

**HT-29 VE Caco-2 HÜCRELERİNDE HİPERİSİN İLE
FOTOAKTİVASYONA BAĞLI DEĞİŞİKLİKLERİN
MOLEKÜLER, AKIŞ SİTOMETRİSİ, İMMÜNFLORESAN VE
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI**

**THE INVESTIGATION OF ALTERATIONS IN HT-29 AND
Caco-2 CELLS CAUSED BY PHOTOACTIVATION WITH
HYPERICIN USING MOLECULAR, FLOW CYTOMETRIC,
IMMUNFLUORESCENCE AND SPECTROPHOTOMETRIC
METHODS**

AYSUN KILIÇ

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Üye (Danışman) : Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU

Üye : Prof. Dr. Dürdane KOLANKAYA

Üye : Prof. Dr. Nurhayat BARLAS

Üye : Prof. Dr. E. Arzu KOÇKAYA

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

CANIM AİLEME VE YEĞENİM DENİZ' E,

HT-29 VE Caco-2 HÜCRELERİNDE HİPERİSİN İLE FOTOAKTİVASYONA BAĞLI DEĞİŞİKLİKLERİN MOLEKÜLER, AKIŞ SİTOMETRİSİ, İMMÜNFLORESAN VE SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

Aysun Kılıç

ÖZ

Fotodinamik tedavi (PDT), özgül olarak kanserli hücrede biriken ışık duyarlı maddenin (IDM) belirli bir dalga boyundaki ışıkla uyarıldığı alternatif bir tedavi şeklidir. PDT sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) hücre içi organellere hasar vererek kanser hücrelerini apoptotik ve/veya nekrotik hücre ölümüne götürmektedir. Hiperisin, *Hypericum perforatum* bitkisinde doğal olarak oluşan bir IDM'dir. Hiperisin antidepresif, antiviral, antineoplastik ve antitümör etkileri nedeniyle fototeşhiste ve fototedavide kullanılmaya aday olan önemli bir etken maddedir. Hiperisin ışık ile uyarıldığında 600 nm'de floresan ışımaya yapmakta ve birçok kanser tipinde hücrede seçici olarak birikmektedir.

Son yıllarda, kanser hücrelerinin yayılımını kolaylaştıran bir anti-adezyon molekülü olan disaderin bulunmuştur. Birçok kanser hücrelerinin yüzeyinde yer alan bir zar glikoproteini olan disaderin, hücre içinde hücre iskeleti elemanlarıyla bağlantı yapmaktadır. Bu nedenle disaderin tümör metastazı, hücre hareketliliği ve aktin filamentinin organizasyonu ile ilişkilidir.

Bu çalışmada HT-29 (derece-1) ve Caco-2 (derece-2) insan kolon adenokarsinom hücreleri, yapılan ön çalışmalara göre belirlenen 0,04 μ M, 0,08 μ M ve 0,15 μ M hiperisin ile inkübe edilmiştir. Uygulamadan 24 saat sonra beyaz floresan lambalarla ışımaya yapılmıştır. Aktivasyondan 16 ve 24 saat sonra hiperisinin hücre canlılığına etkisi tripan mavisiyle boyanarak ve MTT testi ile; metabolik aktivite glukoz, laktat miktarlarının ve laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesinin ölçülmesi ile; hücredeki ölüm tipi akridin oranj/propidyum iyodür (AO/PI) ve DAPI boyaması ile; morfolojik değişiklikler Giemsa boyaması ile tespit edilmiştir. Disaderin ve filamentöz aktin (F-aktin) proteinleri immünofloresan (IF) boyama ile floresan ataşmanlı inverted mikroskopta görüntülenmiştir. Ayrıca disaderinin RNA düzeyinde ifadesi reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile incelenmiştir. Hiperisinin hücre içine alımı ve hücre döngüsündeki değişiklikler akış sitometri analizleriyle tespit edilmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, HT-29 ve Caco-2 hücreleri için hiperisin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak hiperisinin sitotoksik etkisi artmış, farklı oranlarda apoptotik ve nekrotik hücre ölümü gözlenmiştir. AO/PI boyamalarına göre, HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 24 saat, Caco-2 hücrelerinde ise 16 saat sonra apoptotik hücre ölümü en fazla 0,08 µM hiperisin grubunda, nekrotik hücre ölümü ise 0,15 µM hiperisin grubunda görülmüştür. Her iki hücrede hiperisin konsantrasyonundaki artışla glukoz tüketimi ve laktat üretimi azalırken, LDH aktivitesi artmıştır. Disaderinin IF boyamasının her iki hücrede özellikle 0,15 µM hiperisin uygulamasından sonra azalması, RNA düzeyindeki azalmayla uyumlu bulunmuştur. Ayrıca F-aktin'in immünfloresan boyamalarına göre, hiperisin konsantrasyonundaki artışla hücreiçi aktin stres fibrilleri azalırken, aktin agregatları artmıştır. Akış sitometri sonuçlarına göre 0,08 µM hiperisin uygulaması HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 24 saat, Caco-2 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat sonra hücre döngüsünün G2/M fazında durmasına neden olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hiperisin, fotodinamik terapi, kolon kanseri, disaderin, F-aktin, hücre ölümü, immünfloresan boyama, hücre döngüsü, MTT, RT-PZR

Danışman: Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı

Eş Danışman: Prof. Dr. M. Turan AKAY, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı

THE INVESTIGATION OF ALTERATIONS IN HT-29 AND Caco-2 CELLS CAUSED BY PHOTOACTIVATION WITH HYPERICIN USING MOLECULAR, FLOW CYTOMETRIC, IMMUNFLUORESCENCE AND SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

Aysun Kılıç

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative therapeutic modality based on administration of photosensitizer which is specifically accumulated in cancer cells when activated by local irradiation with light of an appropriate wavelength. PDT triggers with damage to intracellular organelles by producing highly cytotoxic reactive oxygen species (ROS) which cause cancer cell death either by apoptosis or necrosis. PDT is a promising therapeutic modality for cancer treatment; however, a more detailed understanding is needed to improve the clinical use of this therapy.

Hypericin is a photosensitizer which is occurred naturally in *Hypericum perforatum* plant. It is a target agent in photodiagnosis and photodynamic therapy because of its antidepressive, antiviral, antineoplastic, antitumor activities. Hypericin exhibits bright fluorescence at approximately 600 nm when stimulated with light and preferentially accumulated in various types of cancer cells. In recent years, dysadherin which is an anti adhesion molecule was discovered. It is a membrane glycoprotein which has connection with intracellular cell cytoskeletal proteins. It has important role in facility of metastasis and related with cell motility and organisation of actin filament.

In this study, HT-29 (grade-1) and Caco-2 (grade-2) human colon adenocarcinoma cells treated with 0,04 μ M, 0,08 μ M or 0,15 μ M hypericin concentrations and after 24 hours cells were irradiated with fluorescent lamps. The effects of hypericin examined 16 and 24 hours after the activation. The effect of hypericin on cell viability analysed with trypan blue staining and MTT test; amounts of glucose, lactate and activity of LDH were measured for the metabolic activity; cells were stained with AO/PI and DAPI for determining the type of cell death and with Giemsa for evaluating the morphological changes. Dysadherin and F-actin were examined with immunfluorescence (IF) staining under inverted microscope. Besides, dysadherin expression was determined in RNA level with RT-PCR. Hypericin content of cells and cell cycle analysis were performed in flow cytometry.

According to the results, in HT-29 and Caco-2 cells as hypericin concentration increased cytotoxicity increased, and the different percentages of apoptotic and necrotic cell death were observed. According to the AO/PI stainings, in HT-29 cells after 24 hours and in Caco-2 cells after 16 hours from the activation apoptosis induced mostly in 0,08 μM hypericin group and necrosis in 0,15 μM hypericin group. In both cells, while glucose consumption and lactate production decreased, the activity of LDH increased depending on the hypericin doses. The decrease in dysadherin IF stainings especially in 0,15 μM hypericin treatment, were parallel to the decreased expression of dysadherin in RNA level. Besides, F-actin IF results showed that according to the increase of hypericin concentration while actin stress fibers decreased, actin aggregates increased. According to the cell cycle analysis in flow cytometer 0,08 μM hypericin treatment caused G2/M arrest 24 hours after the activation in HT-29 and 16 hours after the activation in Caco-2 cells.

Keywords: Hypericin, photodynamic therapy, colon cancer, dysadherin, F-actin, cell death, immunofluorescence staining, cell cycle, MTT, RT-PCR

Advisor: Prof.Dr. Güldeniz SELMANOĞLU, Hacettepe University, Department of Biology, Zoology Section.

Co-advisor: Prof.Dr. M. Turan AKAY, Hacettepe University, Department of Biology, Zoology Section.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca bilgisini, emeğini ve vaktini esirgemeyerek her konuda desteğini gördüğüm danışman hocam sayın Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım. Tüm öğrenim hayatım boyunca desteğini hep hissettiğim, doktora tezimin oluşmasında önerileriyle önemli katkı sağlayan eş danışman hocam sayın Prof. Dr. M. Turan AKAY'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez dönemimde önerileri, katkıları ve özverisinden dolayı tez izleme komitesinde yer alan sayın Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımın büyük bir kısmını yaptığım, bana laboratuvarlarını açan ve her türlü imkanını sunan T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve Hücre Bankası bölüm şefi sayın Bil. Uzm. Şükran YILMAZ'a tüm tez çalışmamdaki yardımlarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarına katkıları ve anlayışları nedeniyle Bil. Uzm. Taibe YÜCEL ARSOY'a, Vet. Hek. Adeviye ÖZGÜNGÖR'e, Osman TAN'a, İlkay MAHMUTOĞLU'na, Vet. Hek. Ali ÖZDEMİR'e, Bil. Uzm. Mustafa ÖZYİĞİT'e, Nimet DİKİLİTAŞ'a ve diğer Şap Enstitüsü çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın moleküler kısmındaki büyük yardımlarından dolayı sayın Arş. Gör. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN'a, akış sitometri analizlerinin yapılmasında ve sonuçların değerlendirilmesinde büyük yardımını gördüğüm sayın Öğr. Gör. Hande CANPINAR'a ve bu analiz için laboratuvarını açan Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'na, en içten teşekkürlerimi sunarım. Tüm öğrenimim süresince akademik katkılarını ve desteğini hep hissettiğim hocam sayın Prof. Dr. E. Arzu KOÇKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarımda her zaman yardımını gördüğüm ve tezin son şeklini almasındaki büyük katkıları nedeniyle Arş. Gör. Elif KARACAOĞLU'na, çalışmam boyunca teknik katkıları ve manevi desteğiyle yanımda olan Bil. Uzm. Cansın GÜNGÖRMÜŞ'e, ışınma cihazının yapımındaki yardımlarından ötürü Tek. Ömer Kılınç'a teşekkür ederim.

Çalışmamıza maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne (Proje no: 09 01 601 011) teşekkürlerimi sunarım.

Akademik çalışmalarım boyunca beni teşvik eden, bana güvenen, her koşulda sabırla ve anlayışla yaklaşan canım aileme hep yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser	4
2.2. Kanserin Nedenleri	5
2.2.1. Apoptozun engellenmesi	5
2.2.2. Hücre proliferasyonunu anormal şekilde uyararak genetik bozukluklar	5
2.2.3. Tümör baskılayıcı genlerdeki anormallikler	6
2.2.4. Tümör anjiogenezini	6
2.3. Kolon Kanseri	6
2.4. Kanser ve Apoptoz	9
2.5. Fotodinamik Terapi.....	11
2.5.1. Işık ve oksijen.....	13
2.5.2. Işık duyarlı maddeler	14
2.6. PDT'nin Etki Mekanizması	15
2.6.1. PDT'nin hücre içi mekanizması	17
2.6.1.1. Nekroz.....	17
2.6.1.2. Apoptoz	17

2.6.1.3. Subletal PDT'ye cevap	18
2.7. Hiperisin.....	18
2.7.1. Hiperisinin özellikleri	19
2.7.2. Kullanım alanları.....	21
2.7.3. Hiperisinin etki mekanizması	21
2.7.4. Hiperisinin hücre içi dağılımı.....	22
2.7.5. Hiperisin ile PDT'de hücre ölüm mekanizmaları	23
2.7.6. Hiperisin ve sinyal iletim yolları.....	26
2.7.7. Hiperisin ve ROS oluşumu	27
2.7.8. Hiperisinin enzim aktiviteleri ve reseptörlerle olan ilişkisi	28
2.8. Disaderin (Anti-adezyon molekülü).....	29
2.8.1. Disaderinin yapısı, dağılımı, düzenlenmesi	30
2.8.2. Disaderinin kanser gelişimindeki rolü	31
2.9. Fibröz (Filamentöz) Aktin (F-aktin).....	33
2.10. Hücre Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler	35
2.10.1. Sterilite testleri.....	35
2.10.2. Üreme eğrisi	36
2.11. MTT Sitotoksosite Testi	37
2.12. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Salım Analizi	38
2.13. Metabolik Aktivasyon Testleri	38
2.14. Akış Sitometri (Flow Sitometri).....	39
2.14.1. DNA analizi ve hücre döngüsü	40
2.15. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	41
3. MATERYAL VE METOT	43
3.1. Hücre Kültürü.....	43

3.2. Hücrelerin Karakterizasyonunun Yapılması.....	43
3.2.1. Hücrelerin Sterilite Testlerinin Yapılması.....	43
3.2.1.1. Akridin oranj ile inklüzyon cisimciklerinin boyanması	43
3.2.1.2. Mikoplazma testi	43
3.2.2. Üreme eğrisi ve ikilenme zamanının hesaplanması	44
3.3. Hiperisin (4,5,7,4',5',7'-heksahidroksi-2,2'-dimetilnaphthodiantron).....	45
3.4. Işıma Cihazı.....	45
3.5. Uygulama Basamakları ve Hiperisin Aktivasyonu.....	46
3.6. Hiperisinin Hücre İçine Alımının Analizi	48
3.7. Hücre sayımı, Yüzen ve Tutunan Hücre Yüzdesi, Canlılık Analizi	48
3.8. Sitotoksisite Analizi	49
3.9. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesinin Ölçümü.....	49
3.10. Metabolik Aktivasyon Testleri	50
3.11. Apoptotik İndeksin DAPI Boyaması ile Belirlenmesi	51
3.12. Hücre Ölüm Tipinin Akridin Oranj/Propidyum İyodür (AO/PI) Boyaması ile Belirlenmesi.....	52
3.13. Hücre Morfolojisinin Giemsa Boyamasıyla Belirlenmesi.....	52
3.14. Akış Sitometride Hücre Döngüsünün Belirlenmesi	53
3.15. Disaderin ve F-aktinin İmmünfloresan Boyaması	53
3.16. Disaderin İfadesinin RT-PZR ile Ölçülmesi.....	55
3.16.1. Total RNA izolasyonunun yapılması.....	55
3.16.2. Elde edilen RNA'nın RT-PZR ile cDNA'ya çevrilmesi.....	55
3.16.3. Elde edilen cDNA'nın disaderin primerleri kullanılarak PZR'sinin yapılması	56
3.16.4. Örneklerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi.....	57
3.17. İstatistiksel Analizler	57

4. SONUÇLAR	59
4.1. Sterilite Test Sonuçları.....	59
4.2. HT-29 ve Caco-2 Hücrelerinin Üreme Eğrisi ve Morfolojisi.....	59
4.3. Hiperisinin Hücre İçine Alım Sonuçları.....	63
4.4. Hücre Sayımı, Yüzen ve Tutunan Hücre Yüzdesi, Canlılık Analizi	66
4.5. Sitotoksosite Sonuçları	69
4.6. LDH Aktivitesi Ölçüm Sonuçları.....	72
4.7. Metabolik Aktivasyon Test Sonuçları	76
4.8. Apoptotik İndeks sonuçları.....	80
4.9. Hücre Ölüm Tipinin AO/PI Boyaması ile Belirlenmesi.....	91
4.10. Hücre Morfolojisinin Giemsa Boyaması ile Belirlenmesi	93
4.11. Akış Sitometride Hücre Döngüsünün Belirlenmesi	97
4.12. Disaderin ve F-aktinin İmmünfloresan Boyaması	104
4.13. Disaderin İfadesinin RT-PZR ile Ölçülmesi.....	122
5. TARTIŞMA	125
KAYNAKLAR	149
ÖZGEÇMİŞ	166

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Adenom-karsinom dönüşümü.	8
Şekil 2.2. Kolorektal kanserde aşamalar.....	8
Şekil 2.3. Apoptozda meydana gelen hücre içi olaylar	10
Şekil 2.4. Işık duyarlı bir madde ile tümörlü bölgedeki floresan ışımının tespiti.	12
Şekil 2.5. Işık duyarlı maddelerin fotoaktivasyon mekanizması ve indüklediği hasarlar	16
Şekil 2.6. A. Hiperisinin kimyasal yapısı, B. <i>Hypericum perforatum</i> bitkisi.....	20
Şekil 2.7. Hiperisinin Absorpsiyon spektrumu ve floresan spektrumu.....	20
Şekil 2.8. Hiperisin aracılı PDT sonrasında indüklenen çoklu ve bağlantılı sinyal yolları.	25
Şekil 2.9. FXYD protein ailesinin zar topolojisi.....	30
Şekil 2.10. Disaderinin E-kaderin bağımlı ve bağımsız etki mekanizması için önerilen model.....	33
Şekil 2.11. Aktin hücre iskeletinin bir fibroblast hücrelerinde şematik görüntüsü	34
Şekil 2.12. Büyüme eğrisi ve ikilenme zamanı.....	37
Şekil 2.13. Akış sitometrinin.....	39
Şekil 2.14. A. Hücre döngüsü ve DNA histogramı arasındaki ilişki B. Hücre döngüsüne ait histogram örneği.....	41
Şekil 3.1. A. Işıma cihazının üzerinde pleksiglas kapağı ve yanlarda fanların, B. Üstten floresan lambaların, C. Lüksmetrenin görüntüsü.	46
Şekil 3.2. Deney planı.....	48
Şekil 3.3. Akridin oranj ve propidyum iyodür boyamasına göre canlı ve ölü hücrelerin boyanması	52
Şekil 4.1. HT-29 hücrelerine ait üreme eğrisi.....	60
Şekil 4.2. Caco-2 hücrelerine ait üreme eğrisi.	60
Şekil 4.3. HT-29 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. DMSO, C. 0,04 µM hiperisin, D. 0,08 µM hiperisin, E. 0,15 µM hiperisin grubu.....	61
Şekil 4.4. Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. DMSO, C. 0,04 µM hiperisin, D. 0,08 µM hiperisin, E. 0,15 µM hiperisin grubu.....	62
Şekil 4.5. HT-29 hücrelerinde hiperisinin akış sitometride ölçülen floresan yoğunluğu.	64
Şekil 4.6. Caco-2 hücrelerinde hiperisinin akış sitometride ölçülen floresan yoğunluğu.	65
Şekil 4.7. Kontrol ve hiperisin uygulanan HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdeleri.....	67

