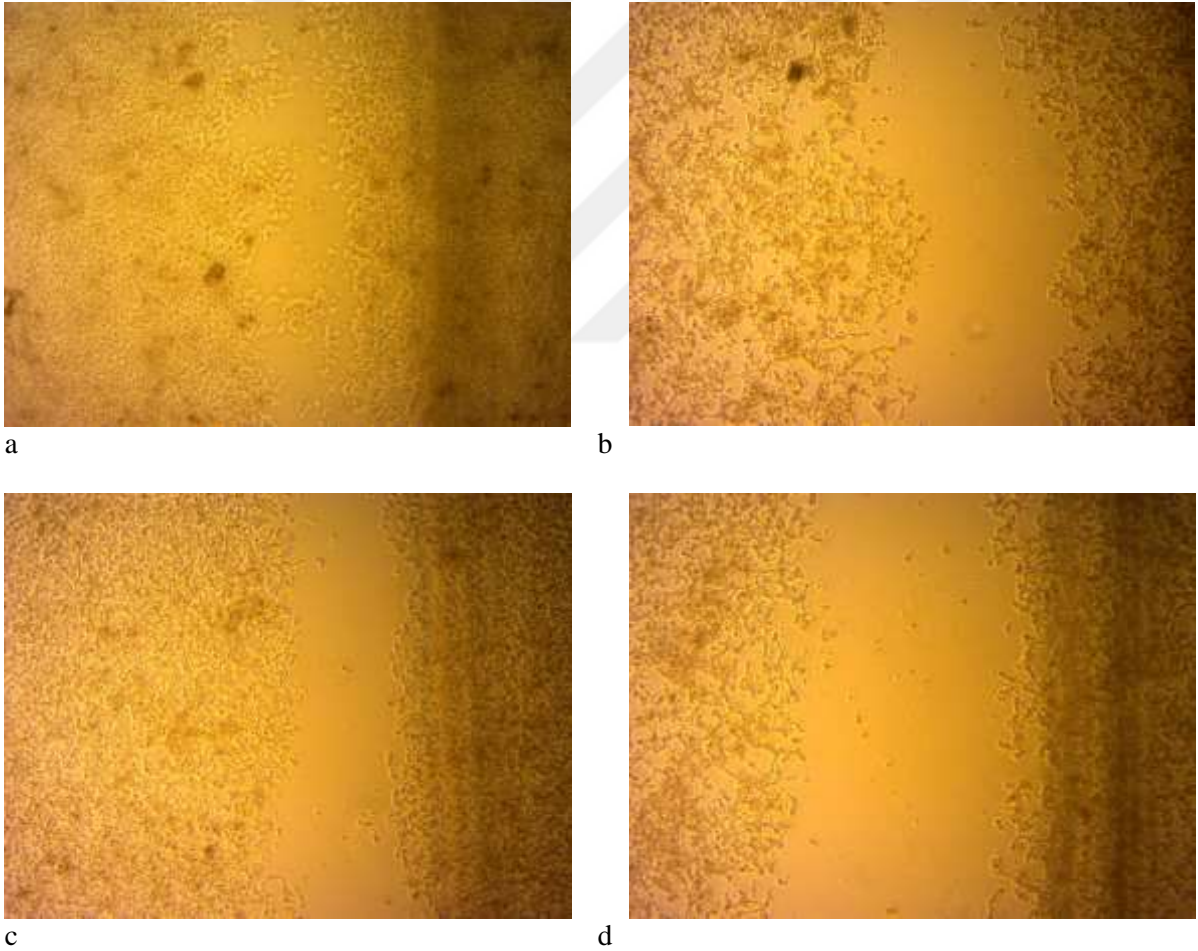
bunun yanısıra hücre sayısında hücre ölümlerine bağlı azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Viteksin doz değeri uygulanan deney grubunda (c) ise yara açılan bölgede kapanmanın olmadığı ve bu deney grubundaki hücre ölümleri Danusertib doz değeri uygulanan deney grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Danusertib-Viteksin doz değerlerinin birlikte uygulandığı deney grubunda (d) yara açılan bölgede kapanma olmadığı ve Danusertib uygulanan deney grubuna (b) benzer şekilde hücre sayısında hücre ölümlerine bağlı olarak canlı hücre sayısında azalma gözlenmiştir. Hücre sayısındaki azalmalara bağlı olarak b ve d görsellerindeki gibi flaskın zemininde yer yer açılmış bölgeler tespit edilmiştir.



Şekil 4.32.Wound Healing metodu ile MCF-7 hücrelerinde migrasyon analizi deney gruplarının 24. saat mikroskop görüntüleri a-Kontrol grubu, b-Danusertib (0,3 μ M), c-Viteksin (1 μ M), d-Danusertib+ Viteksin grupları (x400 büyütme).

Wound Healing deneyinden 48. saate ait elde edilen veriler şekil 4.33.'de sunulan mikroskopta görüntülenen görseller şeklindedir. Görsellerde 48. saate ait inceleme sonucu kontrol grubu (a) hücrelerinde yara açılan bölgeyi kapatmak için hücre göçlerinin 24. saate göre daha yoğun gerçekleştiği ve yara bölgesinde daha belirgin şekilde kapanmalar olduğu gözlenmiştir. Danusertib doz değeri uygulanan deney grubunda (b) ise yara açılan bölgede kapanmanın olmadığı gözlenmiştir ve

24. saatteki görsele göre (b) hücre ölümlerine bağlı hücre sayısında azalmalar tespit edilmiştir. Viteksin doz değeri uygulanan deney grubunda (c) ise yara açılan bölgede kapanmanın olmadığı gözlenmiştir. 48. saat deney grubundaki Viteksin doz değeri uygulanan deney grubunun (c) hücre ölümleri Danusertib doz değeri uygulanan deney grubuna (b) göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Deney gruplarında hem 24. saatte hem de 48. saatte elde edilen verilere göre danusertib doz değeri hücre migrasyonunu engellemekten ziyade hücre sayısında daha çok azalmaya neden olmaktadır. Danusertib ve Viteksin doz değerlerinin birlikte uygulandığı 48. saat deney grubunda (d) yara açılan bölgede kapanma olmadığı gözlenmiştir ve Danusertib uygulanan 24. saat deney grubuna (d) benzer şekilde hücre sayısında hücre ölümlerine bağlı olarak canlı hücre sayısında azalma gözlenmiştir. Hücre sayısındaki azalmalara bağlı olarak hem 24. saat b ve d görsellerinde hem de 48. saat b ve d görsellerinde flaskın zemininde yer yer hücre sayısının azalmasına bağlı açılmış bölgeler tespit edilmiştir.