Şekil 4.8. Kontrol ve hiperisin uygulanan Caco-2 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdeleri.....	69
Şekil 4.9. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarına ait canlı hücre yüzdeleri.	70
Şekil 4.10. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarına ait canlı hücre yüzdeleri.	71
Şekil 4.11. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra LDH aktivitesi artışı.	73
Şekil 4.12. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra LDH aktivitesi artışı.	75
Şekil 4.13. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra glukoz tüketimi.	77
Şekil 4.14. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra laktat üretimi.	77
Şekil 4.15. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve uygulama hiperisin gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra glukoz tüketimi.	79
Şekil 4.16. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra laktat üretimi.	79
Şekil 4.17. Kontrol ve hiperisin uygulanan HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra apoptotik indeks.	81
Şekil 4.18. HT-29 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu.....	82
Şekil 4.19. HT-29 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu.....	84
Şekil 4.20. Kontrol ve hiperisin uygulanan Caco-2 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra apoptotik indeks.....	86
Şekil 4.21. Caco-2 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu.....	87
Şekil 4.22. Caco-2 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu.....	89
Şekil 4.23. Kontrol ve hiperisin uygulanan HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat (A) ve 24 saat (B) sonra canlı, apoptotik, sekonder nekrotik ve nekrotik hücre yüzdeleri	91

Şekil 4.24. Kontrol ve hiperisin uygulanan Caco-2 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat (A) ve 24 saat (B) sonra canlı, apoptotik, sekonder nekrotik ve nekrotik hücre yüzdeleri	92
Şekil 4.25. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra kontrol ve uygulama gruplarında Giemsa boyaması. A. Kontrol, B. DMSO, C. 0,04 µM hiperisin, D. 0,08 µM hiperisin, E. 0,15 µM hiperisin grubu.....	93
Şekil 4.26. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra kontrol ve uygulama gruplarında Giemsa boyaması. A. Kontrol, B. DMSO, C. 0,04 µM hiperisin, D. 0,08 µM hiperisin, E. 0,15 µM hiperisin grubu.....	94
Şekil 4.27. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra kontrol ve uygulama gruplarında Giemsa boyaması. A. Kontrol, B. DMSO, C. 0,04 µM hiperisin, D. 0,08 µM hiperisin, E. 0,15 µM hiperisin grubu.....	95
Şekil 4.28. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra kontrol ve uygulama gruplarında Giemsa boyaması. A. Kontrol, B. DMSO, C. 0,04 µM hiperisin, D. 0,08 µM hiperisin, E. 0,15 µM hiperisin grubu.....	96
Şekil 4.29. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra hücre döngüsünün G2/M fazında duran hücre yüzdesi.....	98
Şekil 4.30. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat sonra G1, S ve G2/M fazındaki hücre sayısını gösteren DNA histogramları.....	99
Şekil 4.31. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 24 saat sonra G1, S ve G2/M fazındaki hücre sayısını gösteren DNA histogramları.....	100
Şekil 4.32. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra hücre döngüsünün G2/M fazında duran hücre yüzdesi.....	101
Şekil 4.33. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat sonra G1, S ve G2/M fazındaki hücre sayısını gösteren DNA histogramları.....	102
Şekil 4.34. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 24 saat sonra G1, S ve G2/M fazındaki hücre sayısını gösteren DNA histogramları.....	103
Şekil 4.35. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu.....	105
Şekil 4.36. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu.....	107

- Şekil 4.37. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM grubu..... 109
- Şekil 4.38. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu..... 111
- Şekil 4.39. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu..... 114
- Şekil 4.40. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu..... 116
- Şekil 4.41. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu..... 118
- Şekil 4.42. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu..... 120
- Şekil 4.43. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat sonra A. Disaderin, B. Siklofilin A ve 24 saat sonra C. Disaderin, D. Siklofilin A genlerine ait bantların % 2 agaroz jel görüntüsü. 122
- Şekil 4.44. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 ve 24 saat sonra disaderin bağıl ifade düzeyleri. 123
- Şekil 4.45. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat sonra A. Disaderin, B. Siklofilin A ve 24 saat sonra C. Disaderin, D. Siklofilin A genlerine ait bantların % 2 agaroz jel görüntüsü. 123
- Şekil 4.46. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 ve 24 saat sonra disaderin bağıl ifade düzeyleri. 124

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Hiperisin ile PDT sonrasında inhibe olan enzimler ve bazı reseptörler .	28
Çizelge 2.2. Sitotoksisite derecelendirmesi.	37
Çizelge 3.1. Deney grupları	47
Çizelge 3.2. RT-PZR için kullanılan primerlerin özellikleri.....	56
Çizelge 4.1. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında ortalama floresan yoğunluğu ve relatif floresan yoğunluğu.	63
Çizelge 4.2. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdeleri.	66
Çizelge 4.3. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdeleri.	68
Çizelge 4.4. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında sitotoksisite derecelendirilme sonuçları.....	72
Çizelge 4.5. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan önce ve sonra ölçülen LDH aktivitesi, LDH artışı.	73
Çizelge 4.6. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan önce ve sonra ölçülen LDH aktivitesi, LDH artışı.	74
Çizelge 4.7. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra glukoz tüketimive laktat üretimi ..	76
Çizelge 4.8. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra glukoz tüketimi ve laktat üretimi .	78
Çizelge 4.9. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra verim faktörleri.	80
Çizelge 4.10. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra hücre döngüsü fazlarının dağılımı	97
Çizelge 4.11. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra hücre döngüsü fazlarının dağılımı	101

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AO	Akridin oranj
APC	Adenomatöz polip coli
bç	Baz çifti
BSA	Sığır serum albümin
cDNA	Komplementer DNA
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indole
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
F-aktin	Filamentöz aktin
FSS	Fötal sığır serumu
FXD5	Disaderin
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IDM	Işık duyarlı madde
IF	İmmünfloresan
LDH	Laktat dehidrogenaz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit
1O_2	Singlet (reaktif) oksijen
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PDT	Fotodinamik terapi
PH	Fotofirin
PI	Propidyum iyodür
PİZ	Populasyon ikilenme zamanı
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PZR	Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
Sit-c	Sitokrom-c

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser dünya çapında erkeklerde akciğer ve prostat, kadınlarda ise akciğer ve meme kanserinden sonra üçüncü sırada en sık görülen kanserdir (American Cancer Society, 2011). Kolorektal kanser Amerika'da kanserden ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır ve tanı konulan hastaların % 37,2'si derece-3, % 27,9'u derece-2 kolon kanseridir. Tedavi süreci sadece cerrahi rezeksiyon (çıkartıp alma) ile olmakta ve % 50 oranında başarı ile yaşam 5 yıla kadar uzatılabilmektedir. Cerrahi işlemin yanı sıra kemoterapi, radyoterapi de sıklıkla kullanılan tedavi yöntemleridir (Yang et al., 2012). Dünyada 2020 yılına kadar her yıl 16 milyon yeni vakanın ortaya çıkacağı tahmin edildiğinden, bilinen tedavi yöntemlerine destek ya da alternatif olacak tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Yardım ve Mollahaliloğlu, 2007).

Tamamlayıcı ve alternatif tıp, geleneksel ilaç grubunda yer almayan, sağlığı korumaya ve iyileştirmeye yönelik ürünler ve sistemleri içermektedir. Bu tedavi şekillerinden biri olan fotodinamik terapi (PDT) son yüz yılda büyük önem kazanmıştır (Ackroyd et al., 2001). PDT ışık duyarlı maddeler (IDM) olarak adlandırılan bitkisel kökenli etken maddelerin ya da sentetik moleküllerin tercihen kanserli hücrelerce alınması avantajını kullanmaktadır. Kanser hücrelerinin belirli dalga boyunda ışıkla uyarıldığı PDT sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri (ROS) hücre ölümüne neden olmaktadır. PDT geleneksel kanser tedavilerine kıyasla ihmal edilebilir yan etki, düşük komplikasyon, yüksek kalitede hasta hayatı, tekrar edilebilirlik gibi büyük avantajlara sahiptir (Kleban et al., 2008). Bazı ülkelerde PDT mesane, baş ve boyun, akciğer, özefagus, serviks ve pankreas kanserinin tedavisinde kullanım için onay almıştır, ancak klinik kullanımı sınırlıdır (Agostinis et al., 2011). Klinik denemelerde en son noktaya gelmiş olan IDM'ler klorin, benzoporfirin, fitalosiyanın ve hiperisindir (Yoo and Ha, 2012).

PDT'de kullanılan hiperisin *Hypericum perforatum* (sarı kantaron) bitkisinden elde edilen, doğal ve güçlü bir IDM'dir. Hiperisin, tümörlü dokuda, damarda veya matrikste seçici olarak biriktikten ve ışıkla aktive edildikten sonra, ROS oluşumu nedeniyle tümörlü bölgeyi tahrip etmektedir. PDT sonrasında devreye giren çeşitli moleküler mekanizmalara bağlı olarak farklı hücresel olaylarla sonuçlanmaktadır. Bunlar biyostimülasyon, hasarlı hücrelerin tamiri ile hücresel kurtulma cevabı, apoptoz,

nekroz ya da otofajidir. Hücresel cevap, PDT protokolüne, IDM'nin yerleşimine, hücresel hasarın korunmasına, hücre içi enerji varlığına ve hücrenin genotipine göre büyük farklılık göstermektedir (Krammer and Verwanger, 2012).

Kanser teşhisinde ve kanserin yayılmasında bir gösterge olarak kullanılan hücre adezyon molekülleri ve hücre iskeleti konusunda oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. Ancak son yıllarda, kanser hücrelerinin yayılımını kolaylaştıran bir anti-adezyon molekülü olan disaderin bulunmuştur. Disaderin, çoğu kanser hücrelerinin yüzeyinde yer alan bir zar glikoproteinidir. Transmembran bir protein olan disaderin, hücre dışı matriks bileşenleriyle henüz tam olarak açıklanamayan etkileşimi sayesinde, kanser hücrelerinin bulunduğu bölgede tutunmalarını azaltarak diğer bölgelere yayılmalarını kolaylaştırmaktadır. Hücre içinde ise hücre iskeleti elemanlarıyla bağlantı yapmaktadır. Bu nedenle disaderin, tümör metastazı, hücre hareketliliği ve aktin filamentinin organizasyonu ile ilişkili bulunmuştur (Nam et al., 2007). Hiperisinin kolon kanseri hücrelerindeki anti-proliferatif etkisinin disaderin ve aktin ile olan ilişkisi hakkında yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Türkiye'de yetişen bir bitki türü olan *Hypericum perforatum*'dan elde edilen hiperisinin klinikte kullanımı henüz onay almamıştır. Bu konuda yapılacak mekanizmayı açıklayıcı çalışmalar sayesinde hiperisinin kullanımı için onay alınarak, hiperisin aracılı PDT'nin kanser tedavisinde tek başına ya da kullanımda olan tedavilerle birleştirilerek uygulanması mümkün olabilecektir.

Bu tez çalışması ile iki farklı derece kolon kanseri hücrelerinde hiperisin aracılı PDT'nin etki mekanizmasının araştırılması ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Yirmi birinci yüzyılda insan sağlığını tehdit eden en önemli hastalık kanserdir. 2008 yılı itibariyle dünya çapında yaklaşık 12,7 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmış ve 7,6 milyon kişi kanser sebebiyle ölmüştür (IARC, 2008). Her yıl 11 milyondan fazla insana kanser tanısı konmaktadır. Kanser, her yıl yaklaşık 7 milyon kişinin ölümüyle sonuçlandığından tüm dünyada meydana gelen ölümlerin yaklaşık % 12,5'inden sorumludur (Yardım ve Mollahaliloğlu, 2007).

Dünya çapında erkeklerde kanserden ölümlere akciğer, prostat ve kolorektal kanser; kadınlarda ise akciğer, meme ve kolorektal kanser neden olmaktadır. Meme, serviks, kolorektal, prostat ve akciğer kanser tiplerinin görülme sıklığı bilinçlenme, erken tanı ve alternatif tedavi yöntemleri ile azalırken; lösemi, myeloma, melanoma gibi bazı kanser tipleri için artışın önüne geçilememektedir. Başta Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institution, 2012) olmak üzere birçok sağlık ve kanser organizasyonları raporlarına göre, son yıllarda yeni tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere paralel olarak tüm kanser tiplerinde kanserden ölüm oranı hem kadınlarda hem de erkeklerde azalmaya başlamıştır. Bu oran ABD için 2001'den 2006 yılına kadar % 1,6 olarak belirlenmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nın 2008 yılı verilerine göre Türkiye'de erkeklerde en sık akciğer, mide, mesane, prostat ve kolorektal kanser; kadınlarda ise meme, kolorektal, mide, rahim, yumurtalık kanserine rastlanmaktadır (IARC, 2008). Dünyada kadınlarda ve erkeklerde en sık rastlanan üçüncü kanser tipi olan ve kanserden ölümlerde ikinci sırada yer alan kolorektal kanser vakalarında azalma gözlenmesine rağmen, 50 yaş altında bu kansere yakalanma sıklığının artışı dikkat çekmektedir. Sağlıklı beslenme, sigarayı bırakma, tanı-görüntüleme sistemlerini daha çok kullanma ve ideal tedavi gibi kanser kontrol yöntemleri kullanılarak 2020 yılında kanser mortalitesinde % 50 azalma olabileceği düşünülmektedir. Kanserden ölümlerin % 30'unun, temel risk faktörleri değiştirilerek ya da bunlardan uzak durularak önlenbilir olduğu bilinmektedir (Edwards et al., 2010).

Sağlık Bakanlığı'nın 2000-2006 yıllarını kapsayan çalışmasına göre, Türkiye'de yaklaşık 396 bin kanser vakası bulunmaktadır. Her yıl 140 bin kişi kanserden ölmekte, bu rakamın önümüzdeki 20 yılda 500 bine çıkacağı tahmin edilmektedir. Her

yıl ortalama 150 bin yeni kanser tanısı konmakta, 20 yıl içinde hasta sayısının 1,5 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Eser ve ark., 2012).

2.1. Kanser

Kanser, kendi normal sınırları dışında çoğalıp komşu vücut bölgelerini istila edebilen ve diğer organlara yayılabilen anormal hücrelerin hızlı çoğalmasıdır (Salvador, 2008). Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıyla aşırı miktarda artan hücre sayısının, normal koşullarda gerçekleşen hücre kaybıyla dengelenemediği bir düzen bozukluğu olarak da tanımlanmaktadır. Bu dengesizlik, hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından kaynaklanmaktadır (Casciato and Lowitz, 2000). Fiziksel karsinojenler (ultra viyole ve iyonlaştırıcı radyasyon), kimyasal karsinojenler (asbest, sigara), biyolojik karsinojenler (Hepatit B, İnsan papilloma virüs, Helikobakter, parazit enfeksiyonu [şistozomiaz], mikotoksinler [aflatoksin]) gibi dış etkenler de kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Wolfe, 1994). Kanser hücresinin fizyolojisindeki temel değişiklikler: büyüme sinyali için kendi kendine yeterli ve büyüme durdurucu sinyallere duyarsız olması, programlı hücre ölümünden kaçabilmesi, limitsiz çoğalma potansiyeline ve damar oluşumu devamlılığına sahip olması, doku istilası ve metastaz yapabilmesidir (Hanahan and Weinberg, 2000).

Casciato ve Lowitz (2000)'e göre kanser hücrelerini normal hücrelerden farklı kılan bazı özellikler şu şekilde özetlenmiştir:

- **Ölümsüzlük (immortalite):** Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünebilmektedir. İmmortalite mekanizmalarından biri kromozom uçlarında tekrarlı baz dizileri olan telomerlerdir. Normal somatik hücrelerde telomerler kıaldıkça hücre yaşlanması başlamakta ve sonunda çoğalma kapasitesi yitildiğinden hücreler ölmektedir. Fakat kanser hücrelerinde ve kök hücrelerde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilediğinden hücreler sınırsız sayıda çoğalabilmektedir.
- **Genetik kararsızlık:** Bu durum, DNA tamirindeki ve DNA'daki yanlış eşleşmeleri tanımadaki sorunlardan kaynaklanmaktadır ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açmaktadır. Kanser hücreleri bölündükçe proliferasyon kontrol mekanizmalarına daha az yanıt veren kopyalar oluşturmaktadır. Ayrıca, bu

kopyaların yabancı ortamlarda yaşama yeteneği artmakta ve hücreler böylece metastaz yapabilmektedir.

- **Kontakt inhibisyonun kaybı:** Normal hücreler, çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde (monolayer) kapladıklarında kontak inhibisyon sayesinde bölünme özelliklerini kaybetmektedir. Kanser hücreleri ise bağımsız olarak birden fazla tabaka oluşsa bile bölünmeye devam edebilmektedir.
- **Metastaz:** Metastaz benign (iyi huylu) tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Hücre dışı maddeye yapışmadan sorumlu olan hücresel proteinlerin kaybı, hücrelerarası iletişim bozukluğu, hücrelerin bazal laminaya tutunmalarındaki anormallikler, bazal lamina üretimindeki anormallikler, metalloproteazlar ile bazal laminanın yıkılması gibi nedenlerle metastaz gerçekleşmektedir.
- **Hücresel adezyonda azalma:** Normal hücrelerin hücre zarındaki proteinler sayesinde birbirine ve zemine yapışma özelliği, kanser hücrelerinde azalmıştır. Bu durum kanser hücrelerinin, normal hücrelerin arasına sızmasında kolaylık sağlamaktadır.

2.2. Kanser Nedenleri

Casciato ve Lowitz (2000), kanserin nedenlerini alt başlıklar halinde özetlemiştir.

2.2.1. Apoptozun engellenmesi

Farklı kanser hücrelerinde B hücre lenfoma-2 (BCL-2) gen ailesine ait Bax, Bad, Bcl-XS gibi pro-apoptotik genlerde mutasyon ya da Bcl-2, Bcl-XL gibi anti-apoptotik genlerin aşırı ifade olması; Fas, TRAIL reseptör gibi ölüm reseptör genlerinde mutasyonlar, kaspaz ifadesinde kayıplar, kaspaz inhibitörlerinin aşırı ifadesi gibi mekanizmalarla apoptozun engellenmesi mümkündür. Bu mekanizmalar kanserin tipine göre değişiklik göstermektedir.

2.2.2. Hücre proliferasyonunu anormal şekilde uyaran genetik bozukluklar

Bu bozukluklar normal proliferasyon mekanizmasından bağımsız olarak oluşmaktadır. Reseptörlerin veya sinyal aktarıcı proteinlerin mutasyonları veya aşırı üretimleri, hücrelerin büyüme faktörlerinden veya diğer mitotik faktörlerden bağımsız hale gelmesine ve böylece kendi başına hücre bölünmesine yol açmaktadır.

2.2.3. Tümör baskılayıcı genlerdeki anormallikler

Bu genler hücre döngüsünün baskılanmasından sorumlu olan genlerdir. Bu genlerde mutasyonlar olduğunda, organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişmektedir. Retinoblastoma geni (RB1) tümör baskılayıcı genler arasında ilk keşfedilen gendir. Sonrasında, sık rastlanmayan veya nadir kalıtsal hastalıklarda diğer baskılayıcı gen anormallikleri de saptanmıştır. Wilm's tümörü (WT1), ailevi polipozis, ailevi melonoma (CDKN20) ve ailevi meme ve yumurtalık kanserleri (BRCA-1 ve BRCA-2) diğer baskılayıcı gen anormalliklerine örnek olarak verilebilmektedir. Bu genler içinde en önemli gen p53 baskılayıcı genidir. Bu genin ürünü olan p53 proteini birçok aktiviteye sahip olan ve hücre döngüsünü baskılayan bir proteindir. Bu protein nükleotid yanlış eşleşmeleri, DNA sarmalının kırıkları gibi DNA lezyonlarını ve ayrıca radyasyon veya kemoterapi ile oluşan DNA hasarlarını saptayabilmektedir.

2.2.4. Tümör anjiogenezi

Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda yeni damar oluşturmaya başlayan tümör, daha hızlı büyüme ve invazyon kapasitesi kazanmakta ve metastaz yapma potansiyeli artmaktadır. Kan desteği olmayan kanser kolonileri çap olarak 1 mm'den daha fazla büyümmezler. Kan akımı sağlandıktan sonra, hücre ölüm hızı azalır ve tümör hızla büyür.

2.3. Kolon Kanseri

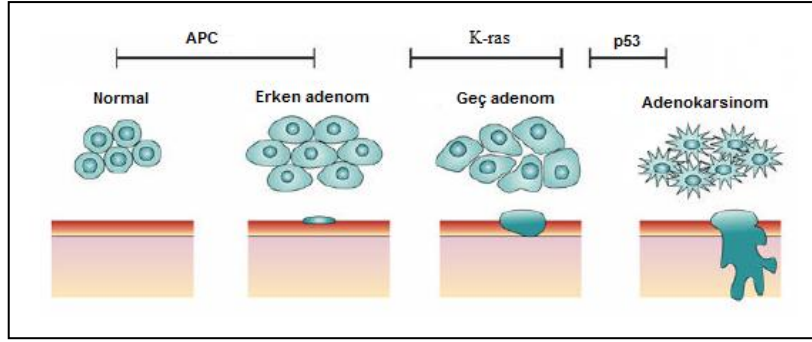
Son on yılda kanser genetiği ile ilgili artan bilgilere ve yeni ilaç tedavilerine rağmen, kanser dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Yılda yaklaşık 782 bin kişiye kolon kanseri tanısı konmaktadır (Farkas et al., 2011). Kolonik polip sendromu ilk kez 200 yıl önce tanımlanmış olmasına rağmen tüm dünyada kolon kanseri, kanserden ölümlerin % 8'ini oluşturması ile dördüncü sırada yer almaktadır. Tüm vakaların, % 60'ı daha gelişmiş ülkelerde ortaya çıkmaktadır. Kolon kanseri sıklığı (insidans), erkeklerde kadınlardan daha yüksek bulunmuştur (IARC, 2008).

Kalın bağırsağın ilk 1,8 m'lik kısmı kolon, son 15 cm'lik kısmı rektum olarak adlandırılmaktadır. Kolon kanseri, kolon dokusunda malignant (kötü huylu) hücrelerin olduğu bir hastalıktır. Tüm kalın bağırsak kanserlerinin % 90'ı, bağırsağın iç

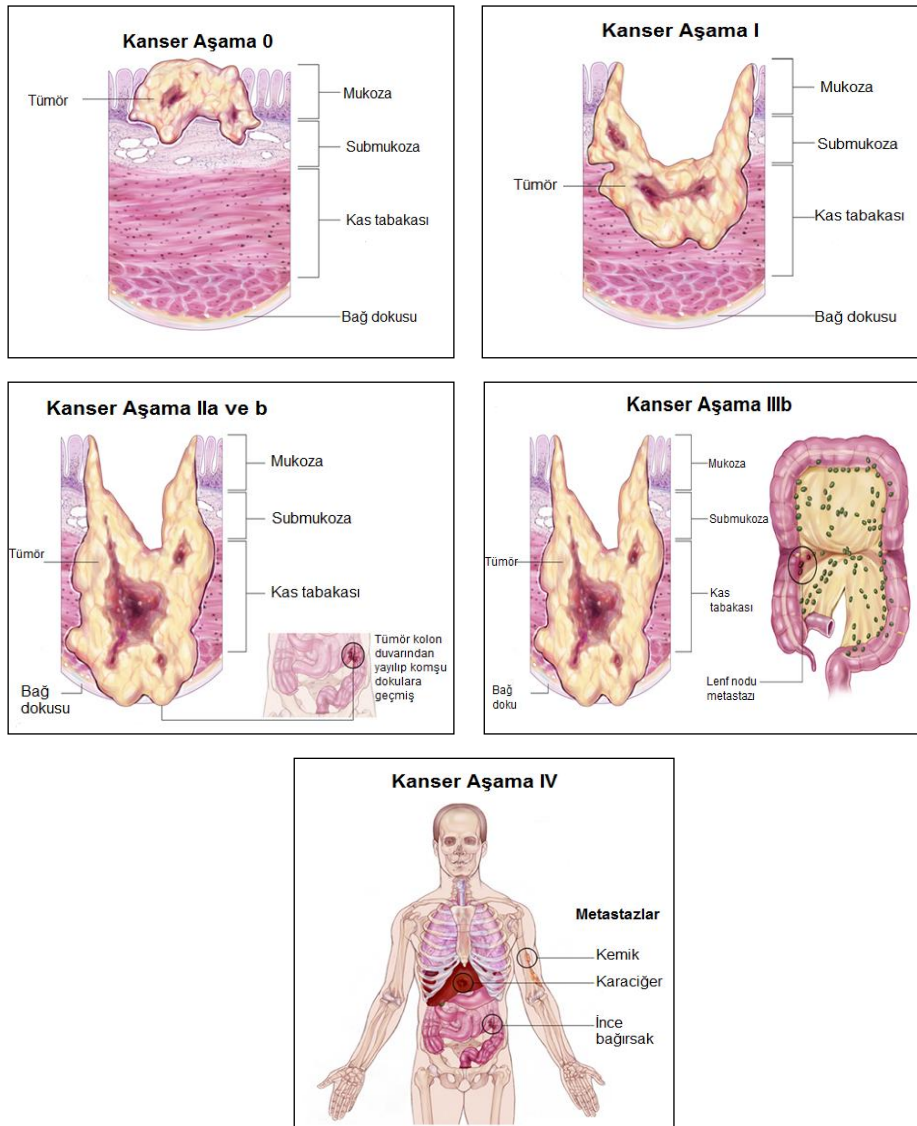
yüzeyini örten mukozanın bağırsak lümenine doğru gelişen şişkinlik olarak adlandırılan polip zemininde gelişmektedir (Dollinger and Rosenbaum, 1997). Polipler kalın bağırsağın daha çok son kısımlarında gözlenmektedir. Anormal hücre proliferasyonu olan neoplazi gelişiminin altında birikmiş genetik değişiklikler yatmaktadır. Kolorektal kanser, en az yedi genetik değişiklik ile temsil edilen çoklu basamakları içeren bir olaydır. Ayrıca adenomatöz polip coli (APC) geninin işlevinin etkilendiği Ailevi Adenomatöz Polipozis (FAP) ve DNA tamir mekanizmasının bozulduğu Kalıtsal Non-Polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC)'de tek bir gendeki değişikliğin kalıtılması kolorektal kanser ile sonuçlanabilmektedir (American Cancer Society, 1997).

Kolorektal kanser hastası için bir yıl yaşama oranı % 82, beş yıl yaşama oranı % 61'dir. Daha erken tanı konulduğu durumda beş yıl yaşama yüzdesi % 91'e kadar çıkmaktadır, ancak kolorektal kanserlerin % 40'tan daha azı bu evrede tespit edilmektedir. On yıl yaşama oranı ise toplamda % 50'dir (American Cancer Society, 1997).

Adenom, bez kökenli bir benign tümör çeşididir. Adenom kolon, adrenal bez, hipofiz, tiroit, pankreas gibi birçok organda gelişebilmektedir. Adenom, epitel içi neoplazi gösteren premalignant lezyonlardır, ancak mukoza içine invazyon olmamıştır. Zamanla bu iyi huylu büyüme, ilerleyerek malignant olabilmekte bu durumda ise adenokarsinom olarak adlandırılmaktadır. Adenom-karsinom dönüşümü aşama aşama onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile meydana gelmektedir (Vogelstein et al., 1988). Normal epitelin adenom ve karsinoma dönüşümü, DNA'daki metil gruplarının kaybı, K-ras gibi onkogenlerin aktivasyonu, p53 geninin mutasyonu ve inaktivasyonu ile birlikte gerçekleşmektedir (Şekil 2.1). Ayrıca, APC mutasyonunu takiben gastrin gen ifadesinin aktive olduğu, gastrin ve reseptörlerinin adenom-karsinom dönüşümünde önemli role sahip olabileceği düşünülmektedir (Busuttil, 2011). Mukoza içindeki adenokarsinom, lamina propria stromasına neoplastik hücrelerin invazyonu ile karakterize olmaktadır. Erken kolorektal kanser, hem mukoza içi hem de mukoza altındaki adenokarsinomları içermektedir. Mukoza altına inen, lenf düğümü ve damar içine invazyonu içeren adenokarsinom (Şekil 2.2), ileri safhadaki kolorektal kanser olarak tanımlanmaktadır (Kudo et al., 2008).



Şekil 2.1. Adenom-karsinom dönüşümü (Busuttil, 2011).



Şekil 2.2. Kolorektal kanserde aşamalar (American Society of Clinical Oncology, 2005).

Kolon kanserinin geleneksel tedavisinde, cerrahi yöntemle tümürlü bölge çıkarılmakta, kemoterapi ve/veya radyoterapi ile tedaviye devam edilmektedir. Ancak,

bu yaklaşımlar yüksek metastaza uğrayan hastalıklarda her zaman etkili değildir ve yeni tedavi metotlarının geliştirilmesi gereklidir. Kolon kanseri hastalarının % 40'ından fazlasında metastaz gelişmektedir (Tsuji et al., 1997; Howlader et al., 2010).

Tamamlayıcı ve alternatif tıp, geleneksel ilaç grubunda yer almayan, sağlığı korumaya ve iyileştirmeye yönelik ürünler ve sistemleri içermektedir. Tamamlayıcı tıp, geleneksel tıp ile birlikte kullanılabilirken, alternatif tıp geleneksel tıbbın yerine kullanılmaktadır. Tamamlayıcı ve alternatif tıbbın, tüm bireyler için uygunluğu ve etkinliği kesin olmadığından bu uygulamalar geleneksel tıbbın bir parçası olarak değerlendirilmemektedir. Bu uygulamaların temel iki işlevi, var olan hastalığı tedavi etmek ve hastalığı önceden önleyip sağlığı korumaktır (Kraft, 2009).

Kolorektal kanser, hem hastalığın yatkınlığını hem de epitel hücrelerinin somatik evrimini araştırmak için güzel bir modeldir. Bunun nedeni, kolorektal kansere genetik yatkınlığın iyi tanımlanmış olması ve sık rastlanan bir kanser türü olmasıdır (Bodmer, 2006).

2.4. Kanser ve Apoptoz

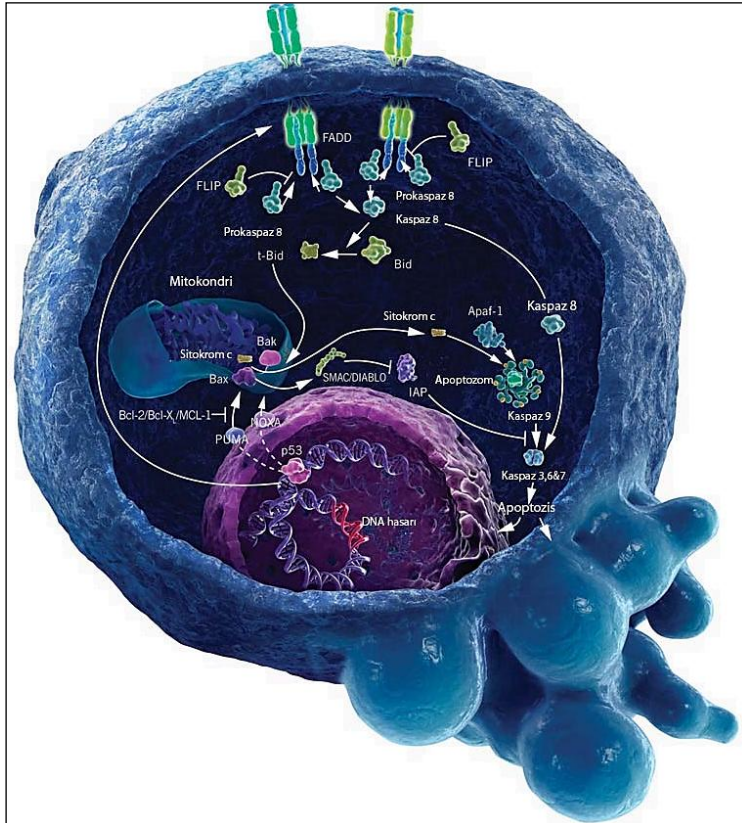
Apoptoz, immün cevabın oluşmadığı hasarlı ya da ihtiyaç duyulmayan hücrelerin ölümü ile sonuçlanan moleküler olaylar zinciri olarak tanımlanmıştır (Fadeel and Orrenius, 2005). Apoptozun başlangıcı kısmi olarak proapoptotik ve antiapoptotik faktörlerle düzenlenen, iç ve dış sinyal yollarının karmaşık bir ağını içermektedir (Celli et al., 2010). Normal bir hücrede apoptoz, azalan büyüme faktörleri, iyonlaştırıcı radyasyon, ısı şoku ve toksinlere cevap olarak ya da hücrenin çevresindeki dokudan ayrılması, bakteriyel enfeksiyon ve onkojenik sinyal gibi diğer uyaranlar karşısında başlamaktadır (Ashkenazi, 2008).

Apoptoz, hücre zarında çıkıntılar, kromatin yoğunlaşması, çekirdek fragmentasyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi birçok morfolojik değişikliklerle karakterize olmaktadır. Ayrıca, fosfatidilserinlerin hücre zarının dış yüzeyine geçmesi, mitokondriyal zar geçirgenliğinde değişiklikler, sitokrom c (sit-c) gibi proteinlerin mitokondri iç zarından salınması gibi biyokimyasal özellikleri de bilinmektedir.

Mitokondri, mitokondriyal geçiş porunun açılması ve sit-c salınması gibi apoptotik ve nekrotik ölüm yollarının başlamasını sağladığından hücre ölümünde önemli bir role sahiptir. Sit-c, suda çözünebilen, mitokondri iç zarında bulunan ve hücre

solunumunda kritik olan 15 kDa büyüklüğünde küçük bir hem proteindir. Sit-c'nin sitosoldeki birikimiyle, apoptotik hücre ölümünden sorumlu olan proteolitik kaspaz (sistein aspartat-özümlü proteaz) yolu ve DNA fragmentasyonunu yapan enzimler aktive olmakta, sonrasında sit-c periferel dolaşıma salınmaktadır. Bu salınmanın mekanizmalarından ilki, apoptoz sırasında seçici zar anyon kanallarından ya da protein porlarından kalsiyum aracılı sit-c salımı, ikincisi de nekrotik ölümden genişlemiş ve şişmiş mitokondrinin bozulmuş dış zarından salınmasıdır (Miller et al., 2008).

Apoptoz olayında, başlatıcı veya etkin kaspaz yolağını içeren birçok faktör rol oynamaktadır. Kaspaz aktivasyonu, apoptozun birçok morfolojik ve biyokimyasal olayını başlatmaktadır. Kaspaz-3 temel etkin kaspazdır ve hücrede birçok çoklu proteinin parçalanmasından sorumludur. Mitokondriyal geçirgenlik artışıyla açılan por, mitokondriyal iç zar potansiyelinin kaybına neden olarak, sit-c salımını başlatmaktadır. Sit-c, apoptotik proteaz aktive edici faktöre (APAF-1) bağlanarak, ATP ya da dADP varlığında apoptozom adı verilen oligomerik bir kompleks oluşturarak prokaspaz-9'u aktive etmektedir (Şekil 2.3). Kaspaz-9 da efektör kaspazlar olan kaspaz -3, -6, -7'yi aktive etmekte, bu da mitokondri bağımlı apoptoz ile sonuçlanmaktadır (Miller et al., 2008).



Şekil 2.3. Apoptozda meydana gelen hücre içi olaylar (<http://www2.sbg.ac.at/pr/News/news.shtml?kategorie=detail&id=12084>)

Apoptozun engellenmesi kanserin gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir süreçtir (Ashkenazi, 2002). Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçma ve bölünmeye devam etme yeteneği bu hücrelere özgü en temel özelliktir ve kanser tedavisinin hedefini oluşturmaktadır (Hanahan and Weinberg, 2000). İç ve dış apoptotik yolların her ikisini de hedefleyerek apoptozun başlamasını sağlayan yeni moleküller geliştirilerek, tümör hücre proliferasyon mekanizmasını anlamak ve yeni etkili tedaviler geliştirmek mümkün olabilecektir (Jin and El-Deiry, 2005).

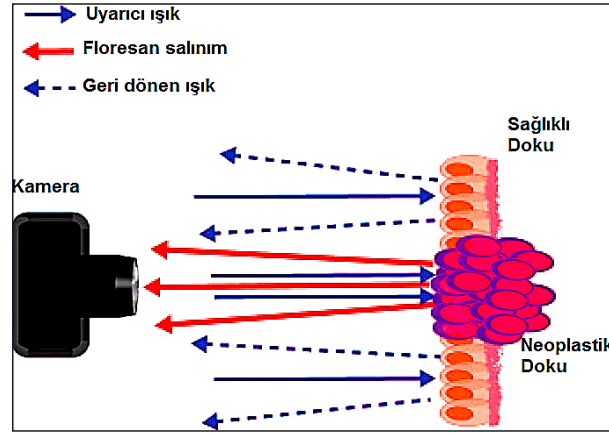
Dış yolak, endojen ve diğer proapoptotik reseptör benzerleri gibi dışardan gelen çoklu proapoptotik sinyal ile aktive olabilmektedir. İç yolak ise hücredeki gelişimsel olaylar ya da DNA hasarı gibi hücresel stres sonucu başlamaktadır. Kanser hücrelerinde çok düşük seviyelerde apoptoz olmakta ve DNA onarımı çok nadir olarak gerçekleşmektedir. Bazı kemoterapötik ajanlar, apoptozun indüklenmesinde etkin rol oynamaktadır (Farkas et al., 2011).