Şekil 4.33. Wound Healing metodu ile MCF-7 hücrelerinde migrasyon analizi deney gruplarının 48. saat mikroskop görüntüleri a-Kontrol grubu, b-Danusertib (0,3 μ M), c-Viteksin (1 μ M), d-Danusertib+ Viteksin grupları (x400 büyütme).

4.2.Tartışma

Kanser ile ilgili yapılan farklı çalışmalarla Danusertibin ve Viteksin'in antikanserojenik etkileri kanser hücrelerinde incelenmiştir. Bu çalışmada Danusertibin Viteksin ile birlikte etkisinin çalışılmamış olmasından dolayı MCF-7 hücresinde sitotoksik, apoptotik, antimetastatik, antiproliferatif, gen ekspresyonunu inhibe eden etkisi ilk kez *in vitro* koşullarda çalışılmıştır (Yuan vd.,2015).

Bu tez çalışmasında sitotoksisite doz çalışması 24., 48., ve 72. saatlerde çalışılmıştır bu nedenle çalışılan tüm zaman süreleri için sitotoksik doz değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Danusertib sitotoksik IC₅₀ doz değerleri MCF-7 hücrelerinde 24. saat IC₅₀ değeri 3.09 µM, Viteksin için 24. saat IC₅₀ değeri 9,18 µM olarak belirlenmiştir. Yuan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan mide kanseri hücrelerinde Danusertib'in sitotoksik IC₅₀ doz değeri AGS hücresinde IC₅₀ 1,45 µM ve NCI-N78 hücresinde IC₅₀ değeri 2,77 µM bulunmuştur ve hücreler bu doz değerlerinde 24 saat tutulduğunda hücre canlılığı AGS hücrelerinde %39.5-63; NCI-N78 hücrelerinde ise %42-76 şeklinde tespit edilmiştir (Yuan vd., 2015). Zi ve arkadaşlarının İnsan Ovaryum kanseri üzerinde yapılan çalışmasında C13 hücresinde Danusertib 24. saat sitotoksik IC₅₀ değeri 10.40 µM ve A2780cp hücresinde sitotoksik IC₅₀ 19.89 µM bulunmuştur (Zi vd., 2015). Bu tez çalışmasında MCF-7 hücreleri üzerinde Danusertibin 24. saat IC₅₀ doz değeri 3.09 µM olarak kullanıldığında MCF-7 hücresinde canlılık % 10-14 oranında tespit edilmiştir. Danusertib'in bu 3,09 µM doz değerindeki hücre sağ kalım yüzdesinin düşük olduğu gözlenmiştir. Fakat hücre canlılığı gerektiren apoptotik etki ve metastazda hücre migrasyonun incelenmesi için yapılacak çalışmalarda sağlıklı sonuçlar elde edilemeyebilir. MCF-7 hücresi üzerinde yapılması öngörülen çalışmalarda Danusertib'in çalışılacak doz değerleri 0.3 µM'dan daha düşük seçilebilir.

Bu tez çalışmasında MCF-7 hücresi üzerinde Danusertib için 48. saat IC₅₀ doz değeri 3.27 µM, Viteksin için 48. saat IC₅₀ değeri 10,02 µM olarak bulunmuştur. Zi ve arkadaşlarının İnsan Ovaryum kanseri üzerinde yapılan çalışmalarında C13 hücresinde Danusertib 48. saat sitotoksik IC₅₀ değeri 1.832 µM ve A2780cp hücresinde sitotoksik IC₅₀ 3.876 µM bulunmuştur (Zi vd., 2015).

Yapılan bu tez çalışmasında Danusertib için 72. saat IC₅₀ doz değeri 2,77 µM, Viteksin için 72. saat IC₅₀ değeri 5,43 µM olarak bulunmuştur.

Apoptoz ilişkili Casp3 gen ifadesinin Tablo 4.5'da verilen qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine göre 48. saatte Danusertib uygulanan deney grubunda 0.98 kat azalma, Viteksin uygulanan deney grubunda 0,99 kat azalma, Danusertib ve Viteksin'in birlikte uygulandığı deney grubunda 0.99 kat azalma görülmektedir. Yuan ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttiğine göre Danusertib (0.1 µM-0.5 µM aralığında kullandığı dozlar) Kaspaz-3 gen ekspresyonunu AGS ve NC-N78 hücrelerinde iki kattan fazla arttırdığını tespit etmiştir (Yuan vd., 2015).

Apoptoz ilişkili Casp8 gen ifadesinin Tablo 4.6'de verilen qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine göre 48. saatte Danusertib uygulanan deney grubunda 2.31 kat artış, Viteksin uygulanan

deney grubunda 0,52 kat azalma, Danusertib ve Viteksin'in birlikte uygulandığı deney grubunda 5,88 kat artış görülmektedir. MCF-7 hücresinde Danusertibin Caspaz-8'e olan etkisinden dolayı hücreye dış yolak üzerinden etki ettiğini düşündürmektedir.

Apoptoz ilişkili Casp9 gen ifadesinin Tablo 4.7'de verilen qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine göre 48. saatte Danusertib uygulanan deney grubunda 0.86 kat azalma, Viteksin uygulanan deney grubunda 0,99 kat azalma, Danusertib ve Viteksin'in birlikte uygulandığı deney grubunda 0.90 kat azalma görülmektedir. Yuan ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttiklerine göre Danusertib (0.1 μ M-0.5 μ M) Caspaz-3 gen ekspresyonunu AGS ve NC-N78 hücrelerinde 1.5 kat arttırdığını tespit etmiştir (Yuan vd., 2015).