2.5. Fotodinamik Terapi

Işık 3000 yıldır hastalıkların tedavisinde kullanılmasına rağmen, geliştirilmesi son yüz yılın içinde olmuştur (Ackroyd et al., 2001). PDT, IDM olarak adlandırılan toksik olmayan ilaç veya boya gibi maddelerin sistemik veya bölgesel olarak alınması ile lezyon, kanser vs. gibi hastalıkların tedavi edilmesidir. Fotodinamik etki için IDM, ışık ve oksijen gereklidir. IDM, kendi absorpsiyon spektrumuna uygun dalga boyunda ışıkla uyarıldığında aktive olmakta ve yüksek enerjili oksijen türleri (singlet oksijen ve oksijen içermeyen radikaller) oluşmaktadır. Bu duyarlı maddelerin alımından bir süre sonra, lezyon belirli dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında oksijen varlığında sitotoksik maddelerin oluşmasıyla doku hasarı ve hücre ölümü gözlenmektedir (Rai et al., 2010).

PDT'nin minimal toksisite göstermesi, bölgesel etkili oluşu ve daha ucuz bir işlem olması diğer tedavi yöntemlerine iyi bir alternatif olmasına neden olmuştur. Ayrıca kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi operasyona kıyasla işlem sonrası iyileşme süreci haftalarca değil birkaç saat ya da gün sürmektedir. Kemoterapinin aksine, ışık sadece istenen dokuya uygulanmakta, ışık uygulanmayan bölgeler etkilenmediğinden buradaki hücreler ölmemektedir (Rai et al., 2010).

Beyin, akciğer, meme, özefagus, deri, pankreas gibi bazı kanserler için PDT'nin klinik denemeleri yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar tedavi için umut vermektedir (Dolmans et al., 2003). Geleneksel kemoterapiye göre PDT, IDM'nin aktivasyonu için kullanılan ışığın belirli bir bölgeyle sınırlandırılması sayesinde ilave bir seçicilik sağlamaktadır. Bugüne kadar pek çok IDM değerlendirilmiştir, ancak bunların birkaç tanesinin hasta uygulamaları başarılı sonuç vermiştir. Bu maddeler doğal olarak floresan ışığa verirler, bu sayede hastalığın görüntülenmesi ve yerinin tespitinde (fotodinamik teşhis) kullanılmaktadır (Şekil 2.4). Bu yöntem mesane kanserinin tanısında rutin olarak kullanılmaktadır (Celli et al., 2010). IDM'ler normal dokuya göre tümörlü bölgede daha yüksek oranda birikmektedir.



Şekil 2.4. Işık duyarlı bir madde ile tümörlü bölgedeki floresan ışımının tespiti (Celli et al., 2010).

PDT'nin hücre bölünmesine etkisi bilinmekte, bunun nedeni olarak mikrotübül hasarı meydana getirmesi gösterilmektedir. Bu etkisi belirli koşullarda hücre ölümünü indüklemektedir (Berg et al., 1990). Fotooksidatif hasar, doğrudan tümör hücresinin ölümünü indüklemenin yanı sıra, damar oluşumunu engelleyerek oksijen ve besin yokluğundan dolayı tümör hücrelerinin inaktive olmasına ve immün cevap oluşmasına neden olmaktadır (Fingar, 1996; Korbelik et al., 1997).

PDT'nin kanser tedavisinde tercih edilmesinin nedeni, tekniğin özgüllüğüne ve seçiciliğine dayanmaktadır. Işık duyarlı madde özellikle malignant dokuda biriktiğinden, ışık doğrudan bu bölgeyi hedef almakta ve ROS üretimini başlatarak bu bölgede hücresel hasar oluşturmaktadır. Tümörlü olmayan bölge ise etkilenmemektedir. Ancak ovaryum kanseri gibi yaygın tümörlerde normal dokuda ışık duyarlı madde birikimi sorun yaratabilmektedir. İdeal ışık duyarlaştırıcı maddeler,

aktive edici ışığın yokluğunda toksik değildir. Tümörlü doku tarafından IDM'nin seçici olarak alınma nedenleri şu fizyolojik farklılıklarından kaynaklanmaktadır (Häder and Jori, 2003):

- Tümörlü bölgede dokular arası sıvı hacminin daha fazla olması,
- Hücre dışı pH'nın daha düşük olması,
- Lipoproteinler için daha fazla sayıda reseptör içermesi,
- Daha fazla sayıda makrofaj içermesi,
- Mikrodamar sisteminin daha güçlü olması,
- Düşük lenf drenajı olması,
- Daha yoğun yeni sentezlenmiş kollajen fibriller içermesidir.

2.5.1. Işık ve oksijen

PDT'de çoğunlukla 400-700 nm aralığına giren görünür ışık kullanımı uygun olsa da, endojen moleküller 600 nm altındaki ışıkta, çoğu fotonu absorbe ettiğinden pratikte 600-900 nm aralığındaki ışık kullanılmaktadır. Daha uzun dalga boylarındaki ışık dokuya daha fazla girme özelliğindedir. Ancak, 900 nm üzerindeki dalga boyları yeterli singlet (reaktif) oksijen (1O_2) oluşumunu sağlayamadığından tercih edilmemektedir. PDT'nin başarılı olmasında IDM'nin ışıkla aktive edilmesi çok önemlidir (Häder and Jori, 2003). PDT'de lazer ışık kaynakları (argon iyon pompalı lazer, katı faz diot lazer vs.), lazer olmayan ışık kaynakları (ark lambaları, mavi ışık floresan tüpler, akkor lambaları) ve LED (Light Emitting Diodes) kullanılabilir. Lazer ışık çoklu lezyonlarda aynı anda kullanım ve küçük lezyonlarda kullanım avantajı sağlar, ancak pahalıdır (Kesici ve Yıldırım, 2000). Standart lazer ve düşük güç LED teknolojileri ile dokuda 1cm'den daha fazla derine gidilememektedir. Bu nedenle deri altındaki ve iç organlardaki tedavide kullanımı kısıtlıdır. Bu durumda daha derin dokulara ulaşmak üzere problemler ya da yeni yüksek güç LED teknoloji kullanılmaktadır. Bazı durumlarda ışığın dozunu arttırmak etkiyi arttırmak yerine azaltılabilmektedir. Benzer şekilde düşük ışık dozu ve/veya düşük konsantrasyonda IDM kullanıldığında oluşan doku hasarı tamir edilebilir ve geri dönüşümlü olabilmektedir. Ulaşılan bu eşik noktası normal ve tümör dokusunda farklı olduğundan bu durum da ilave bir seçicilik sağlamaktadır (Häder and Jori, 2003).

PDT'nin etkinliğinin oksijen bağımlı olduğu gösterilmiştir (Dougherty, 1986). Oluşan 1O_2 , bir reaktif oksijen türüdür ve biyolojik sistemlerde oluşan hasardan sorumludur.

Oksijen bağımlılığı kullanılan IDM'nin yapısına göre değişmektedir. Hipoksik koşullarda fotositotoksisite gözlenmemekte ve hücrelerde bir hasar oluşmamaktadır (Thomas and Pardini, 1992).

2.5.2. Işık duyarlı maddeler

Kanserli bölgenin seçici olarak yok edilmesine yönelik olan, bu bölgenin tespiti, teşhisi ve tedavisi için kullanılabilir ajanlara önemli ölçüde ihtiyaç duyulmaktadır. Hastalığın yok edilmesinde seçicilik ve özgüllük, dıştan uygulanabilen, bölgesel sitotoksisiteyi sağlayan, ancak çevre dokulara çok az etkili olan ajanların kullanılmasıyla artırılabilir. (Rai et al., 2010). PDT'de IDM olarak işlev görebilen bitki özütünden karmaşık sentetik makromoleküllere kadar yüzlerce doğal ya da sentetik molekül bulunmaktadır (Sharman et al., 1999).

Araştırmacılar, 100 yıldan daha uzun bir süre öncesinde ışık ile bazı kimyasalların birleşiminin hücre ölümünü indüklediğini gözlemiştir. 1900 yılında Oscar Raab akrinin varlığında ve belirli dalga boyundaki ışık altında bazı *Paramesyum* türlerinin öldüğünü rapor etmiştir (Raab, 1900). Bunu, dermatolik hastalıkların ve deri kanserinin tedavisinde kullanılan maddelerin keşfi izlemiştir. PDT, çoğu ülkede sağlık kurumu tarafından birçok kanser türünün tedavisi için onaylanmıştır. 1960'ların başında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (US-FDA) hematoporfirin (HpD) türeviden olan fotofirin (PH) isimli ilacın klinik uygulamalarına onay vermesiyle, PH birçok kanserin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde farklı tipte IDM'ler, akciğer, özefagus, kolon, periton, pleura, genito-üriner sistem, göz ve beyin tümörlerinin yanı sıra arteroskleroz, enfeksiyon hastalıkları ve romatoid artiritin PDT ile tedavisinde kullanılmaktadır (Kesici ve Yıldırım, 2000).

PH, metviks, letuks ve foskan gibi birçok IDM'nin kanser tedavisinde klinik kullanımı için onay alınmıştır. PH, mesane kanseri tedavisinde kullanımı 1993 yılında onaylanan ilk IDM'dir. Daha sonra da en sık kullanılan IDM olmuştur (Dolmans et al., 2003). IDM'lerin birbirinden farkı, hücrenin farklı kısımlarını hedef almasından kaynaklanmaktadır. Hücre DNA'sını hedef alarak hasar oluşturan radyoterapinin aksine, çoğu IDM hücrenin diğer kısımlarını hedef almaktadır. IDM'nin hücre içi yerleşiminin belirlenmesinde, hidrofobik özelliği, yükü ve pKa gibi fizikokimyasal özellikleri önemlidir (Salvador, 2008). Örneğin m-tetrahidroksifenilklorin (mTHPC) çekirdek zarında bulunurken, 5-Aminolevulinik asit (5-ALA) mitokondride, metilen

mavisi ise lizozomda bulunmaktadır (Wilson et al., 2005). Ancak birinci nesil IDM'lerin karmaşık yapıları, ışığı düşük absorpsiyon katsayıları, tümörlü doku için daha az seçici olmaları ve deri hassasiyeti oluşturmaları nedeniyle bazı kısıtlamalara sahiptir. Hiçbir IDM, her olası uygulama için ideal olamayacağından, PH gibi ilk nesil IDM'in eksikliklerini giderebilmek için ikinci nesil IDM'ler geliştirilmiştir.

IDM etki mekanizmasında hücre içinde buldukları yer önemli rol oynamaktadır. PDT sonrasında oluşan 1O_2 'nin yarı ömrünün 0,05 μ s'den kısa olması, olduğu bölgeden ancak 0,02 μ m ilerlemesine imkan sağlamaktadır. Çoğu IDM'nin çekirdek dışında bulunması, PDT'nin düşük mutajenite potansiyeli taşıma nedenini açıklamaktadır. IDM'den katyonik olanlar hem çekirdek hem de mitokondride bulunurken, lipofilik olanlar zar yapılarına tutunma eğilimindedir ve suda çözünebilir olanlar lizozomlarda bulunmaktadır. Lipofilik IDM daha yüksek kuantum verimine sahiptir. Suda/yağda çözünürlük kadar, moleküler ağırlık ve yük dağılımı da etkili faktörler arasında yer almaktadır (Häder and Jori, 2003).

Sharman ve arkadaşlarına (1999) göre PDT için ideal IDM şu özelliklere sahip olmalıdır:

- Kimyasal olarak bilinen, saf ve sabit içerikli,
- Karanlıkta minimum toksisiteye sahip, sadece ışık varlığında sitotoksik,
- Seçici olarak hedef doku tarafından alınan,
- Vücuttan hızla atıldığı için düşük sistemik toksisite gösteren,
- Uzun ömürlü üçüncü seviyesiyle yüksek fotokimyasal reaktiviteye sahip, 1O_2 ve diğer ROS'ları etkin olarak üreten,
- Işığın dokuya maksimum nüfuz ettiği ve klinik uygulamalara imkan veren uzun dalga boylarında (600-800 nm) yüksek sönüm katsayısı ile güçlü absorpsiyona sahip olmalıdır. Ayrıca bu aralıkta daha ucuz diot lazerler kullanılabilirdiğinden bu özellikleri klinik kullanım için de önemlidir

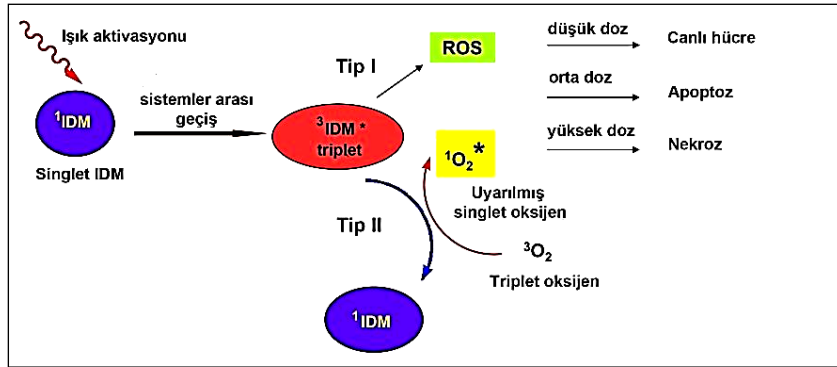
2.6. PDT'nin Etki Mekanizması

Işımanın yapılmasıyla IDM uyarılarak en düşük enerji seviyesinden (S_0) bir üst seviyeye çıkmaktadır (S_1). IDM, uyarıldıktan sonra bu seviyeden, sistemler arası geçiş yaparak üçüncü seviyeye (T_1) (Triplet state) geçiş yapabilmektedir (Şekil 2.5). IDM üçüncü seviyede daha uzun ömürlü olduğundan etrafındaki molekülleri de uyarabilmektedir. PDT sırasında oluşan sitotoksik moleküllerin oluşumunun bu

seviyede gerçekleştiği kabul edilmektedir. Uyarılmış üçüncü seviyedeki IDM, 3 farklı yoldan tepki göstermektedir: oksijen bağımlı Tip I ve Tip II reaksiyonlar (Foote, 1991) ve oksijen bağımsız Tip III reaksiyon (Salvador, 2008).

Tip I reaksiyonda, uyarılmış IDM ve substrat arasında hidrojen atomunun ayrılması veya elektron transferi reaksiyonu gerçekleşmekte, bu da serbest radikal ve radikal iyonları ile sonuçlanmaktadır. Bu serbest radikaller çok reaktiftir ve moleküler oksijen ile etkileşime girerek süperoksit anyonu (O_2^-) veya hidroksil radikali (OH^-) gibi reaktif oksijen türleri oluşumuna ya da tamir edilemeyen biyolojik hasar meydana gelmesine sebep olmaktadır (Salvador, 2008).

Tip II reaksiyonda ise üçüncü seviyedeki uyarılmış IDM ile moleküler oksijen arasında enerji aktarımı gerçekleşmekte ve birinci seviyedeki uyarılmış oksijen (1O_2) oluşmaktadır (Şekil 2.5). Bu oksijen çok reaktiftir ve birçok biyolojik madde ile etkileşime girerek, oksidatif hasar ve son olarak hücre ölümüne neden olmaktadır.



Şekil 2.5. Işık duyarlı maddelerin fotoaktivasyon mekanizması ve indüklediği hasarlar (Vandenbogaerde et al., 1998).

PDT'de çoğunlukla Tip II reaksiyon baskın olmasına rağmen, düşük oksijen koşullarında ve daha polar bir çevre olduğunda Tip I reaksiyon daha önem kazanmaktadır (Sharman et al., 1999). Tip III reaksiyon ise oksijenin dahil olmadığı, IDM'nin uyarılmış halinin doğrudan substratla reaksiyona girdiği bir reaksiyondur. Bu reaksiyon, enerji aktarımı, elektron ya da hidrojen aktarımı ve substratla kovalent ürün oluşumu mekanizmaları ile işlev görmektedir (Salvador, 2008).

2.6.1. PDT'nin hücresel mekanizması

Hücreler PDT'ye farklı şekillerde cevap verebilirler. Bu cevap öldürücü doza bağlı olarak apoptoz ya da nekrozdur, öldürücü dozun altında ise hücreler kurtulma cevabı geliştirebilmektedir (Gomer et al., 1988). Bu cevaplar öncelikli olarak IDM'nin hücrede bulunduğu bölgeye bağlıdır, çünkü IDM'ye yakın ve oksijen konsantrasyonu fazla olan bölgeler ışıkla aktivasyon sonrasında daha fazla hasar görmektedir. Ayrıca hücre tipi ve PDT dozu da önemli rol oynamaktadır. PDT'nin en önemli hedefi tümör hücrelerini seçici olarak öldürmektir. Ayrıca, tümörlü bölgedeki damar sisteminde kan akışında durma, damar bozukluğu gibi değişikliklere yol açmaktadır. PDT, uygulanan hücrelerden sitokin ve diğer inflamatuvar düzenleyicilerin salımına neden olmakta ve immün cevabı başlatmaktadır (Agostinis et al., 2002).

2.6.1.1. Nekroz

Nektotik hücre ölümü, zarda lipid peroksidasyonu, lizozomal zar bozuklukları, zarda enzim inhibisyonu gibi olaylarla, organellerde ya da çekirdek bileşenlerinde meydana gelen hasarlar sonucu indüklenebilmektedir. Apoptozun tersine nekroz, karmaşık sinyal yolağı içermeyen daha az kontrollü bir hücre ölüm şeklidir. Lizozomda biriken IDM'lerin kullanıldığı PDT'de hücre ölümü lizozomal enzimlerin ve diğer toksik maddelerin salımı sonucunda olmaktadır. Ayrıca, lizozomda biriken IDM'in ışımadan sonraki birkaç saniyede mitokondriye yönelmesi de söz konusu olabilmekte ve IDM burada daha toksik olmaktadır (Häder and Jori, 2003).

2.6.1.2. Apoptoz

PDT'nin en dikkat çekici özelliği apoptoz olayını farklı yollarla hızlı bir şekilde başlatmasıdır. PDT ile indüklenen apoptozun iki mekanizmasından biri, apoptozom oluşumu öncesinde proapoptotik hücre ölüm sinyalini ve prokaspaz aktivasyonunu arttıran proapoptotik faktörlerin mitokondri iç zarından salınmasıdır. Diğeri ise, temel hücresel proteinleri parçalayarak hücre iskeletine, organellere zarar veren ve apoptoz için önemli enzimleri aktive eden kaspaz aktivasyonudur (Celli et al., 2010).