Yeni kan damarı oluşturma yeteneği malign tümörlerin önemli bir özelliğidir. Bu özelliğinden dolayı kanserli hücrelerin buldukları dokularda büyüme ve gelişmelerinin engellenebilmesi ve diğer dokulara metastaz yapmasının engellenebilmesi için anjiogenezi tetikleyen genlerin ekspresyonunu azaltan veya tamamen inhibe eden gen ve molekül grupları kanser tedavisinin önemli bir hedefi haline gelmiştir. Metastaz ilişkili VEGF yolağını inhibe edebilen ve VEGF geninin ekspresyonunu azaltabilen ajanların tespit edilebilmesi kanser tedavisinin önemli bir hedefi haline gelmiştir (Angelo, 2007; Fernandez, 2022). Bu tez çalışmasında metastaz ilişkili VEGF gen ifadesinin Tablo 4.8'da verilen qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine göre 48. saatte Danusertib uygulanan deney grubunda sadece Viteksin uygulanan deney grubunda 0,86 kat azalma tespit edilmiştir. MCF-7 hücrelerinde Danusertib ve Viteksin'in birlikte uygulandığı deney grubunda 3.49 kat artma görülmektedir. Danusertib VEGF gen ifadesi üzerinde Viteksin'in gösterdiği etkiye benzer etki gözlenmemiştir.

Viteksin grubunun VEGF gen ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $0,1347\pm 0,01$ ($P_{CV} < 0,001$) tespit edilmiştir. MCF-7 hücrelerinde Viteksin'in PCR sonuçlarına göre VEGF gen ekspresyonunu azaltması ve Wound Healing metodunda hücre migrasyonunu azaltıcı etki göstermesi Viteksin'in antimetastatik potansiyelinin olduğunu düşündürmektedir. Daha önce yapılmış çalışmalarda da Viteksin'in tümör hücresi göçünü ve proliferasyonunu inhibe etme potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (Zhao, 2020, Alexander&Halmos, 2018). Öztürk'ün bildirdiğine göre, CFPAC-1 pankreas kanseri hücrelerinde Viteksin ekstraktı uygulanan 48. saat deney gruplarında VEGF gen ekspresyon düzeyi yaklaşık olarak % 40 oranında düşüş göstermiştir VEGF geni ekspresyon düzeylerine göre, etkisi az da olsa CFPAC-1 hücrelerinde anjiyogenezi bir miktar baskılayabileceği düşünülmüştür (Öztürk, 2007). Li vd., (2022) bildirdiğine göre, Viteksin tripl negatif meme kanseri (TNBC) üzerinde hem *in vivo* ve hem *in vitro* koşullarda antiproliferatif, hücre migrasyonunu inhibe eden potansiyeli olduğunu belirtmektedirler. Zhao ve arkadaşlarının Over karsinomalardan önemli olan SKOV-3 hücrelerinde Viteksin ile tedavi edilen hücrelerde invazyon yeteneğinin azaldığı tespit edilmiştir (Zhao vd., 2020). Bu tez çalışmasından Viteksin ile ilgili elde edilen bulgular Viteksinin etki mekanizmalarının anlaşılması için literatürde bilgi birikimine katkı getirici niteliktedir.

Liu ve ark. çalışmalarında belirttiklerine göre malign tümörlerin oluşumunda ve gelişiminde güçlü bir etkiye sahip olduğu tespit edilen hücre döngüsü ilişkili AURK-B mitozun ana düzenleyici

molekül grubundan olup kanser hücrelerinde sıklıkla aşırı eksprese edilmektedir. Daha önceki birkaç çalışmaya göre, AURKB ekspresyonundaki değişiklikler hücre mitozunun başarısızlığına yol açarak poliploidlerin üretilmesine neden olabilmektedir aynı zamanda malign tümörlerin ortaya çıkması için bir ön koşul olarak kabul edilmektedir. AURKB sıklıkla invaziv duktal karsinom tipi meme kanseri dokularında anormal derecede yüksek oranda eksprese edilmektedir (Liu vd., 2022). Aurora kinazlar ile ilgili yapılan pek çok çalışma projesinde literatüre eklenen bilgiler Aurora kinazların aktivite ve ekspresyonundaki sapmalar bir çok kanser türünün patogeneğinde rol oynadığını göstermektedir (Zi vd., 2015). Bu tez çalışmasında hücre döngüsü ile ilişkili AURK-B gen ifadesinin Tablo 4.9’de verilen qRT-PCR sonuçları $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerine göre 48. saatte Danusertib uygulanan deney grubunda AURK-B ekspresyonunda 6.13 kat artma, Viteksin uygulanan deney grubunda AURK-B ekspresyonunda 0,63 kat azalma, Danusertib-Viteksin’in birlikte uygulandığı deney grubunda AURK-B gen ekspresyonunda 5,88 kat artma görülmektedir. Viteksin tek başına deney gruplarına uygulandığında MCF-7 hücreleri üzerinde AURKB gen ekspresyonunu azaltıcı etki göstermektedir. Bu azalma viteksinin hücre döngüsü üzerinden antikanserojenik potansiyelinin olabileceğini düşündürmekle birlikte yapılması öngörülen sonraki çalışmalar içinde hedef molekül haline getirmektedir. Viteksin-Danusertib birlikte uygulanan gruplarda AURKB ekspresyonunda azalma tespit edilememiştir.

Tümörlerde apoptoz yolaklarını tetikleyen terapötik ajanların kanser tedavisi için güçlü birer araç oldukları düşünülmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında Danusertib’in ve Viteksin’in MCF-7 hücresi üzerindeki antikanserojenik etkisini belirlemek APC Annexin-V/PI boyama tekniği ile flow sitometri cihazında apoptotik etkisine bakılmıştır. Bu metod ile elde edilen verilere göre MCF-7 hücreleri üzerinde Danusertibin (0.3 μ M) ve Viteksin’in (1 μ M) apoptotik etkisinin deney gruplarında; kontrol grubunda erken apoptoza (Q1) uğrayan hücreler %0.70, Danusertib uygulanan hücre gruplarında erken apoptoza uğrayan hücreler (Q1) %3.15, Viteksin uygulanan hücre gruplarında erken apoptoza uğrayan hücreler (Q1) %2.24’dür. Apoptoz yüzde değerleri düşük olmasına rağmen deney grupları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında P değerleri anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). P değerinin 0.05 den küçük olması bu çalışmada kullanılan Viteksin ve Danusertib doz değerlerinin düşük düzeyde primer apoptotik etkide bulunduğunu göstermektedir.