Mitokondride yerleşen IDM'ler lizozom ve hücre zarında biriken IDM'lere göre apoptozu daha hızlı başlatmaktadır (Dahle et al., 1999). Liu ve arkadaşlarına (1996) göre, mitokondriyal yerleşim gösteren IDM ile PDT'de mitokondriden sit-c salımı apoptozun indüklenmesi için önemli bir sinyal oluşturmaktadır. Birçok hücre tipinde

PDT'den sonra sit-c salımını, mitokondriyal geçirgenlik geçiş porlarının açılması ve mitokondriyal zar potansiyelinin hızlı kaybı izlemektedir. Sit-c kaybı, dATP, APAF-1 ve prokaspaz-9 arasında kompleks oluşumuyla devam ederek kaspaz yolağını açmakta ve kaspaz-3'ün hızlı artışıyla sonuçlanmaktadır. Kaspaz-3 ise DNA fragmentasyon faktörü (DFF), poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) gibi birçok proteinin parçalanması olayına karışmaktadır (Porter and Janicke, 1999).

Çoğu tümör hücresinde, hücreleri sitotoksik ajanlara daha az duyarlı yapan anti-apoptotik kontrol mekanizmaları bulunmaktadır. Örneğin, Çin hamsteri over hücre hattı (CHO) hücrelerinde ikinci nesil IDM'den biri olan silikon fithalosiyanın ile PDT sonrasında mitokondri dış zarında bulunan anti-apoptotik protein Bcl-2'nin, apoptozu engellediği rapor edilmiştir. Bunun nedeni Bcl-2'nin, sit-c salımını engellemesi ve PDT sonrası apoptozda önemli rol oynayan kalsiyum dengesini bozmasıdır (He et al., 1996).

2.6.1.3. Subletal PDT'ye cevap

PDT'den sonra nekrotik veya apoptotik cevap dışında PDT'nin dozuna, hücre tipine ve IDM'ye bağlı olarak hücreler kurtulma cevabı verebilmektedir. Bazı stres proteinleri PDT ile düzenlenerek hücrelerin ölümden kurtulmasında görev almaktadır. Bunlar ısı şok proteinleri (HSP), glukoz ile düzenlenen proteinler, hemoksigenazlardır (Verrico and Moore, 1997). Ayrıca fosfolipaz A, prostaglandin E2 ve cAMP kurtulma cevabı ile ilişkili bulunmuştur. Subletal dozlar aynı zamanda diğer hücresel işlevlerde görevli protein ve gen ifadelerini de etkilemektedir. Örneğin bu dozda PDT, NF κ B (çekirdek faktörü kappa-zayıf-zincir-aktive olmuş B hücre hızlandırıcısı) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek sitokinlerin ifadesini değiştirmekte ve anti-tümör bağışıklığın indüklenmesini sağlamaktadır (Legrand et al., 1998). Ayrıca PDT, tümör metastazı gibi uzun süreli etkilerle ilişkili olan hücrelerdeki adezyon moleküllerini de düzenlemektedir. Yüzey reseptörlerinden major histokompatibilite kompleks (MHC I ve II) ifadesindeki değişiklikler PDT ile indüklenen immün cevap farklılıklarını da açıklamaktadır (Rousset et al., 1999).

2.7. Hiperisin

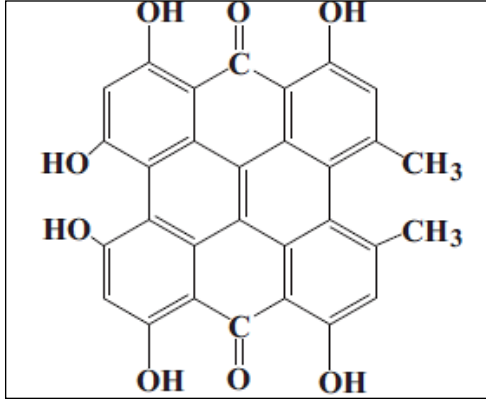
Hiperisin tüm dünyada yayılış gösteren ve antik çağlardan bu yana birçok tıbbi özelliği için kullanılan *Hypericum* cinsine ait bitki türlerinde bulunan etken

maddelerden biridir (Karioti and Bilia, 2010). Hiperisin ilk olarak St. John's Wort, sarı kantaron, binbirdelik otu, kuzukıran veya yara otu olarak bilinen, 1 metreye kadar uzayabilen çok yıllık aromatik bir tür olan *Hypericum perforatum*'dan izole edilmiştir (Şekil 2.6). *H. perforatum* farmakolojik açıdan önemli birçok madde içermektedir (Kaçar ve Azkan, 2004). Hiperisin ve pseudohiperisinin dahil olduğu naftodiantronların bitkide bulunma yüzdesi 0,05-0,30'dur (Brockmann et al., 1939; European Pharmacopoeia, 2008). *H. perforatum* bitkisinde hiperforin etken maddesini içeren floroglukinolinslar, flavonoidler, tanenler vb. de bulunmaktadır. Hiperisin oranı türe, çevre koşullarına, gelişim dönemine, bitkinin farklı kısımlarına, toplanma ve kurutulma zamanına bağlı olarak değişmektedir (Büter et al., 1998). Farmakolojik olarak üzerinde en çok durulan ve antidepresan aktivitesiyle üzerinde en çok çalışılan grup hiperisini içeren naftodiantronlar olmuştur (Patocka, 2003).

Şekil 2.6'da gösterilen hiperisinin kimyasal formülü ($C_{30}H_{16}O_8$) ve yapısı (1,3,4,6,8,13-Hekzahidroksi-10,11-dimetilpenanthro perilen-7, 14-dion), 1942 yılında Brockmann tarafından ortaya konmuştur (Kubin et al., 2005). Bitkinin yapraklarında bitkiye adını veren ışığa tutulduğunda delik görüntüsü veren yağ bezleri bulunmaktadır. Çiçekleri ise parlak sarı-turuncu renkte olup kaliks ve korolla kısmında siyah oval salgı cepleri vardır Bu siyah noktalar parmakla ovalandığında parmak kırmızı olmaktadır (Upton, 1997). Çiçek bu siyah bezlerinde özel flavonoidleri ve hiperisini içermektedir. Çiçek ışığa maruz kaldığında hiperisinin biyosentetik öncüsü olarak işlev gören protohiperisinin çiçekte doğal olarak oluştuğu bilinmektedir (Kootstra et al., 2001). *Hypericum* türlerinde hiperisinin görevi bitkiyi böcek ve diğer zararlılara karşı savunmaktır (Agostinis et al., 2002). Hiperisinin, *Hypericum* haricinde bazı bitkilerde ve mantarlarda da bulunduğu bildirilmiştir (Karioti and Bilia, 2010).

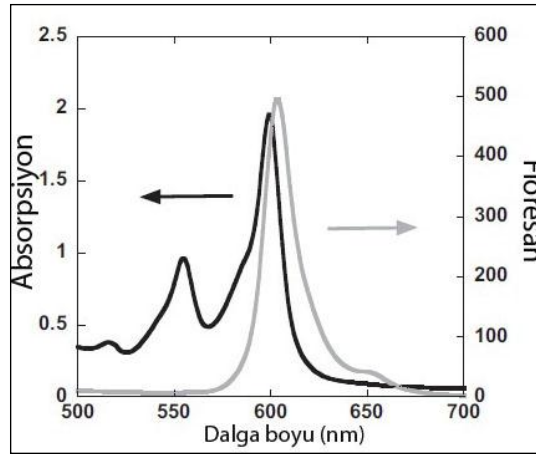
2.7.1. Hiperisinin özellikleri

Hiperisin yaygın polar çözücülerde çözünmekte, polar olmayan çözücülerde ise tam çözünemediğinden absorpsiyon spektrumu düşmektedir (Karioti and Bilia, 2010). Çözücülerden başka pH, iyonlaşma, konformasyonel durum absorpsiyon spektrumunu etkilemektedir.



Şekil 2.6. A. Hiperisinin kimyasal yapısı, B. *Hypericum perforatum* bitkisi (Karioti and Bilia, 2010).

Hiperisin sadece monoanyon olarak bulunduğundan monobazik tuz oluşturma eğilimindedir ve çoğu biyolojik analizde monobazik sodyum tuzu olarak bulunmaktadır. Hiperisin tuzları organik çözücülerde karakteristik kırmızı floresan ışımaya (absorbans λ_{\max} :594nm ve alkolde 642 nm) (Şekil 2.7) veren bir çözelti oluştururken (λ_{\max} :548 nm ve alkolde 591 nm), sulu çözeltilerde floresan olmayan yüksek moleküler ağırlıklı kümeler oluşturmaktadır (Theodossiou et al., 2009).



Şekil 2.7. Hiperisinin Absorpsiyon spektrumu (maksimum pik 599 nm) ve floresan spekturumu (maksimum pik 603 nm) (Kawashima and Nakajima, 2011).

Hiperisin, Hyp-1 enziminin katalizlediği reaksiyon ile emodin anthronun oksidatif dimerizasyonu ile sentetik olarak da sentezlenmiştir (Falk and Schoppel, 1991). Biyolojik ortamlarda çözüldüğü bilinen hiperisin, biyolojik makromoleküllerle (albumin, LDL, amiloid fibriller, zar bileşenleri) kompleks oluşturmaktadır. Hiperisinin bu özelliğinden fotodinamik tedavide faydalanılmaktadır. Hiperisinle preinkübe edilen

tümör hücreleri görünür ışık veya UV ışığı ile uyarıldığında hiperisinin antiproliferatif etkisi nedeniyle antineoplastik ve antitümör etki göstermektedir (Kaçar ve Azkan, 2004).

Hiperisin araştırmalarının odağında hiperisinin fototoksik etkisi yer almaktadır. Deneysel ve klinik bulgulara göre, hiperisin doğal olarak oluşan ışık duyarlı bir maddedir ve PDT için büyük bir potansiyel taşımaktadır. Bunun nedeni hiperisinin yüksek triplet kuantum verimi, singlet oksijen ve süperoksit anyonu oluşturma başarısı ve karanlıkta toksik etkisinin çok az olmasıdır (Theodossiou et al., 2009).

2.7.2. Kullanım alanları

Dünyada *H. perforatum*'un, şeker hastalığı, mide-bağırsak hastalıkları, sarılık, soğuk algınlığı, yanık tedavisinde, ayrıca antiseptik ve yara iyileştirici olarak da kullanımı yaygındır (Kaçar ve Azkan, 2004). Bu bitkinin etken maddelerinden biri olan hiperisinin antidepresif, antiviral, antineoplastik, antitümör, fotodinamik ve fotodiagnostik aktiviteleri bilinmekte, bunların üzerinde sıklıkla çalışılmaktadır (Kubin et., 2005).

Naftodiantronların, 1O_2 ve diğer reaktif oksijen türleri üretiminde güçlü yetenekleri bulunmaktadır. Özellikle hiperisin doğada bulunan en güçlü ışık duyarlaştırıcılardan biridir. İkinci nesil IDM sınıfına giren hiperisinin PDT'deki kullanımı üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Hiperisinin antitümör etkisi oksijen bağımlı olup, Tip II reaksiyon başta olmak üzere Tip I reaksiyonun da dahil olduğu fotodinamik etki mekanizmalarından kaynaklanmaktadır (Vandenbogaerde et al., 1998).

2.7.3. Hiperisinin etki mekanizması

PDT sonucunda kanser hücrelerinin nekrotik veya apoptotik ölüme gitmesinde ya da canlı kalma sürecinin belirlenmesinde hiperisinin hücre içi dağılımı, kullanılan hücre/doku tipi ve ışık dozu etkili olan faktörlerdir. Her bir olayda farklı bir hücresel mekanizma devreye girmekte ancak çoğu durumda bu olayların hepsi farklı oranlarda ve birbiriyle ilişkili şekilde sürece katılmaktadır (Agostinis et al., 2002).

Hiperisinin ışıkla aktivasyonu sinyal iletim yolunda önemli olan protein kinaz C (PKC), protein kinaz A (PKA), protein tirozin kinaz ve diğer büyüme faktörleriyle uyarılan protein kinazların inhibisyonuna, zar lipitlerinin peroksidasyonuna, süperoksit

dismutaz aktivitesinde artışa, hücrel glutatyon seviyesinde ve matriks metalloproteinaz-1'in işlevinde azalmaya neden olmaktadır (Chaloupka et al., 1999, Duo et al., 2004).

Hiperisin, hücreler için çok önemli olan mitokondri işlevlerini etkilemekte, hücrel solunumunda ve toplam hücrel ATP seviyesinde azalmalara yol açmaktadır. Mitokondriyal süksinoksidaz inhibe olmakta ve mitokondri iç zarının çeşitli iyon ve çözünmüş maddelere karşı geçirgenliği artmaktadır. Bunun sonucunda mitokondriyal zar potansiyelinde azalma meydana gelmektedir. Bu olayların sebebi olarak hiperisin aracılı ışımaya sonrası oluşan ROS'un mitokondriyal depolarizasyon oluşturması gösterilmektedir. Ayrıca mitokondri dış zarından heksokinaz salımıyla (sitoplazmik heksokinaz artışı) hücre içi pH'da azalma, glukoz fosforilasyonunda aksaklık ve hücre proliferasyonunda inhibisyon gibi etkileri bulunmaktadır. Glikolitik yolda önemli bir enzim olan heksokinazın seviyesi kanser hücrelerinde artmakta ve kanser hücrelerinin beslenmesine destek olmaktadır (Deberardinis et al., 2008). Mitokondrideki bu değişiklikler sonucunda dış zar etkilenip bozularak, apoptotik faktörlerin iç zardan sitosole salınmasına neden olmaktadır (Agostinis et al., 2002).

2.7.4. Hiperisinin hücre içi dağılımı

Hiperisinin hücrede ulaştığı son yer, onun moleküler hedefini belirlemekte ve fotositotoksik profilini etkilemektedir. Bunun nedeni, 1O_2 ve diğer ROS'ların çok kısa ömürlü olması ve biyolojik hedeflerle hızla etkileşime girdiklerinden yayılma alanlarının çok küçük olmasıdır (Theodossiou et al., 2009). Hiperisinin hücreye alımında ve dağılımında zardaki lipitlerle etkileşiminin önemi rapor edilmiştir. Hiperisinin hücreye alınımının difüzyon ve çözünürlük ile belirlendiği, enerji bağımlı taşınmanın olmadığı ve özel reseptörlere bağlanmadığı düşünülmektedir (Thomas and Pardini, 1992). Hiperisinin hidrofobik karakteri, hiperisinin zamana bağlı olarak sitoplazmik zarlarda yerleşmesine olanak sağlamaktadır. Organellere özgü özel floresan boyamalara göre, hiperisinin mitokondri, endoplazmik retikulum (ER), Golgi cisimciği ve daha az miktarda lizozom zarında dağılım gösterdiği ve biriktiği bildirilmiştir (Galanou et al., 2008).

Kültürü yapılan hücrelerde hiperisinin tercihen biriktiği hücre içi organeller çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Yüksek hiperisin konsantrasyonu (1-5 μM) ile inkübe edilen DU145 prostat kanseri hücrelerinde, hiperisin birikiminin 1 saat sonra

mitokondride, 5 saat sonra ise ER ve Golgi zarında olduğu gözlenmiştir (Theodossiou et al., 2009). Hiperisinin hücredeki dağılımında hücre tipi de önemlidir. Caco-2 kolon adenokarsinom hücrelerinde, hiperisinin hücre zarı dışında tercihen çekirdek zarında biriktiği bildirilmiştir (Sattler et al., 1997). Fare kolon kanseri ve insan glioma hücre hatları, serum proteinleri varlığında hiperisinin inkübe edildiğinde hiperisinin tercihen LDL ya da HDL lipoproteinlerine bağlandığı, LDL'nin sadece hiperisini taşımadığı onun lizozomal birikiminden de sorumlu olduğu gösterilmiştir (Siboni et al., 2002; Kascakova et al., 2008). Son yapılan çalışmalar hücre zarından hiperisinin alınımında kolesterolün moleküler bir belirleyici olduğunu göstermiştir (Ho et al., 2009). Hiperisinin oligonükleotidlerle ve izole edilen DNA ile etkileşime girdiği gösterilmiş olsa da çekirdek lümeninde bulunmadığı rapor edilmiştir (Sattler et al., 1997; Kocisova et al., 1999). Lipofilik IDM'ler genellikle çekirdek zarının da dahil olduğu zarlarda yerleşim göstermekte ve bölgesel 1O_2 üretimiyle dolaylı yoldan DNA hasarına neden olabilmektedir (Oleinick and Evans, 1998).

2.7.5. Hiperisin ile PDT'de hücre ölüm mekanizmaları

Hiperisin ile PDT sonrasında uygulanan hiperisin konsantrasyonu ve ışık dozuna bağlı olarak, hücrelerde apoptoz, nekroz, sekonder nekroz ve otofaji şeklinde hücre ölümleri belirli oranlarda görülmektedir (Mikeš et al., 2007).

Malignant hücrelerin apoptoz yeteneği bozulmuş olduğundan, hiperisin aracılı PDT ile hücrelere bu yeteneği yeniden kazandırmak amaçlanmaktadır. Ancak uygulanan ışık dozuna ve ışımaya şekline, hiperisin konsantrasyonuna, oksijen miktarına ve hücre tipine göre hücrelerin indüklendiği ölüm şekli değişiklik göstermektedir. Hiperisinin hücrenin hangi organeline yerleştiği hücre ölüm şeklini belirleyen önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle antikanser ilacı olarak hiperisin kullanımı için hiperisinin fototoksik etkisinin optimizasyonu gerekmektedir (Agostinis et al., 2002). İndüklenen hücre ölüm tipi tümör hücrelerinin genetik temelinden etkilenmektedir. Örneğin kanser tiplerinin yaklaşık yarısında aşırı ifade olan antiapoptotik Bcl-2 proteini nedeniyle, hiperisin aracılı PDT sonrasında apoptoza karşı direnç gelişebilmekte ve bazı kanser tiplerinde denge nekrotik ölüme kaymaktadır (Reed, 1998).

Mitokondriyal hasar, ışıkla uyarılan hücrelerde meydana gelen ilk olaydır ve apoptotik süreci başlatmada önemli bir role sahiptir. Mitokondriye yerleşen IDM'nin hızla apoptotik yolu başlattığı, hücre zarı ya da lizozomu hedef alanların ise apoptozu

geciktirdiği, engellediği ya da hücreyi nekroza yönlendirdiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Moor, 2000). İnsan serviks hücre hattında (HeLa) ve sıçan/fare T hücre hibridoma (PC60) hücre hatlarında hiperisin aracılı PDT'nin, mitokondriyal sit-c salımında artış, prokaspaz-9/prokaspaz-3'te çok hızlı artış ve çekirdekte bulunan kaspaz-3 tarafından parçalanmış PARP proteininde artışla sonuçlandığı gösterilmiştir (Vantieghem et al., 2001).