Yuan vd.,(2015) bildirdiğine göre Danusertib (0.1-0.5 μ M) doz değerleri Kaspaz-3 ifade düzeyini 2 kat, Kaspaz-9 gen ifade düzeyini 1.5 kat arttırarak hücreyi mitokondriyal yolak üzerinden apoptoza yönlendirdiği ifade edilmiştir. Zi vd.,(2015) bildirdiğine göre, Danusertib 48. saat apoptoz değeri kontrol grubuna göre Ovaryum kanseri hücrelerinden C13’ de 2.4 kat ve A42780cp hücrelerinde ise 7.9 kat artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Kırbıyık’ın yaptığı çalışmada bildirdiğine göre, Danusertib CFPAC-1 hücrelerinde apoptotik etki gösterirken Mia-Paca hücrelerinde apoptotik etki göstermemektedir (Kırbıyık, 2018). Danusertib ile ilgili yapılan çalışmalarda kanser hücreleri üzerinde güçlü bir apoptotik etkiye sahip olduğu belirlenmiş olmasına rağmen bazı hücre çeşitlerinde apoptotik etkisi tespit edilememiştir. Bu durum Danusertibin kanser tipine özgül olduğunu düşündürmektedir. Danusertib Pan-Aurora Kinaz inhibitörü olarak Aurora Kinaz-A, -B ve -C

üzerinden farklı sinyal yolları üzerinden etki etmektedir (Colotta & Mantovani, 2008). Danusertibin antikanserojenik potansiyelinin tam anlaşılabilmesi için çok daha fazla sayıda kanser hücre tiplerinde benzer çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Metastazda MCF-7 Hücrelerinin migrasyonu üzerinde Danusertib ve Viteksin'in ayrı ayrı ve Danusertib-Viteksin doz değerleri birlikte uygulandığında 48. saat deney grubunda yara açılan bölgede kapanma olmadığı gözlenmiştir ve qRT-PCR sonuçlarından VEGF gen ekspresyon seviyesini sadece viteksin uygulanan grupta dikkate değer ölçüde düşmüş olması metastazda hücre migrasyonun engellenmesinde Viteksin'in etkisinin olduğunu düşündürmektedir.



SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, MCF-7 hücreleri üzerinde Pan-Aurora kinaz inhibitörü olan Danusertib ve Viteksin'in antikanserojenik etkisi araştırılmıştır. Danusertib ve Viteksin'in MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojenik etkisine APC Annexin-V /PI boyama metodu, qTR-PCR metodu, Wound Healing metodu ile incelenerek bakılmıştır.

Sitotoksosite çalışmasında Danusertib için tespit edilen 3,9 μM doz değerinin hücreler için oldukça yüksek bir doz değeri olduğu büyük oranda hücre ölümlerine neden olduğu görülmüştür. Danusertib için 0,3 μM yeni doz değeri belirlenerek kullanılmış ve çalışmalar tamamlanmıştır. Danusertib için doz değeri MCF-7 hücresi ile yapılacak çalışmalarda $IC_{50} < 0,3 \mu\text{M}$ doz değerleri kullanılabilir. Daha yüksek doz değerleri büyük oranda hücre ölümlerine neden olduğu için hücre canlılığı gerektiren metastazda hücre migrasyonu incelenen Wound Healing metodunda Danusertibin etki ettiği hücre ölüm yolağının tespiti için yapılan apoptoz analizlerinden sağlıklı sonuçlar almayı zorlaştırmaktadır. Sitotoksosite çalışmalarından elde edilen Viteksin doz değeri de logaritmik olarak bir doz düşük değeri olan 1 μM kullanılmıştır. Viteksin'in yeni doz değerleri için yapılacak yeni çalışmalar ile literatüre katkı sağlanabilir.

qRT-PCR metodu ile MCF-7 hücrelerinde Danusertib (0.3 μm) ve Viteksin'in (1 μM) ayrı ayrı ve birlikte etkisini incelemek için apoptotik genlerden Kaspaz-3, -8, -9 genlerinin ekspresyon düzeyine, metastazda hücre migrasyonu ile ilişkili VEGF gen ekspresyon düzeyine ve hücre yaşam döngüsünde mitotik evrede etkili olan AURK-B geni ekspresyon düzeyine bakılmıştır. qRT-PCR analizi ile elde edilen gen ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ 'deki artma (\uparrow) ve azalma (\downarrow) oranlarına ait sonuçlar aşağıda Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1. qRT-PCR analizi ile elde edilen gen ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ 'deki artma (\uparrow) ve azalma (\downarrow) oranları.

GENLER	GRUPLAR		
	Danusertib	Viteksin	Danusertib + Viteksin
Casp3	0.98 \downarrow	0.99 \downarrow	0.99 \downarrow
Casp8	2.31 \uparrow	0.52 \downarrow	5,88 \uparrow
Casp9	0.86 \downarrow	0.99 \downarrow	0.90 \downarrow
VEGF	9.36 \uparrow	0,86 \downarrow	3,49 \uparrow
AURK-B	6.13 \uparrow	0.63 \downarrow	5.88 \uparrow

Tablo 5.1'deki verilere göre, Kaspaz-3 gen ekspresyon seviyesinde hem Danusertib hem Viteksin ayrı ayrı ve Danusertib-Viteksin birlikte uygulandığı deney gruplarında artma tespit edilememiştir. Kaspaz-8 geni ekspresyon seviyesinde Danusertib ayrı uygulanan ve Danusertib-Viteksin birlikte uygulanan deney gruplarında 2.31 ve 5.88'lik artış tespit edilmiştir bu elde edilen veri

Danusertib'in apoptoz yolağından Kaspaz-8 üzerinden etki ettiğini düşündürmektedir. Kaspaz-8, apoptoz dış yolağında rol alan bir moleküldür. Viteksin'in tek başına uygulandığı deney grubunda Kaspaz-8 gen ekspresyonunda artma tespit edilememiştir, 0.52'lik azalma tespit edilmiştir. Kaspaz-9 gen ekspresyon seviyesinde hem Danusertib hem Viteksin ayrı ayrı ve Danusertib -Viteksin birlikte uygulanan deney gruplarında elde edilen verilerde artma tespit edilememiştir. Apoptoz yolaklarının aktivasyonunda Kaspazların gen ifadelerinin seviyesinde artma olması beklenir fakat elde veriler değerlendirildiğinde Kaspaz-3 ve Kaspaz -9 gen seviyelerinde artış olmadığı görülmektedir.

qTr-PCR metodu ile elde edilen PCR verileri analiz edildiğinde Danusertib tek başına ve Danusertib-Viteksin birlikte uygulanan deney gruplarında VEGF gen ekspresyon seviyesinde artma tespit edilirken, Viteksin'in tek başına uygulandığı grupta VEGF gen ekspresyon seviyesinde 0,86'lik düşme tespit edilmiştir. Viteksin tarafından hücre migrasyonunun baskılanması ileri aşamadaki hastalarda kanser metastazını frenlemek için umut verici bir ajan haline getirebileceği düşünülmektedir. Viteksin MCF-7 kanseri hücrelerinde metastazı önleyen bir antikanser ilacı temsil edebileceği eldeki veriler doğrultusunda düşünülmektedir.