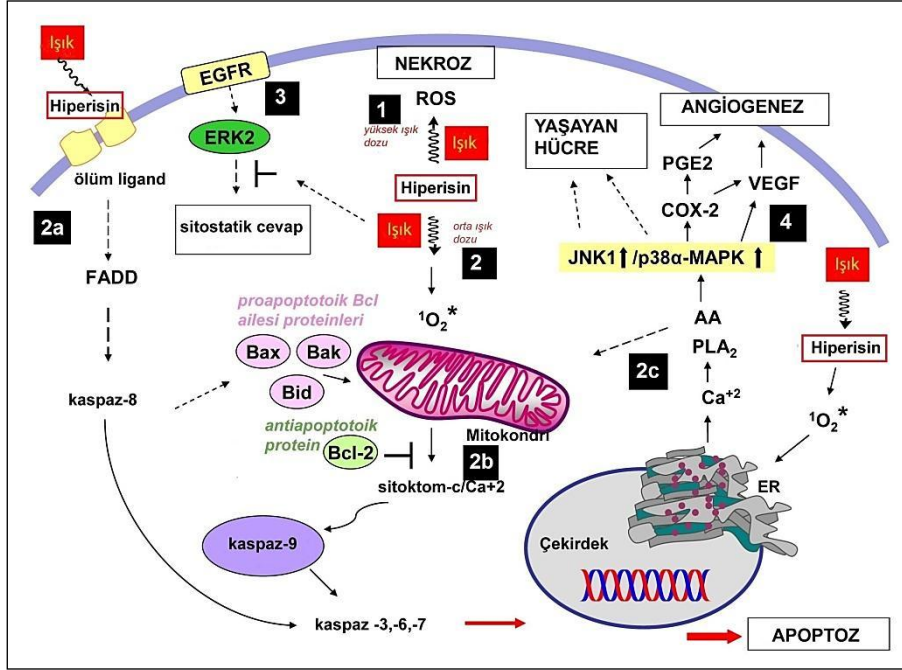
Yapılan çalışmalarda kaspaz inhibisyonu (prokaspaz-3/kaspaz-3) sağlanan hücrelerde, PDT sonrasında hücre ölümünün devam etmesi, kaspazların PDT aracılı hücre ölümünde tek sorumlu olmadıklarını göstermiştir (Xue et al., 2001). Mitokondriden sit-c salımının olması ve mitokondriyal solunum işlevlerinin bozulması, hiperisin ile yapılan PDT sonrasında hücre ölümü için geri dönüşümsüz bir sinyaldir.

BCL-2 gen ailesinin Bcl-2 ve Bcl-XL gibi antiapoptotik üyelerinin sit-c salımını baskıladığı, Bid, Bax ve Bad gibi proapoptotik üyelerin ise salımı kolaylaştırdığı görüşü genel olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle Bcl-2 ifadesinin azaltılması, belirli hücre hatlarında PDT'nin etkinliğini ve hassasiyetini arttırmak için kullanılan bir yol olarak bilinmektedir (Fadeel et al., 1999). Ancak ilk apoptotik sinyalin ER ve Golgi kompleksinde başladığı tespit edilmiştir (Nakagawa et al., 2000; Mancini et al., 2000).

PDT'de ölüm reseptör aracılı apoptoz hücre dışından gelen sinyalle başlayan bir başka ölüm şeklidir. Tümör nekroz faktör (TNF), TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ve Fas ligand (FasL) hücre yüzeyinde bulunan tamamlayıcı reseptörlerine bağlanarak hücre ölümünü başlatmaktadır. Sonraki aşamada ölüm bölgesi (death domain=DD) içeren FADD, TRADD gibi proteinler ile başlatıcı kaspaz-8 yolağı devreye girmekte ve işlevsel ölüm-indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşmaktadır. Farklı kanser hücre tiplerinde PDT sonrasında Fas-FasL ifadesindeki artış sonrasında, dışardan gelen sinyal ile başlayan kaspaz yolağı aktive olmakta ve apoptotik cevap başlamaktadır (Theodossiou et al., 2009). Sadece belirli hücre tipleri hiperisin aracılı PDT sonrasında prokaspaz-8 aktivasyonunu indükleyebilmektedir. Bu da hücrelerde ölüm reseptörü ve/veya mitokondriyal yolun izlenmesinde kullanılmaktadır (Fulda et al., 2001).

Yüksek konsantrasyonda hiperisin ile doğrudan mitokondri üzerinde PDT yapılması, mitokondrinin biyoenerjisinde hızlı bir dengesizliğe, aşırı miktarda ROS oluşumuna ve

mitokondriyal zar da yapışmaya neden olmaktadır (Buytaert et al., 2007). Ayrıca sit-c salımı olmasına rağmen kaspaz aktivasyonu olmamakta ve hücreler nekrotik ölüme gitmektedir (Şekil 2.8). Nekrotik PDT koşullarında meydana gelen yüksek seviyedeki oksidatif stres, mitokondriyal işlevlerde hızlı ve geri dönüşümsüz hasarlar yaratmakta ve ATP seviyesinde ani düşüş nedeniyle hücre, programlı hücre ölümlü için gerekli enerjiyi sağlayamamaktadır (Vantieghem et al., 2001).



Şekil 2.8. Hiperisin aracılı PDT sonrasında indüklenen çoklu ve bağlantılı sinyal yolları (1) yüksek ışık dozu nekroza yol açmaktadır. (2) orta ışık dozu farklı apoptotik yolları aktive etmektedir, (2a) kaspaz-8 aktivasyonu, kaspaz-3,-6,-7 aktivasyonu, (2b) mitokondriyal sit-c ve Ca²⁺ salımı kaspaz-9'u aktive etmektedir. Bax/Bid proapoptotik proteinleri sit-c salımını artırırken, antiapoptotik Bcl-2 inhibe etmekte, (2c) ER'dan Ca²⁺ salımı, mitokondriden sit-c salımını aktive etmektedir. (3) ERKs inhibisyonu sitostatik cevabı başlatmaktadır. (4) Düşük ışık dozu MAPKs yolunu açarak hücre canlılığının devamını sağlamaktadır (Karioti and Bilia, 2010).

Apoptoza uğrayan hücrelere ait apoptotik cisimcikleri oluşturan çekirdek ve sitoplazmik parçalar *in vivo* koşullarda hızla tanınarak, makrofajlar ya da komşu epitel hücreleri tarafından fagosite edilmektedir. *In vitro* koşullarda ise apoptotik cisimcikler ve kalan hücre parçaları şişmekte ve son olarak hücre lize uğramaktadır. Fagositik özelliğin olmaması nedeniyle primer nekroza benzer olan bu ölüm şekli sekonder nekroz olarak adlandırılmaktadır. Sekonder nekroz, mitokondriyal hiperpolarizasyon, lizozomal zar geçirgenliği gibi özelliklerle karakterizedir (Berghe et al., 2010). HT-29 hücreleriyle yapılan çalışmalarda hiperisin aracılı PDT sonrasında sekonder nekrotik hücrelere rastlanmıştır (Mikeš et al., 2007).

Hiperisin ile PDT bazı durumlarda, apoptotik olmayan bir ölüm şekli olan otofajiyi de indükleyebilmektedir. Otofaji tüm ökaryotik organizmalarda temel homeostatik mekanizmalardan biri olup, normalde düşük oranda gerçekleşen hücrenin kendi kendini sindirme olayıdır. Otofaji hücrel stres, besin azlığı gibi durumlarda artabilmektedir ve kanser gelişiminde de önemli rol oynamaktadır (Levine and Kroemer, 2008). Hiperisin aracılı otofaji ilk defa apoptotik genleri mutasyona uğramış ve kaspaz yolağı inhibe olmuş hücrelerde gözlenmiştir (Buytaert et al., 2006). Otofaji ile normal yok edici mekanizmalarla uzaklaştırılamayan PDT sonrasında oluşmuş işlevsel olmayan proteinler ve hasarlı organellere sahip hücreler yok edilmektedir.

2.7.6. Hiperisin ve sinyal iletim yolları

Öldürücü dozun altındaki fiziksel veya kimyasal strese hücrenin verdiği kurtulma cevabı, oluşan hasarla mücadele etmeye yönelik gen ve protein ifadelerinde değişikliği başlatan sinyal yollarının aktive edilmesidir. PDT sonrasında indüklenen apoptoz ile düzenleyici enzimlerdeki (fosfolipazlar, mitojen aktive edici protein kinazlar (MAPK), siklin bağımlı kinazlar) değişiklikler ve ikincil habercilerin (PIP₃, seramid) artışı ilişkili bulunmuştur (Moor, 2000). Memeli hücrelerinde 3 farklı MAPK yolu bulunmaktadır. Bunlar (1) Hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK) yolu, (2) c-Jun N-terminal kinase (JNK ya da SAPK [stres ile aktive olan protein kinaz]) yolu, (3) p38 MAP kinaz yoludur. ERK yolu hücrenin yaşamasıyla ilişkili olup, büyüme faktörleri ile aktive olmakta ve hücre çoğalmasını indüklemektedir. JNK ve p38 MAPK oksidatif stres, enflamasyon, sitokinler, UV gibi hücre dışı ve hücre içi stres koşullarında aktive olan ve hücre ölümünü aktive eden yollardır (Sen et al., 2007). Hiperisin aracılı PDT'de, kurtulma cevabı başlıca JNK1 ve p38 MAPK aktivasyonu ile olurken ERK2 geridönüşümsüz olarak inhibe olmaktadır (Şekil 2.8). Bu aktivasyon kaspaz aktivasyon yolağından bağımsız olarak gerçekleşmektedir, ancak PDT sırasında yaşamaya devam sinyalleri hücreleri ölümden kurtaramamaktadır. Bu yollar, hücre hasarı belirli bir eşiğe ulaşana kadar apoptozu geciktirmekte, ancak son olarak apoptoz gerçekleşmektedir (Hendrickx et al., 2003). Hendrickx ve arkadaşlarına göre (2005), hiperisin aracılı PDT'ye maruz kalan hücrelerde P38a MAPK izoformunun aktivasyonu, siklooksigenaz (COX-2) indüklenmesi için önemli bir rol oynayarak prostoglandin sentezini başlatmaktadır (Şekil 2.8). Bu da PDT'ye dirençli olan hücrelerin çoğalmasını ve tümörün yayılma potansiyelini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca hiperisin ile PDT sonrasında sitosolik kalsiyum

seviyesindeki hızlı artış fosfolipaz A₂ (PLA) aktivasyonunun ve arakidonik asit birikimine neden olmaktadır. Arakidonik asit hücreler için ölüm mesajı olarak işlev görmektedir. PLA, Ca⁺² bağımlı bir enzimdir. Hiperisinin ışıkla aktivasyonu DER'de tamir edilemeyen hasara yol açarak ER'den Ca⁺² salımı başlatmakta ve sitosolik Ca⁺² seviyesinde artış ile başlayan proapoptotik etkiye neden olmaktadır. p38α MAPK inhibisyonu vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salımını engellemekte ve tümör bağlantılı endotelial hücre göçünü baskılamaktadır. Hiperisin aracılı PDT'de p38 MAPK inhibisyonu sağlandığında, hiperisinin antianjiyogenik ve proapoptotik etkisi kanser tedavisinde önem kazanmaktadır (Karioti and Bilia, 2010). Stres ile indüklenen kinaz yollarının aktivasyonu antioksidanlarla geri dönebilmektedir, bu nedenle ROS üretimi ve kinaz aktivasyonu arasındaki bağlantı önemlidir (Tao et al., 1996).

2.7.7. Hiperisin ve ROS oluşumu

Oksijen bağımlı Tip II PDT reaksiyonda oluşan ¹O₂, hiperisinin fototoksik etkisini açıklamada önemli bir yere sahiptir. Theodossiou ve arkadaşları (2009) gerçekleşen olayları şu şekilde özetlemiştir:

1. ER'da Ca⁺²-ATPaz-2 pompasının hasara uğramasıyla Ca⁺² homeostazisi bozulmaktadır.
2. Süksinoksidaz, akonitaz gibi mitokondriyal enzimler azalmakta ya da baskılanmaktadır.
3. Bazı kanser tiplerinde metalloproteinaz-9 ifadesi azalmaktadır.
4. Hücre zarının lipid peroksidasyonunu katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinde artış ve glutatyon (GSH) seviyesinde azalma izlemektedir.

Hiperisin ile PDT'den 1 saat sonra oluşan bir diğer ROS hidrojen peroksittir (H₂O₂) (Ali et al., 2002). Süperoksit anyonu da, semiquinon radikali ile oksijen indirgenmesinden oluşmaktadır (Diwu and Lown, 1993). Stres koşullarında hücreler oluşan radikallerle başa çıkabilmek için antioksidan savunma mekanizmalarını devreye sokmaktadır. Bunlar tümörlerde çoğunlukla aşırı ifade olan glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, sitosolik glutatyon-s-transferaz (GSTs) ve metallotioneinlerdir (Neumann et al., 2003). Hiperisin ile birlikte bu redoks sistemlerini engelleyen maddelerin verilmesinin fotodinamik etkiyi arttıracığı düşünülmektedir

(Fojo and Bate, 2003). Radikal yakalayıcıların, hiperisin aracılı PDT sonrasında apoptotik hücre ölümünü inhibe ettiği de öne sürülmektedir (Kubin et al., 2005). Antioksidan enzimlerin PDT sonrasında verdiği cevaplar *in vivo* ve *in vitro* koşullarda farklılık göstermektedir. Hiperisin uygulamasına *in vivo* ortamda hassasiyet gösteren glutatyon redüktaz, *in vitro* koşullarda değişmemektedir (Johnson and Pardini, 1998).

2.7.8. Hiperisinin enzim aktiviteleri ve reseptörlerle olan ilişkisi

Hiperisinin antidepresan, antiproliferatif ve antiviral özelliği bazı enzimleri inhibe edici ya da aktive edici etkisine bağlıdır. Bu etkiler kullanılan metoda, enzimin izoformlarına, sıcaklığa, oksijen ve ışığın varlığına ve miktarına göre değişmektedir. Hiperisinin farklı hücre ve doku tiplerinde, PDT ile uygulanan ışığın etkisine göre değişen bazı enzimler üzerindeki inhibe edici etkisi Çizelge 2.1’de özetlenmiştir (Kubin et al., 2005).

Çizelge 2.1. Hiperisin ile PDT sonrasında inhibe olan enzimler ve bazı reseptörler (Kubin et al., 2005).

Protein kinaz C	DNA polimeraz- α
Protein kinaz A	HIV-1 revers transkriptaz
Cdc2 kinaz	Monoamin oksidaz A
Kazein kinaz	Monoamin oksidaz B
Mitojen aktive edici protein kinaz	Süksinoksidaz
Epidermal büyüme faktörü reseptörü	Glutatyon peroksidaz
İnsulin reseptörü	Glutatyon redüktaz
Miyozin zayıf zincir kinaz	Glutatyon S-transferaz
Dopamin- β -hidroksilaz	Süperoksit dismutaz

PKC hiperisin ile etkileşime girip inhibe olan ve hiperisinin sitotoksitesinden başlıca sorumlu olan enzimdir. Monoamin oksidaz (MAO) enziminin inhibisyonu depresyon tedavisinde *H. perforatum* bitkisinin kullanılmasının nedenidir. Hiperisin tek başına bu inhibisyon için yeterli olmamaktadır. Hiperisin, glutamat reseptörü olan N-metil-D-aspartat (NMDA) için yüksek ilgi göstermektedir (Cott, 1997).

Hiperisinin, bazı sitokrom P450 (CYP) türlerini inhibe ederek hiperisinle birlikte alınan bazı ilaçların metabolizmasını olumsuz etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Obach, 2000).

Kanserin nedenlerinden birisi olan viral hastalıklar insanlık için çok ciddi tıbbi ve sosyal bir sorundur. Hiperisinin virüsidal ve antiviral aktivitesi bilinmektedir. Hiperisin lipid içeren zarfa sahip olan virüsleri inaktive edebilmektedir, ancak hiperisinin antiviral aktivitesi *in vivo* ya da *in vitro* deney protokollerine göre değişmektedir. Hiperisin zarflı virüslerin hücre zarındaki fosfolipid tabakasına dahil olup zarın yapısını bozmakta ve virüsün füzyon işlevinin kaybına neden olmaktadır (Kubin et al., 2005). Hiperisinin virüsidal potansiyelinin ışıkla arttığı bilinmektedir, ışık varlığında etkisi 100 kat artmaktadır (Fehr et al., 1995). Hiperisinin ışıkla uyarılması sonrasında oluşan ROS'ları yakalayan β -karoten, sodyum azid gibi maddelerin varlığında virüsidal etkinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Prince et al., 2000). Hiperisin, viral zar proteinlerinde de değişikliğe neden olmaktadır. İnsan bağışıklık yetmezliği virüsüne (HIV-1) ait kapsit protein p24 ve öncüsü hiperisinin ışıkla aktivasyonu sonrasında revers transkriptaz enzim salımını gerçekleştirilememekte ve virüs inaktive olmaktadır (Degar et al., 1992). *In vitro* koşullarda hiperisinin herpes simplex virüs-1,-2, sığır viral diyare virüs, influenza A, friend leukemia virüs vb. gibi birçok virüste virüsidal etkisi gözlenmiştir (Kubin et al., 2005).

H. perforatum bitkisi bakteriyel enfeksiyonlar, solunum yolu hastalıkları, deride yara, peptik ülser tedavisi için geleneksel olarak kullanılmaktadır. Ancak *Hypericum* türleri ile yapılan antimikrobiyal analizlere göre antimikrobiyal etki çok azdır ve veri eksiklikleri bulunmaktadır (Cecchini et al., 2007).

Hiperisinin bilinen antianjiogenik özelliği, oftalmolojik uygulamalarda özellikle retinopatilerde kullanımını gündeme getirmiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada hiperisin uygulaması ile birlikte retinal yeni damar oluşumunun inhibe olduğu, ancak bölgeye bir hasar vermediği gözlenmiştir (Higuchi et al., 2008).

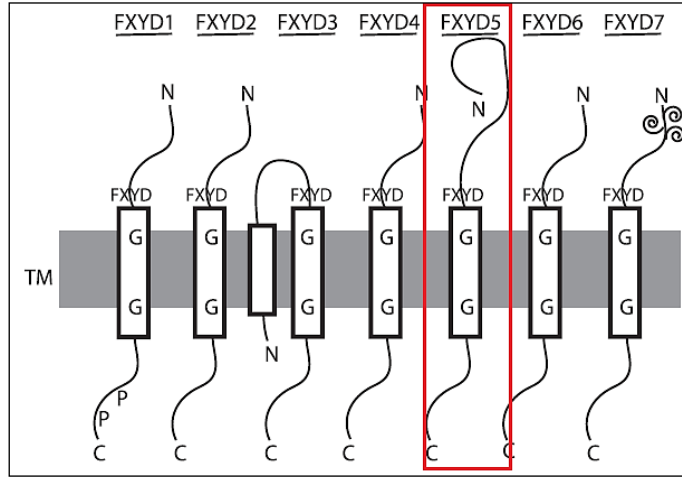
2.8. Disaderin (Anti-adezyon molekülü)

Kanser çalışmalarının temel hedeflerinden biri normal hücrelerden farklı olarak sadece kanser hücrelerinde ifade olan moleküller tanımlamaktır. Eğer bu moleküller raslantısal olarak tümör oluşumunu başlatmakta ya da devamını sağlamakta ise,

kanseri önlemek için yeni tedavi yöntemlerinin potansiyel moleküler hedefi haline gelmektedirler (Nam et al., 2007). Son yıllarda tanımlanmış olan disaderin, birçok kanser hücresinde ifade olurken, çok az sayıda normal hücrede bulunan bir hücre yüzey molekülüdür (Ino et al., 2002).

2.8.1. Disaderinin yapısı, dağılımı, düzenlenmesi

Yapılan dizi analizlerine göre, insan disaderin geni, farede bulunan iyon kanalları bağlantılı (RIC) genine çok benzerlik göstermektedir. Disaderin, RIC geninin insandaki homologudur (Lubarski et al., 2005). Sweadner ve Rael (2000) tarafından tanımlanan FXYD protein ailesi, FXYD motifine ve korunmuş glisin, serin amino asit dizilerine sahip bir gen ailesi proteindir. Memelilerde yedi üyesi bulunan bu ailenin bir üyesi olan iyon geçiş düzenleyici 5 (FXYD5), disaderin olarak da adlandırılmaktadır. FXYD5, 178 amino asitten oluşan tek geçişli bir transmembran proteindir. FXYD5 proteini, diğer FXYD'lerden daha uzun bir hücre dışı bölgeye, bir transmembran bölgeye ve kısa bir sitoplazmik uzantıya sahiptir (Şekil 2.9) (Geering, 2006).



Şekil 2.9. FXYD protein ailesinin zar topolojisi. Transmembran (TM) bölgede 2 tane korunmuş glisin bölgesi (G), FDXY modifleri gösterilmiştir. FXYD5 uzun bir NH₂ terminal uzantıya sahiptir (Geering, 2006).

Tümör hücrelerinde proteinin hücre dışı kısmı yoğun olarak glikozillenmiştir (Tsuiji et al., 2003).

Bu protein ailesi, Na-K ATPaz ile ilişkili bulunmuştur. Na-K ATPaz tüm hücrelerde bulunan temel hücresel homeostazisi sağlayan oligomerik bir zar proteindir. Na⁺ ve K⁺ iyonlarının zardan giriş-çıkışını düzenleyerek hücre hacmini korumakta ve zar potansiyelini düzenlemektedir. Na⁺ geçişiyle sağlanan enerji ikincil olarak, hücrenin

besinini sağlayan ve hücre içi pH ve Ca^{+2} konsantrasyonunu düzenleyen Na^{+} bağımlı geçiş sistemleri için kullanılmaktadır. FXD5, Na-K pompasının α alt ünitesiyle doğrudan etkileşime girmekte, pompanın Na iyonuna ilgisini ve maksimum reaksiyon hızını arttırarak (V_{max}) işlev görmektedir (Lubarski et al., 2005).

Disaderin mide, kolon, pankreas ve meme kanseri gibi birçok kanser hücresinde ifade olmaktadır. Disaderinin lenfositler, endotel hücreleri, çok tabakalı yassı epitelin bazal hücreleri gibi çok az sayıda normal hücrede ifade olduğu bilinirken, son yıllarda yapılan çalışmalarda western blotlama tekniğiyle böbrek, duodenum, dalak ve akciğerde de bulunabileceği ve iyon geçişini düzenliyor olabileceği öne sürülmüştür (Lubarski et al., 2005).

2.8.2. Disaderinin kanser gelişimindeki rolü

Sağlıklı fare fibroblast hücreleri *in vitro* koşullarda ve insan meme epiteli hücreleri *in siliko* koşullarda onkogenlerce aktive edildiğinde ya da tümör baskılanması engellendiğinde disaderin ifadesinin arttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Fu and Kamps, 1997; Bild et al., 2006). Kanser ilerlemesinde ve metastazında FXD5'in önemini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Bu protein ile transfekte edilen insan karaciğer kanser hücrelerinde *in vitro* koşullarda hücre-hücre adezyonunda azalma gözlenirken; *in vivo* koşullarda dalak içine enjeksiyon sonrasında intrahepatik metastaz oluşumunda artış olmuştur (Ino et al., 2002). Aoki ve arkadaşları (2003), ilerlemiş kolorektal kanserlerde disaderin ifadesinin prognostik öneme sahip olduğunu bildirmiştir.

Disaderinin kısa olan hücre içi sitoplazmik kuyruğundan ziyade uzun olan hücre dışı bölgesi aracılığıyla diğer zar proteinleriyle ya da hücre dışı matris bileşenleriyle etkileşimi kolaylaştırarak sinyal dinamiğini etkilediği üzerinde durulmaktadır (Nam et al., 2007).

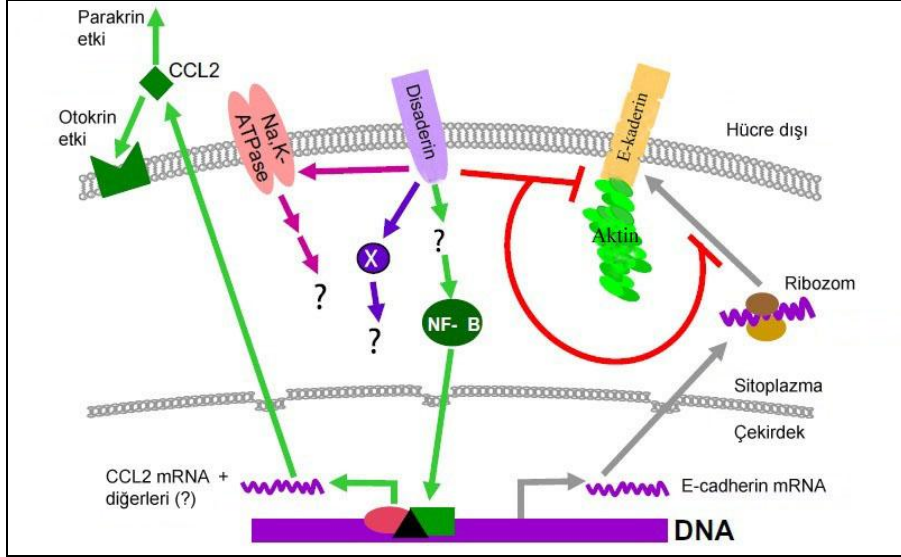
Tip-1 transmembran proteini olan kaderinler hücre adezyonunda önemli rol oynayan, dokuları bir arada tutan Ca^{+2} bağımlı moleküllerdir. Kaderinlerin bir tipi olan E-kaderinler epitel hücrelerinde hücrelerarası bağlantıyı sağlayan yapışma proteinleridir (Hulpiau and Van Roy, 2009). Birçok genetik ve epigenetik mekanizmalar sebebiyle E-kaderin inaktivasyonunun, kanser invazyonu ve metastazı için gerekli bir basamak olduğu düşünülmektedir (Hirohashi and Kanai, 2003). Disaderin ifade etmeyen

karaciğer kanser hücreleri, transfeksiyon ile disaderini fazla ifade ettiğinde, disaderin transkripsiyon sonrası mekanizmalarla E-kaderin ifadesinin doz bağımlı olarak düşmesine neden olmuştur. Ayrıca E-kaderinin hücre içinde aktin filamentlerine tutunmasını sağlayan kenetlenme proteinlerinden biri olan α -katenin ifadesinin de önemli ölçüde düştüğü gözlenmiştir. Bu nedenle disaderinin E-kaderin ifadesini azaltarak hücre–hücre bağlantısını azalttığı, hareketli bir fenotipe izin vererek metastazı başlattığı öne sürülmektedir (Nam et al., 2007).

Disaderinin, E-kaderin ifade etmeyen meme kanseri hücrelerinde de invazyonu ve metastazı başlatabildiği gözlenmiştir ve bu E-kaderinden bağımsız yeni mekanizmaların önemli olabileceğini göstermektedir (Nam et al., 2006). Örneğin disaderin, kemokin ifadesini arttırarak hem tümör hücrelerini hem de çevresindeki ortamı etkileyerek prometastazik etki göstermektedir. Kemokin ligand 2 (CCL2), monositler, hafıza T hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreleri için kemotaksik bir kemokindir. CCL2 birçok kanser hücrelerinde ifade olmakta ve kanser hücre göçünü ve anjiogenezi başlatarak kanserin ilerlemesine katkı sağlamaktadır (Youngs et al., 1997). Meme kanseri hücrelerinde disaderinin invazyonu başlatması, bu hücrelerden salınan CCL2'nin otokrin etkisine ve endotel hücre göçünü başlatmadaki parakrin etkisine bağlı bulunmuştur (Şekil 2.10) (Nam et al., 2007).

NF- κ B DNA transkripsiyonunu kontrol eden, çeşitli stres, serbest radikal, sitokin gibi uyarılara immün cevabı başlatarak yanıt veren bir protein kompleksidir. NF- κ B'nin yanlış düzenlenmesi kanser, inflamasyon, otoimmün hastalıklar vb. ile ilişkili bulunmuştur (Gilmore, 2006). Disaderinin varlığı NF- κ B'nin aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Tümör invazyonu ve metastaz, NF- κ B ile düzenlenen genlerin ürünleri olan matriks metalloproteazlar, interlökin-8 ve birçok kemokin ile etkilenmektedir (Nam et al., 2006).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, disaderine ait komplementer DNA (cDNA) dizisinin, insan CD34+ hematopoietik kök/progenitör hücrelerle hemen hemen aynı olduğunun bulunması disaderinin kök hücre araştırmaları için de önemli olabileceğini göstermiştir (Nam et al., 2007).



Şekil 2.10. Disadlerin E-kaderin bağımlı ve bağımsız etki mekanizması için önerilen model, CCL2: kemokin ligand-2 (Nam et al., 2007).

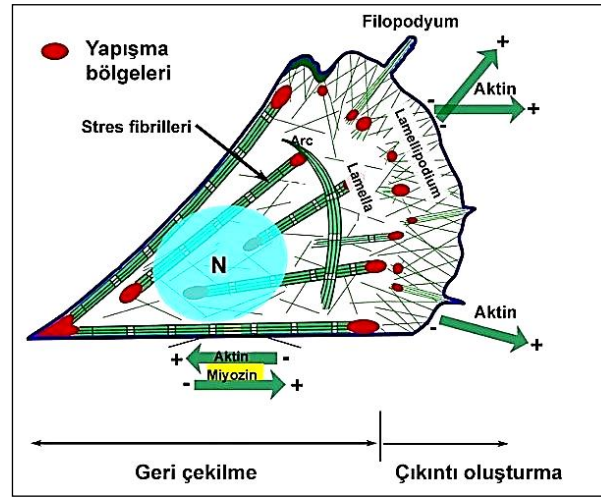
2.9. Fibröz (Filamentöz) Aktin (F-aktin)

Kolon kanserinin genetik ve moleküler temeli son on yılda daha iyi anlaşılmış, bu durum klinikte görüntüleme, tanı ve tedaviye yönelik önemli bir fayda sağlamıştır. Adezyon molekülleri göç, çoğalma, apoptoz gibi normal kolon epitelinin homeostazının sağlanmasında önemli olan birçok hücresel olaya karışmaktadır (Efsthathiou and Pignatelli, 1998). Adezyon moleküllerindeki veya bunlarla birlikte işlev gören hücre iskeleti moleküllerindeki bir bozukluk ya da anormallik kolon kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir basamaktır (Buda and Pignatelli, 2004).

Aktin hücre iskeleti ağı hareket, mekanik koruma, bölünme gibi birçok hücresel olayda gerekli olan temel bileşenlerinden biri olup, tüm ökaryotlarda kritik role sahip yaygın bir proteindir. Ayrıca hücre içinde, protein komplekslerinin yerleşimi ve taşınmasında işlev görmektedir. Monomerik globüler aktinler (G-aktin), hatları ~ 20 µm, çapı ~ 7 nm olan uzun sağlam filamentler (F-aktin) oluşturmak üzere polimerize olmaktadır (Kreis and Vale, 1999). Aktin bir adenosin nükleotidine sıkıca bağlanmakta ve G-aktin polimerize olup F-aktine dönerken ATPaz aktive olmaktadır. ATPaz aktivitesi, aynı anda bir uçta polimerizasyon diğer uçta depolimerizasyon olaylarıyla aktin filamentinin hareketini sağlamaktadır (Oda et al., 2009). Aktin filamentlerinin dinamik yapısı çeşitli durumlarda değişebilmekte, değişikliklerde aktin bağlayıcı proteinler de işlev görmektedir (Gardel et al., 2004).

Aktin filamentinin hücre hareketindeki önemi, aktinin hücrenin farklı bölgelerinde konumlanan üç farklı yapısından (Şekil 2.11) kaynaklanmaktadır: 1. Hücrenin ön uçlarında bulunan lamellipoda aktin ağı, 2. Hücre zarının altında bulunan filopoda uzantıları, 3. Sitoplazmada bulunan kontraktil aktin stres fibrilleri (Hotulainen ve Lappalainen, 2006).

Tümör hücrelerinde ve çevre dokularda meydana gelen genetik ve epigenetik değişiklikler matriks metalloproteazlar, integrin, kaderin gibi birçok proteinin gen ifadesini değiştirerek kanserin ilerlemesini sağlayabilmektedir. Bu moleküllerdeki değişikliklere bağlı olarak hücre iskeleti elemanlarında ya da bağlayıcı protein ifadelerinde farklılıklar meydana gelebilmektedir (Wu et al., 2009).



Şekil 2.11. Aktin hücre iskeletinin bir fibroblast hücrede şematik görüntüsü (<http://cellix.imba.oeaw.ac.at/actin-cytoskeleton/>).

Kanser invazyonu ve metastazın en önemli basamaklarından biri hücre hareketinde artıştır. Hücre iskeletinde aktinin yeniden düzenlenmesi hücre hareketindeki değişikliklere neden olan en önemli mekanizmalardan biridir. Aktinin yapısındaki değişiklikler örneğin filopodia oluşumunda artış, kanser hücrelerinin göçünü ve yayılmasını başlatıcı rol oynamaktadır (Wicki and Lehenbre, 2006). Disaderinin, E-kaderinin translyasyon sonrası ifadesini engelleyerek ya da E-kaderin ile aktin arasındaki ilişkiyi azaltarak işlev gördüğü düşünülmektedir (Nam et al., 2007).

Hücre göçü sırasında aktin hücre iskeleti dinamik olarak değişmektedir ve bu yeniden düzenlenme göç için gereklidir. Bu olayların inhibisyonu hücre hareketini

azalttığından aktinin yeniden düzenlenmesinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması kanser tedavisi için önemlidir (Yamazaki et al., 2005).

Aktin polimerizasyonunun apoptotik cisim oluşumunda gerekli bir basamak olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Mikrofilament ağının yeniden düzenlenmesinin apoptozun erken aşamasında aktin depolimerizasyonu ile birlikte apoptotik cisim oluşumunda önemli olduğu öne sürülmektedir (Grzanka et al., 2003).

2.10. Hücre Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

2.10.1. Sterilite testleri

Hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda besiyerinden, havadan, kullanılan serumdan, diğer malzemelerden ya da hücrenin kendisinden kaynaklı çeşitli kontaminantlarla karşılaşmak mümkündür. Bu nedenle, hücrelerin bütün sterilite testleri önceden yapıp stoklanmış olsa dahi çalışmanın sağlıklı ve kontrollü şekilde yürüyebilmesi için çalışmaya başlamadan önce bakteriyel, fungal, viral ve mikoplazmal kontaminantların tekrar araştırılması önemlidir. Bakteri, mantar ve maya hücre kültürlerinde en sık karşılaşılan kontaminasyonlardır.

İnklüzyon cisimcikleri, genellikle protein yapıda, boyanabilen çekirdek ya da sitoplazma yığıntılarıdır. Tipik olarak bakteri ya da ökaryotik bir hücredeki viral çoğalmayı göstermekte ve çoğunlukla viral kapsid proteinlerini içermektedir. Bu cisimcikleri görüntülemek üzere akridin oranj boyaması yapılarak floresan mikroskopta inceleme yapılmaktadır (Martínez-Alonso et al., 2009).

Mikoplazmalar hücre duvarı olmayan, yüksek şekil değiştirme kabiliyetinde olan ve yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerden etkilenmeyen prokaryotik canlılardır (Ryan, 2004). Hücre kültürlerinin mikoplazma kontaminasyonu hücrelerin fizyolojisini ve metabolizmasını bozan ciddi bir sorundur (Karaarslan ve Özsan, 1998). Hücre kültürlerini en sık sığır mikoplazmaları (*Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma bovis*, *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma bovoculi*), ikinci sıklıkta insan mikoplazmaları (*M. orale*, *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. salivarum*) kontamine etmekte, bunları sırasıyla domuz, kuş, kanatlı kümes hayvanları ve kedilerde hastalık yapan mikoplazmalar izlemektedir (Barile, 1979). Kontaminasyon genellikle hücre üremesinin olduğu dönemde ve dış kaynaklı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu kontaminasyon normal, virüsle infekte, transforme ya da neoplastik monolayer

ve/veya süspanse olan her türlü hücrede olabilmektedir. Primer hücre kültürlerinde, devamlı hücre kültürlerinden daha az oranda görüldüğü bilinmektedir (McCarrity and Kotani, 1985). Bu nedenlerle çalışmada kullanılacak hücreleri üretmeden önce mikoplazma kontrolünün yapılması önemli ve gereklidir.

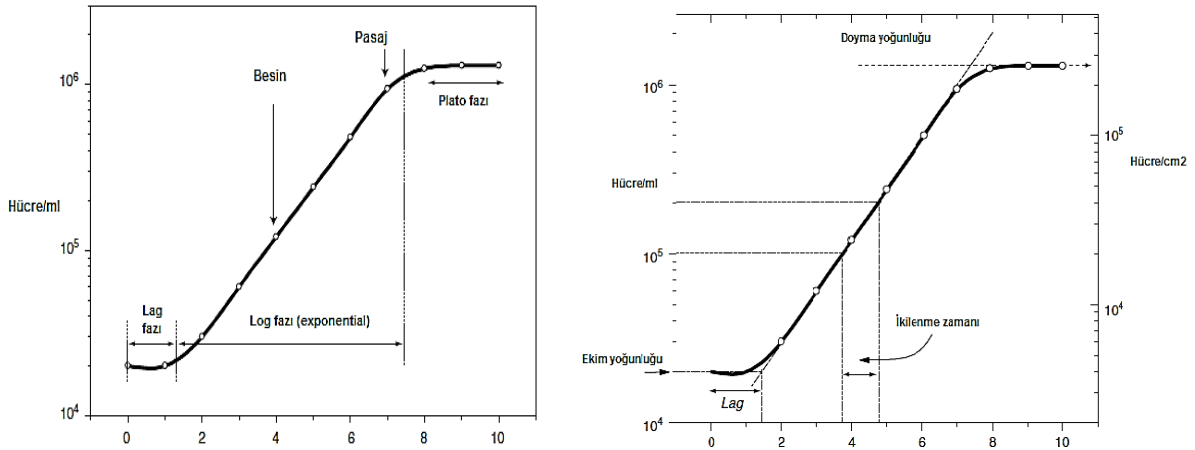
2.10.2. Üreme eğrisi

Hücre kültürü ortamında bir çalışma planlanmadan önce çalışılacak hücrelerin büyüme döngüsünün bilinmesi gerekmektedir. Hücre proliferasyon hızının ölçülmesi, hücrelerin genel durumu ve yoğunluğu hakkında bilgi sağlamaktadır. Ayrıca, hücrelerin bir uyarana ya da toksik bir maddeye karşı vereceği cevabın anlaşılmasında ve en iyi pasajlama zamanının tahmin edilmesinde de önemlidir (Freshney, 2005). Hücre hatlarının biyolojik karakterlerini karşılaştırmak için hücre üremesini kullanarak hesaplanan hücre ikilenme zamanı sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Tarnowski et al., 1993).