AURK-B gen ekspresyon seviyesinde Danusertib ve Danusertib -Viteksin birlikte uygulanan deney gruplarında artma tespit edilirken, Viteksin'in tek başına uygulandığı grupta AURKB gen ekspresyon seviyesinde 0,63'lük düşüş tespit edilmiştir.

MCF-7 hücrelerinde hücre ölüm yolaklarında Danusertib ve Viteksin'in etkisini incelemek için flow sitometri cihazı ile yapılan apoptoz analizinde Viteksin (1 µM) apoptotik etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında primer apoptoz 2.24 ± 0.59 ($P_{KV} < 0.05$). Danusertib-Viteksinin birlikte apoptotik etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında primer apoptoz $3,07 \pm 0,37$ ($P_{KD+V} < 0,05$). Danusertib'in ve Viteksin'in uygulanan gruplarda sekonder apoptoz tespit edilememiştir ($P > 0,05$).

Metastazda MCF-7 hücrelerinin migrasyonunu tespit edebilmek için Wound Healing metodu kullanılmıştır. MCF-7 hücrelerinde kontrol gruplarında 24. ve 48 saatlerde hücrelerin migrasyonu ile yara bölgesinin kapanmaya başladığı tespit edilmiştir. Danusertib (0.3 µM) uygulanan gruplarda, Viteksin (1 µM) uygulanan gruplarda ve Danusertib -Viteksin'nin birlikte uygulandığı gruplarda yara bölgesinin kapanmadığı tespit edilmiştir. Viteksin ile ilgili mevcut bilgiler olsada Viteksin'in hücre zar yüzeyine etkisi, hücre zar molekül etkileşimlerine etkisi, ilaç molekülleri ile etkileşiminin nasıl olduğuna dair bilgiler yeterli değildir. Bu nedenle gelecekte yapılacak araştırma çalışmalarında hedef molekül olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Akman, Ö., Gürbüz, H. (2019). “Meme Anatomisi ve Laktasyon Fizyolojisi.” Türkiye Klinikleri, Birinci baskı, p.14-20.

Akyolcu, N., Özhanlı, Y., Kandemir, D. (2019).”Recent Developments in Breast Cancer.” Journal of Health Science and Profession, Vol.6, No.3, pp. 583-94.

Alexander, M., Halmos, B. (2018). “VEGF inhibitors in EGFRmutated lung cancer: a never-ending story?” Ann Transl Med, Vol.6, pp.446.

Ansari, SS., Sharma, AK., Soni, H., et al. (2018). “Induction of ER and mitochondrial stress by the alkylphosphocholine erufosine in oral squamous cell carcinoma cells.” Cell Death & Disease, Vol. 9, No. 296, pp.2-15.

Angelo, L. S and Kurzrock, R. (2007). “ Vascular Endothelial Growth Factor and Its Relationship to Inflammatory Mediators”. Clin Cancer Research, Vol.13, No.10, pp. 2825 -2830.

Aslan, G., Önkol, T., Özçelik, A. B. (2022). “Siklin Bağımlı Kinaz 4/6 Ve İnhibitörleri.” Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi., Vol.46, No.1, pp. 193-208.

Aslam, M. S., Ahmad, M. S., Mamat, A. S. (2015). “Pharmacological Potential Of Vitexin.” Indian Research Journal Of Pharmacy and Science, Vol. 2, NO. 2, pp. 114-122.

Baldini, E., D’Armiento, M., Ulisse, S. (2014). “A New Aurora in Anaplastic Thyroid Cancer Therapy.” Review Article, International Journal of Endocrinology, Vol.2014.

Barr, A. R., Gergely, F. (2007). “Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles”. Journal of Cell Science, Vol. 120, No.17, pp. 2987-96.

Başoğlu, M. (2010). “Memenin Anatomisi, Embriyolojisi, Histoloji ve Fizyolojisi”. Türkiye Klinikleri J Radiol-Special Topics, Vol.3, No.3, pp. 1-7.

Baykara, O. (2016). “Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar.” Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, vol.5, No.3, pp. 154-165. International Journal of Molecular Sciences, Vol.16, pp. 27228–27251.

Bhardwaj, M., Cho, HJ., Paul, S., et al.(2018).“ Vitexin induces apoptosis by suppressing autophagy in multi-drug resistant colorectal cancer cells.” *Oncotarget*, Vol.9, No.3, pp.3278-91.

Bildik, A., Bayar, İ. (2018).“Kanserde Apoptotik Yolakların İnhibisyonu.” *Türkiye Klinikleri Journal Veterinary Science*, Vol.9, No.2, pp. 42-51.

Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., et. al. (1998). “A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers.” *The Embo Journal*, Vol.17, No.1, pp. 3052-65.

Boatright, K. M., Renatus, M., Scott. F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., et al. (2003). “A unified model for apical caspase activation”. *Molecular Cell*, Vol.11, pp. 529–541.

Bozkurt, K. K., Çiriş, İ. M., Kapucuoğlu, N., Devrim, T. (2020). “Meme Kanserinde Moleküler Alt Tiplerin Klinikopatolojik Özelliklerle İlişkisi.” *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Dergisi*, Vol. 27, No.2, pp.160-165.

Cabadak, H. (2008). “Hücre Siklusu ve Kanser.” *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, Vol. 9, No.3, pp. 51 -61.
Carmena, M., Ruchaud, S., Earnshaw, W. C. (2009). “Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins.” *Current Opinion Cell Biology*, Vol. 21, No. 6, pp. 796-805.

Carpinelli, P., Ceruti, R., Giorgini, M. L., Cappella, P., Gianellini, L., Croci, V. et al. (2007). “PHA-739358, a potent inhibitor of Aurora kinases with a selective target inhibition profile relevant to cancer.” *Nerviano Medical Sciences*, Vol.6, No.12, pp. 3158-3168.

Çelepli, S., Bigat, İ., Çelepli, P., Karagin, P.H. (2020). “Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi.” *Güncel Gastroenteroloji*, Vol. 24, No. 3, pp. 103-111.

Ceylan, G., Cömertpay, S. (2020). “Kapsaisin H2452 Mezotelyoma Hücre Hattından Seçilen Klonlarda Sitotoksitesinin ve Kaspaz-3 Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.” *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, Vol.23, No.5, pp. 1125-1134.

Chang, D. W., Xing, Z., Capacio, V. L., Peter, M. E., Yang, X. (2003). “Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation.” *The Embo Journal*, Vol.22, No.16, pp. 4132–4142.

Cheng, Y., Gao¹, XH., Li, XJ., Cao¹, QH., Zhao, DD., et.al. (2018). “ Depression promotes prostate cancer invasion and metastasis via a sympathetic-cAMP-FAK signaling pathway.” *Oncogene*, Vol.37, pp. 2953–2966.

Colotta, F., Mantovani, A. (2008). *Targeted Therapies in Cancer: Myth or Reality?*.3rd Edition, Vol.610, pp. 54-73.

Dağdeviren, T. (2021). “ Programlı Hücre Ölümü; Apoptoz Programmed Cell Death; Apoptosis.” *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, Vol.13, No.3, pp. 120-135.

Degterev, A., Boyce, M. ve Yuan, J. (2003). “A decade of caspases.” *Oncogene*, Vol.22, No.53, pp. 8543-67.

Distler, J., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R. E., Gay, S., Distler, O. (2003). “Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis.” *The Quarterly Journal Of Nuclear Medicine*, Vol.47, No.3, pp. 149- 161.

Duruel, H. M. E., Çağan, N. S., Işık, S., Kayhan F. E., (2021). “Hücre Kültürlerine Genel Bakış.” *S.Ü. Fen Fakültesi Fen Dergisi*, Vol. 47, No.2, pp. 136-149.

Elmore, S. (2007).” *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.*” *Toxicol Pathol*, Vol.35, No.4, pp. 495-516.

Sabel, MS. (2009).“*Anatomy and Physiology of the Breast.*” *Essentials of Breast Surgery.*

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, TJ., Ren, G. (2018). “Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis”. *Genes&Disease*, Vol.5, pp. 77-106.

Fernandez P. M., Rickles, F. R. (2002). “Tissue factor and angiogenesis in cancer.” *Current Opinion Hematology*, Vol.9, No.5, pp. 401-406.

Freshney, R. I. (2000). *Culture of Animal Cells: A manuel of basic Technique*, 3rd Edition, Wiley-Liss, New York.

Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A., Parry, H. (1995). "Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles." *Cell*, Vol. 81, pp. 95-105.

Gökbayrak, İ. N., Atay, N., Gezer, A. H., Kasap, E. (2021). "The Importance of Apoptosis in Cancer Development and Treatment." *Turkish Journal of Oncology*, Vol.36, No.3, pp.381–88.

Gökbulut, A. (2015). Fisetin, Hesperetin ve Viteksin'in Kronik Miyeloid Lösemi ve Akut Miyeloid Lösemi Hücreleri Üzerine Terapötik Potansiyelleri, Doktora Tezi, İzmir Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye.

Gökbulut, A., Özhan, O., Karacaoğlu, M., Şarer, E. (2012). "Radical Scavenging Activity and Viteksin Content of *Vitex agnus-castus* Leaves and Fruits." *Fabad Journal Of Pharmaceutical Science*, vol.35, pp. 85-91.

Gökhan, A., Kılıç, K. D., Gülle, K., Uyanıkgil, Y., Çavuşoğlu, T. (2020). "Apoptotik Yolaklar Ve Hedefe Yönelik Tedaviler." *SDÜ Tıp Fak. Dergisi*, Vol.27, No.4, pp. 565-573.

Gupta, J., Gupta, A. (2016). "İsolation and Characterization of Flavonoid Glycoside from Leaves of *Abrus Precatorius*." *International Journal of Chemical Studies*, Vol.4, No.1, pp. 14-17.

Haydaroğlu, A. (2015). "Meme Kanserinde Epidemiyoloji, Sınıflama ve Evreleme." *Turkiye Klinikleri J. Radiat Oncol-Special Topics*; Vol.1, No. 2, pp.1-6.

Hochegger, H., Hégarat N., Pereira-Leal, J. B. (2013). "Aurora at the pole and equator: overlapping functions of aurora kinases in the mitotic spindle." *Open Biology*, Vol. 3:120185.

Hoang., T. (2008). Survivin and Aurora B kinase, two targets in the search for anti - mitotic drugs; identification of a new class of Aurora kinase inhibitors, Doktora Tezi, Albert Bonniot Enstitüsü - Joseph Fourier Üniversitesi.

Hsueh T. P., Lin W.L., Tsai T. H. (2017). " Pharmacokinetic interactions of herbal medicines for the treatment of chronic hepatitis.1 *J Food Drug Anal*, Vol.25, No.2), pp. 209-218.

<https://www.biologend.com/en-us/products/apc-annexin-v-apoptosis-detection-kit-with-pi-9788> [13 Temmuz 2022].

Jacobs, I., Taljaard-Krugell, C., Ricci, C., Vorster, H., Rinaldi, S., Cubasch, H., et al. (2019). “Dietary intake and breast cancer risk in black South African women: the South African Breast Cancer study.” *British Journal of Nutrition*, Vol.1215, pp. 591-600.

Karabekir, G., (2017). MCF-7 Hücre soyunda Resveratrolün Apoptoz Mekanizması Üzerine Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

Kareva, I. (2018). Chapter 4—Blood vessel formation and pathological angiogenesis as mitigated by competing angiogenesis regulators. In *Understanding Cancer from a Systems Biology Point of View*; Kareva, I., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, pp. 45–60.

Kastan M., Bartek J. (2004). “Cell cycle check points and cancer.” *Nature*. Vol.432, No.7015, pp. 316-323.

Katayama, H., Sasai, K., Kloc, M., Brinkley, B. R., Sen, S. (2008). “Aurora kinase-A regulates kinetochore/chromatin associated microtubule assembly in human cells.” *Cell Cycle*, Vol. 7, No. 17, pp. 2691-2704.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. ve Currie, A. R. (1972). “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.” *British Journal of Cancer*, Vol.26, No.4, pp. 239-57.

Koçaklı, Z.G., Akıllıoğlu, K., Doğan, A. (2015). “Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü.” *Arşiv kaynak Tarama Dergisi*, Vol.24, No.3, pp. 390-401.

Kırbyık, İ., A., Özçimen, A. A. (2021). “The effect of danusertib, an Aurora kinase inhibitor, onto the cytotoxicity, cell cycle and apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells.” *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, Vo.17, pp.1419-24.

Korkmaz, Ş. (2012). MDA-MB-231 ve MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Soylarında Zeytin Yaprağı Ekstresinin Anti-kanser İlaçlarla Kombinasyonunun Araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Bursa, Türkiye.

Kwon, H., Lee, C., Lee, A., Kim, Y., Kang, H., Rha, Y. (2019). “ Behaviors and attitudes toward the use of complementary and alternative medicine among Korean cancer patients.” *Cancer Res Treat*, Vol. 51, No.3, pp. 851.

Lai, L., Shin, Y., Qiu, H. (2020). “The Role of Cell Cycle Regulators in Cell Survival—Dual Functions of Cyclin-Dependent Kinase 20 and p21^{Cip1/Waf1}.” *Inter. J. Mol. Sci.*, Vol.21, pp.8504.

Law, N. C., Donaubauer, E.M., Zeleznik, A. J., Hunzicker-Dunn, M. (2017). “How protein kinase A activates canonical tyrosine kinase signaling pathways to promote granulosa cell differentiation.” *Endocrinology*, Vol.158, pp. 2043–51.

Li, J., Yang, Y., Liu, Q., Zhou, Z. et. al. (2015). “The pan-inhibitor of Aurora kinases danusertib induces apoptosis and autophagy and suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in human breast cancer cells.” *Drug Design, Development and Therapy*, Vol. 9, pp.1027–1062.

Liu, D., Vader, G., Vromans, M. J., Lampson, M. A., Lens, S. M. (2009). “Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora-B kinase from kinetochore substrates.” *Science*, Vol. 323, No.5919, pp. 1350-1353.

Liu, M., Li, Y., Zhang, C., Zhang, Q. (2022). “Role of aurora kinase B in regulating resistance to paclitaxel in breast cancer cells.” *Human Cell*, Vol. 35, pp.678–693.

Liu, X., Jiang, Q., Liu, H., Luo, S. (2019). “Vitexin induces apoptosis through mitochondrial pathway and PI3K/Akt/ mTOR signaling in human non-small cell lung cancer A549 cells.” *Biological Research*, Vol,52, No.7.

Lueangamornnara Y, U-pratya W, Jiratchariyakul A, et al. (2017). “Antiproliferative effects of three roots Thai herbal recipe on human cancer cell lines.” *U. Mahidol Univ J Pharm Sci*, Vol.44, No.1, pp. 22-31.

Mattei, J. C., Bouvier-Labit, C., Doriane Baretts., Macagno,N., Chocry, M. (2020). “Pan Aurora Kinase Inhibitor: A Promising Targeted-Therapy in Dedifferentiated Liposarcomas With Differential Efficiency Depending on Sarcoma Molecular Profile.” *Cancers*, Vol.12, pp.583.

Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J. (2002). “The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β .” *Molecular Cell*, Vol.10, No.2, pp. 417–426.

Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., Saya, H. J. (2003). “Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells.” *Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 278, No.51, pp. 51786-51795.

Massague, J. (2004). "G₁ cell-cycle control and cancer." *Nature*, Vol.432, pp. 298-306.

McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). "Caspase Functions in Cell Death & Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 5 No.4, a008656–a008656.

Meulenbeld, H. J., Mathijssen, R. H. J., Verweij, J., De Wit, R., De Jonge, M. J. A. (2012). Danusertib, an aurora kinase inhibitor. Erasmus University Medical Center, Rotterdam, Netherlands.

Mutluay, S. U., Kozacı, L. D. (2021). "Hücre İçi Sinyal Yolaklarını Hedefleyen Kemoterapötik Ajanlar." *Black Sea Journal of Health Science*, Vol.4, No.2, pp. 175-184.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Dixit, V. M., (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." *Journal of Biological Chemistry*, Vol.273. No.5 pp.2926–2930.

Nguyen, S. T., Nguyen, H. TL., Truong, K. D (2020). "Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines." *Biomedical Research and Therapy*, Vol.7, No.7, pp.:3855-3859.

Özgür, S. N., Keser, S. B. (2021). "Meme Kanseri Tümörlerinin Derin Öğrenme Algoritmaları ile Sınıflandırılması". *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, V.10, No.2, pp. 212-222.

Özkara, G., Öztürk, O., Aydoğan, H. Y., (2020). "Kanser ve Metastaz: Hücre Adezyon Molekülleri Ve Hücreler Arası Bağlantıların Önemi." *Experimed*, Vol.10, No.1, pp. 38-48.

Öztürk, E. (2017). Arum dioscoridis Bitki Ekstraktının, Tozasertib ile Birlikte CFPAC-1 pankreas Karsinoma Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Etkisinin *İn Vitro* Araştırılması, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, Türkiye.

Pehlivanoglu, S., Aydın-Acar, Ç. (2020). "PAK, MCF-7 hücrelerinde E-kaderini baskılayarak PKC-bağımlı invaziv potansiyeli destekler." *Turk Hij Den Biyol Dergisi*, Vol.77, No.1, 107-116.

Rizov, M., Andreeva, P., Dimova, I. (2017). "Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction." *Taiwanese Journal of Obstetrics&Gynecology*, Vol.56, no.2, pp. 127–132.

Ross, M., H. (2014). Hücre Nükleusu., (B. Baykal editör) *Histoloji ve Konu Anlatımı ve Atlas*, 6. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, pp. 86-88.

Sağlam, S. Y., Elazoğlu, Z., Kayhan, H., Önen, H.İ., Yılmaz, A., Menevşe, E.S. (2018). “EF24’ün Dositaksel ile Sıralı Uygulanmasının Metastatik Meme Kanseri hücre Hattına Etkisi.” Fırat Tıp Dergisi, Vol. 23, No. 2, pp. 58-67.

Steeghs, N., Mathijssen, R.H. J., Wessels, J. A. M., De Graan A. J., Van Der Straaten, T., Mariani, M., Laffranchi, B., Comis, S., De Jonge, M. J. A., Gelderblom, H., Guchelaar, HJ. (2011). “Influence of pharmacogenetic variability on the pharmacokinetics and toxicity of the aurora kinase inhibitor danusertib.” Investigational New Drugs, Vol.29, pp. 953–962.

Şanlı, E., Yalçınkaya, N., Tüzün, E. (2018).” Parkinson Hastalığı ve Akciğer Kanseri PI3K/ Akt Yolağı Faktörlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması.” Experimed, Vol.8, No.2, pp. 52-7.

Teleanu, R. I., Chircov, C., Grumezescu, A. M., Teleanu, D. M. (2020). “Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment.” Journal of Clinical Medicine, Vol.9, p.84.

Thu, H. E., Hussain, Z., Mohamed, I. N., Shuid, A. N. (2018). “Eurycoma longifolia, A potential phytomedicine for the treatment of cancer: Evidence of p53-mediated apoptosis in cancerous cells.” Curr Drug Targets, Vol.19, No.10, pp.1109–26.

Vural A, G., Karaaslan, E. (2022). “Meme Kanseri Hastalarda Risk Faktörlerinin Belirlenmesi.” Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, Vol.6, No.2, pp. 180-192.

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC). <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data> [13 Temmuz 2022].

Vader, G., Lens, S. M. (2008). “The Aurora kinase family in cell division and cancer.” Biochim Biophys Acta, Vol. 1786, pp. 60-72.

Van Der Waal, M. S., Hengeveld, R. C., Van Der Horst, A., Lens, S. M. (2012). “Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex.” Experimental Cell Research, Vol. 318, No.12, pp. 1407-20.

World Health Organization (2013). International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) 3rd Edition, 1st Revision.

Yalçın, G. T. (2013). “Flavonoidlerin Kanser Hücrelerine Etkisi.” Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye.

Yang, S. H., Liao, P. H., Pan, Y. F., Chen, S. L., Chou, S. S., Chou, M. Y. (2013). The Novel p53-Dependent Metastatic and Apoptotic Pathway Induced by Vitexin in Human Oral Cancer OC2 Cells. *Phytotherapy* 27: 1154-61.

Yanagawa, M., Ikemot, K., Kawauchi, S. et al. (2012). “Luminal A and Luminal B (HER2 negative) Subtypes Of Breast Cancer Consist of a Mixture of Tumors with Different Genotype.” *BMC Research Notes*, Vol.5, No.1, pp. 376.

Yuan, C., Zhou, Z., Yang, Y. et al. (2015). “Danusertib, A Potent Pan-Aurora Kinase and ABL Kinase İnhibitör, İnduces cell Cycle Arrest and Programmed Cell Death and İnhibits Epithelial to Mesenchymal Transition İnvolving the PI3/Akt/mTOR-mediated Signaling Pathway in Human Gastric Cancer AGS and NCI-N78 Cells.”, *Drug Design, Development and Therapy*, Vol.9, pp.1293-1318.

Zhang, G., Li, D., Chen, H., Zhang, J., Jin, X. (2018). “Vitexin, insan glioblastoma hücrelerinde Akt/mTOR sinyal yolu aracılığıyla G2/Mfaz tutuklama ve apoptozu indükler.” *Mol Med Rep*. Vol.17, No.3, pp. 4599–604.

Zhao, S., Guan, X., Hou, R., Zhang, X., Guo, F., Zhang, Z., Hua, C. (2020). “Vitexin attenuates epithelial ovarian cancer cell viability and motility in vitro and carcinogenesis in vivo via p38 and ERK1/2 pathways related VEGFA”. *Ann Transl Med*, Vol.8, No.18, p. 1139.

Zi, D., Zhou, ZW., Yang, YJ., Huang, L., Zhou, ZL., He, SM., He, ZX. and Zhou, SF. (2015). “Danusertib Induces Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Autophagy but İnhibits Epithelial to Mesenchymal Transition İnvolving PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Human Ovarian Cancer Cells.” *International. Journal of Molecular.Sciences*, Vol.16, No.11, pp. 27228-27251.

EKLER

EK1: WST-8 Kit Protokolü

1. Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksosite Testi

Well-plate 96 kuyucuklu, her kuyucuk başına 5000 ila 10.000 hücre ekimi yapıldı. Test bileşikleri hücre bulunan 96 well plate kuyucuklarına eklenir ve istenen süre boyunca (örn. 24., 48. veya 96. saat) 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edilir. Blank olarak seçilen kuyucuklara (hücresiz ortam) için aynı miktarda test bileşiği eklenir. Önerilen hacim, 96 kuyucuklu bir well plate için 100 µl'dir.

Not: Proliferasyon veya sitotoksosite indüksiyonu için optimal hücre yoğunluğunu belirlemek için her hücre çizgisi ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Proliferasyon tahlilleri için daha az hücre kullanılmalıdır; sitotoksosite deneyleri için daha fazla hücre kullanılmalıdır. Her kuyuya 10 µl/kuyu (96 well plate) WST-8 Solüsyonu eklenir. Işıktan koruyarak karanlıkta ve 37°C'de 1-4 saat inkübe edildi.

Not: İnkübasyon süresi, tek tek hücre tipine ve kullanılan hücre konsantrasyonuna bağlı olarak 30 dakikadan bir geceye kadar olabilir. Her deney için inkübasyon süresini optimize ediniz, 460 nm'de absorbans artışının ölçümü yapıldı.

2. Hücre Sayma Tahlili

Hücre kültürünü şeffaf tabanlı bir 96 well plate'de hazırlayın. Önerilen toplam hacim, 96 kuyucuklu bir well plate için 100 µL'dir. Her kuyuya 10 µl/kuyucuk (96 oyuklu plaka) WST-8 Solüsyonu eklendi. Işıksız ortamda karanlıkta ve 37°C'de 1-4 saat inkübe edildi.

Not: İnkübasyon süresi, kullanılan hücre tipine ve hücre konsantrasyonuna bağlı olarak 30 dakikadan bir geceye kadar olabilir.

Her deney için inkübasyon süresi optimize ediniz. Absorbans OD'si 460 nm'de ölçülür.

*Sadece büyüme ortamına sahip blank kuyucukların absorbansı, hücreli kuyucukların değerlerinden çıkarılır. Boş kuyuların absorbansı, mikrotitre plakalarının kaynaklarına veya büyüme ortamına bağlı olarak değişebilir.