Büyüme döngüsünün 3 fazı vardır. Birinci faz olan "Lag fazında" pasajlama sırasında kaybedilen hücre yüzey elemanları, hücre dışı matriks ve hücre iskeleti elemanları yenilenmektedir. İkinci faz olan "Log fazında" hücre sayısında meydana gelen üssel artış sonucu populasyon iki katına çıkmaktadır. Bu fazda hücrelerin canlılığı, üretkenliği en yüksektir (Şekil 2.12). Hücrelerin içinde bulunduğu hücre döngüsü ise rastgele dağılım göstermektedir. Üçüncü faz olan "Plato fazında" hücreler durgunluk dönemine girmekte, hücre büyümesi % 10'a kadar düşmekte ve hareketlilik azalmaktadır (Freshney, 2005).

Populasyon ikilenme zamanı, hücre populasyonunun bölünme hızının ortalama bir değeridir. Bu zaman, büyümeyen, ölen ve canlı hücrelerin hepsinden etkilenmektedir (Şekil 2.12). Populasyon ikilenme zamanı hesaplanacak olan hücreler 10 gün boyunca sayılmaktadır. Sayım sonucu grafik kağıdına çizilerek ya da excel programı kullanılarak hücrede mitoz için geçen süre hesaplanmaktadır. Populasyon ikilenme zamanı şu formül ile hesaplanmaktadır:

PİZ (Populasyon İkilenme Zamanı): $1/[3,32 \times (\log t_1 - \log t_0)/24]$



Şekil 2.12. Büyüme eğrisi ve ikilenme zamanı (Freshney, 2005).

2.11. MTT Sitotoksosite Testi

In vitro sitotoksosite testleri ile kimyasalların ya da ilaçların neden olduğu metabolik yollarda ve yapısal bütünlükte meydana gelen değişiklikler ölçülmektedir. Sitotoksosite testleri, uygulanan ajana, hücre tipine ve test uygulamasına göre farklı sonuçlar verebilmektedir (Fotakis and Timbrell, 2006). Dahl ve arkadaşlarına (2006) göre sitotoksosite, hücre canlılığı temel alınarak uygulama yapılmayan gruba göre derecelendirilmektedir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Sitotoksosite derecelendirmesi.

Toksik olmayan	> % 90 hücre canlılığı
Az toksik	= % 60-90 hücre canlılığı
Orta derecede toksik	= % 30-59 hücre canlılığı
Toksik	< %30 hücre canlılığı

Sitotoksosite testlerinden biri olan MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit) yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı, kolorimetrik yöntemle nicel olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (McGahon et al., 1995). Bu reaksiyon bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenazın aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası, koyu mavi-mor formazan ürününe

dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır.

2.12. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Salım Analizi

Laktat dehidrogenaz, doku ya da hücre davranışını çalışmak üzere tıp, eczacılık ve biyoloji gibi birçok disiplinde kullanılan, hücrede dengede olan sitoplazmik bir enzimdir. Farklı hücre hatlarında LDH'nin kültür ortamında bulunması, hücrelerin fizyolojik durumunu tahmin etmek için kullanılan parametrelerden biridir. Örneğin bir ilacın karaciğer üzerindeki etkisini çalışırken, LDH'nin hepatosit kültür ortamına salımı bileşiğin toksisitesini yansıtmaktadır. Ortama LDH salımı ve ölü hücre sayısı arasında nicel bir bağlantı olduğu bilinmekte ve LDH salımındaki artış, sitotoksite göstergesi olarak analizlerde kullanılmaktadır (Legrand et al., 1992). Hücre kültür ortamı içinden hücreler uzaklaştırılıp süpernatant analiz edilerek LDH seviyesini ölçmek mümkündür. Bu metodun prensibi, NADH varlığında, LDH'nin katalizlediği reaksiyonla piruvatın indirgenmesi esasına dayanmaktadır. NADPH konsantrasyonundaki düşme hızı, spektrofotometrik olarak ölçülen, örnekteki LDH konsantrasyonu ile orantılıdır.

2.13. Metabolik Aktivasyon Testleri

Hücre metabolizmasındaki değişiklikler özellikle kanser hücrelerinde önem kazanmaktadır. Glukozun piruvata dönüşümüyle başlayan glikoliz, enerji metabolizmasının en önemli basamağını oluşturmaktadır. Çoğu memeli hücresinde oksijen varlığında glikoliz inhibe olurken, kanser hücrelerinde oksijen varlığında glikolizin arttığı gözlenmiştir. Çoğu birincil ve metastazik kanserlerde glukoz tüketiminde ciddi artış olduğu tespit edilmiştir. Artan glikoliz, malignan fenotipin esasını oluşturmakta ve invaziv kanser için de ayırt edici bir özellik olmaktadır (Gatenby and Gillies, 2004). Glukoz tüketimi, spektrofotometrik yöntemlerle ya da otomatik analiz yapan cihazlar ile ölçülebilmektedir.

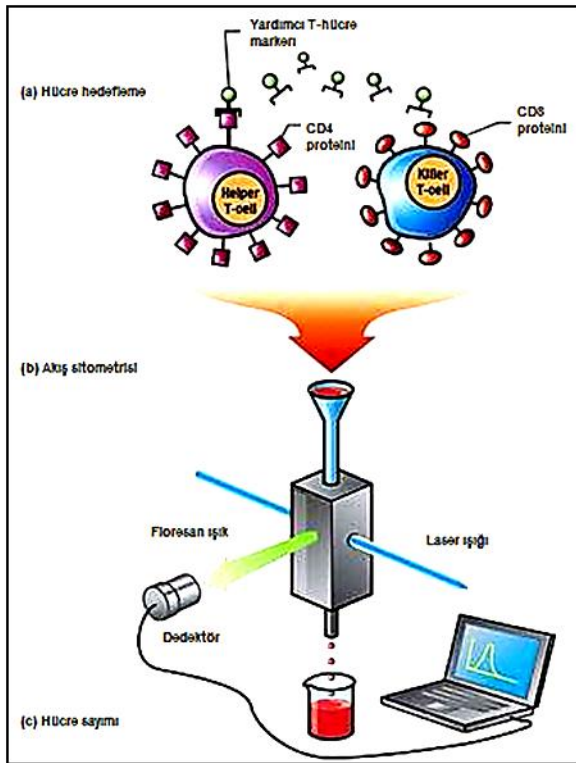
Kanser hücrelerinde yüksek glukoz tüketimi ve bunun sonucunda artan laktik asit üretiminin bu hücrelerin karakteristik özelliği olduğu bilinmektedir. Metastazik kolorektal kanserde artan glikolizin bir sonucu olarak laktat seviyesinde artış olduğu tespit edilmiştir (Hoiroyde et al., 1979).

Ayrıca çalışılan sistemde, tüketilen glukoz ile üretilen laktat arasındaki dengeyi analiz etmek üzere, metabolizma hakkında bilgi veren bir diğer parametre olan “verim faktörü” hesaplanmakta ve değerlendirmelerde kullanılmaktadır. Verim faktörü 0-2 arasında değişmektedir. Değerin düşük olması laktat üretiminin daha az olduğunu göstermektedir.

2.14. Akış Sitometri (Flow Sitometri)

Akış sitometri analizleri, klinik ve araştırma laboratuvarlarında, immünoloji, onkoloji, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, patoloji, bitki biyolojisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bu analizle hücreler, karışık bir süspansiyondan geleneksel yöntemlere göre daha hızlı, hassas, doğru ve nicel sonuçlar elde edilerek ayrıştırılıp incelenmektedir (Rahman, 2006).

Akış sitometri cihazı, sıvı akış sistemi, ışık kaynağı (lazer ışını), filtreler, sinyal detektörler, bilgisayar, yazılım programları ve ayırma mekanizması bileşenlerinden oluşmaktadır. Bu sistemde hücreler, sıvının içerisinde bir ışık demetinin önünden tek tek geçmektedir. Bu sırada elde edilen veriler istatistiksel analizle grafik haline getirilmekte ve yorumlanmaktadır (Şekil 2.13) (Rahman, 2006).



Şekil 2.13. Akış sitometrinin çalışma prensibi.

Akış sitometri analizi için hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla kan, kemik iliği, beyin-omurilik sıvısı, doku biyopsi örneği, parafin bloktaki dokular ve hücre kültürü örnekleri kullanılabilir. İleri saçılım kanal dedektörü (FSC) ile hücrenin boyutu hakkında, yana saçılım kanal dedektörü (SSC) ile granüler içerikler ve içyapı hakkında bilgi edinilmektedir. Ayrıca, floresan dedektör ile özgül olarak istenen hedef moleküller florokromla işaretlenerek hücre yüzey reseptörleri, sitokinler, DNA gibi hücre içi moleküller hakkında bilgi edinmek mümkündür. Çok renkli florokromlar ile farklı hücre gruplarının tespiti ve ölçümü, hücre içi organellerin tespiti, nükleik asit miktarının saptanması, enzim aktivitesinin ölçümü, apoptozis incelemeleri yapılabilmektedir (Taneli, 2007).

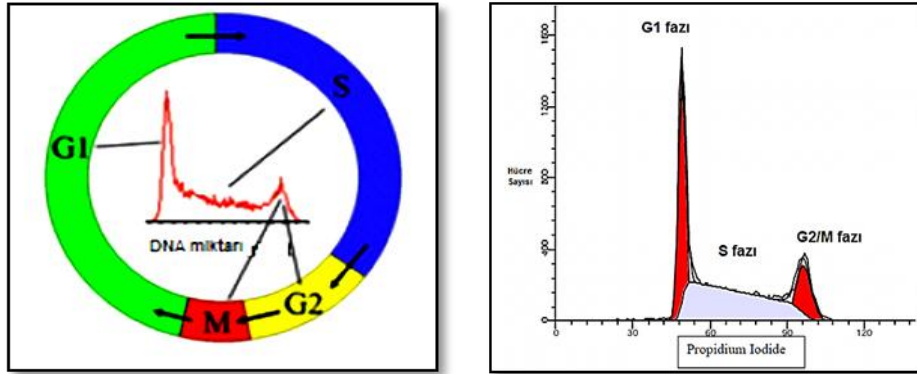
2.14.1. DNA analizi ve hücre döngüsü

Normal somatik bir hücrede diploid ($2n$) olan kromozom sayısı, nadiren tetraploid ($4n$) ya da oktaploid ($8n$) olabilirken, kanser hücrelerinde bu sayı genellikle $2n$ ve üzeri (hiperdiploid) olmaktadır. Bu anormal kromozom sayısına anöploidi denmektedir ve bu durumda DNA miktarında değişiklik görülmektedir (Bignold, 2006). Bir hücrenin DNA miktarını ölçerek hücrenin ploidi bilgisi, örneğin bir tümörde popülasyondaki hücrelerin hücre döngüsündeki dağılım bilgisi elde edilebilmektedir (Şekil 2.14).

Hücreler mitoz girmeden önce bir hazırlık safhası geçirmekte ve bu safhada hücreler hacimce büyümektedir. Bu hazırlık safhasında bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler ve makromoleküller sentezlenmektedir. Bu hazırlık safhasına interfaz denmektedir. İnterfaz kendi içinde G1, S, ve G2 olmak üzere çeşitli alt bölümlerden oluşmaktadır (Şekil 2.14). Mitoz ve interfaz birlikte hücre döngüsü olarak bilinen bir süreci oluşturmaktadır. G1 ve G2 kısaltmaları "gap" (ara, boşluk) sözcüğünden gelmektedir. S ise DNA sentezi (replikasyon) fazını göstermektedir. M ise mitoz anlamına gelmektedir. G0 fazı ise normalde hücre döngüsü içinde yer almayan ve döngüsünü tamamladıktan sonra döngüden çıkan hücrelerin bulunduğu fazdır. Hücreler bölünme uyarısı aldıkları zaman bu fazdan ayrılıp G1 fazına girerler. Bölünmeye devam etmeyip G1 fazından ayrılan hücreler ise farklılaşmak üzere ayrılırlar (Ulukaya, 2001).

DNA miktarını ölçmek için, hücreler DNA'ya bağlanan floresan boyalar ile boyanmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanı propidyum iyodür (PI)'dir. PI, hem DNA hem de RNA'ya bağlanabildiğinden hücreler önce RNAaz ile inkübe edilerek RNA

uzaklaştırılmaktadır. PI hücre zarından içeri giremediğinden hücreler önce tespit edilmeli ya da geçirgen hale getirilmelidir.



Şekil 2.14. A. Hücre döngüsü ve DNA histogramı arasındaki ilişki B. Hücre döngüsüne ait histogram örneği (Ormerod, 2011).

2.15. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, *in vitro* koşullarda DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanan basit, özgül ve hassas bir tekniktir. PZR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama DNA zincirinin açılmasıdır (Denaturation). Kalıp DNA, 92-95 °C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. İkinci aşama, çoğaltılmak istenen gen bölgesini içeren kısa DNA dizileri olan primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışmasıdır (Annealing). Reaksiyon sıcaklığı, 37-65 °C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması sağlanmaktadır. Üçüncü aşama primer uzamasıdır (Primer Extension). DNA zincirleri üzerine yapışan primerler DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) aracılığıyla uzatılmaktadır. Taq DNA polimeraz 72 °C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır. PZR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadar olmaktadır. Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PZR döngüsünü temsil etmektedir. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçasığı çoğaltılmış olmaktadır. PZR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamit jellerde yürütüldükten sonra, etidyum bromür (EtBr) veya gümüş nitrat ile boyanarak görüntülenmektedir (Yılmaz ve Devran, 2003).

Amaca göre PZR metotları çeşitlilik göstermektedir. Bunlardan biri olan Ters Transkriptaz PZR (Reverse Transcriptase PCR, RT-PZR) metodunda, çoğaltılması hedeflenen RNA (mRNA, tRNA, viral RNA veya viroid RNA'sı) önce ters transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrilir ve daha sonra standart PZR kullanılarak çoğaltma işlemi yapılmaktadır (Yılmaz ve Devran, 2003).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada iki farklı insan kolon adenokarsinom hücre hattı kullanılmıştır. 44 yaşında Kafkas bir kadından elde edilen HT-29 hücre hattı (Derece-1 kolon adenokarsinom) ve 72 yaşında Kafkas bir erkekten elde edilmiş olan Caco-2 hücre hattı (Derece-2 kolon adenokarsinom) Şap Enstitüsü bünyesindeki Hücre Bankası Hücre Kültürü Koleksiyonu'ndan (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir. Her iki hücre hattı % 10 fetal sıgır serumu (FSS) (Hyclone Logan, UT, USA), 2mM glutamin ve % 1 iz elementleri içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerinde (Biochrom AG, Berlin, Almanya), % 5 CO₂ içeren etüvde 37 C° de inkübe edilerek üretilmiştir.

3.2. Hücrelerin Karakterizasyonunun Yapılması

3.2.1. Hücrelerin Sterilite Testlerinin Yapılması

3.2.1.1. Akridin oranj ile inklüzyon cisimciklerinin boyanması

1. Tek tabakalı olarak üretilen hücreler PBS ile yıkanıp, Carnoy's fiksatif (3:1 metanol/glasiyal asetik asit) ile 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
2. Hücreler, McIlvaine's tamponu (pH=3,8) ile 2 dakika inkübasyona bırakılarak 3 kez yıkanmıştır.
3. McIlvaine's tamponu içerisinde % 0,5 akridin oranj ile boyanmak üzere 30 dakika inkübe edilmiş ve floresan mikroskop ile incelenmiştir. Sonuçlar, RNA'nın kırmızı, DNA'nın ise sarı-yeşil renkte boyanmasına göre değerlendirilmiştir.

3.2.1.2. Mikoplazma testi

1. Direkt yöntem: En az 3 pasajı antibiyotiksiz ortamda üretilmiş olan HT-29 ve Caco-2 hücreleri, ikişer adet 24 gözlü hücre kültürü plaklarında başlangıç hücre sayısı 2×10^3 olacak şekilde üretilmiştir. 1ml/göz olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanarak 37°C CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İndirekt yöntem: Mikoplazmaya hassasiyet gösteren Vero hücreleri başlangıç sayısı 5×10^3 olacak şekilde hazırlanıp 24 gözlü plaklarda üretilmiş, 2 saat hücrelerin plaklara tutunması beklenmiş ve üzerine HT-29 ve Caco-2 hücrelerinin kültür ortamından alınan örnekler konmuştur (kontrol gözlere test örneği konmamıştır).

2. Bu şekilde 4 gün 37°C'de inkübe edilmiştir.
3. Her hücre için ikişer göz veya petri alınarak içindeki besiyeri boşaltılmıştır. 2 ml Carnoy's fiksatif damla damla ilave edilerek hücreler 3 dakika oda sıcaklığında tespit edilmiş, sonrasında dökülerek kurumaya bırakılmıştır.
4. Son konsantrasyonu 0,1 µg/ml olacak şekilde DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indole) boyası 2 ml/göz olacak şekilde konmuştur.
5. 10-15 dakika ışık almayacak şekilde oda sıcaklığındaki inkübasyondan sonra, 37°C'de 30 dakika bekletilmiş ve floresan mikroskopta incelenmiştir. Mikoplazmaların varlığı çekirdek dışında ve hücrelerarasında floresan ışımaya veren bağlantıların görülmesi ile saptanmaktadır. Burada negatif kontrolün çekirdek dışı floresan ışımaya göstermemesi gerekmektedir.

3.2.2. Üreme eğrisi ve ikilenme zamanının hesaplanması

HT-29 ve Caco-2 hücrelerine ait üreme eğrileri çıkartılıp populasyon ikilenme zamanı hesaplanarak mitoz için gerekli olan süre saptanmıştır. Bu sayede hücrelerin üreme özelliği belirlenmiş ve bu süreler çalışma boyunca kullanılmıştır. Üreme eğrilerinin çıkartılması için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

1. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinin başlangıç sayısı 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde 40 ml hücre süspansiyonu hazırlanmıştır.
2. 10 gün boyunca 2 tekrar yapmak amacıyla 20 adet 9 cm²'lik hücre kültürü petrilere 2 ml/petri olacak şekilde her bir hücre süspansiyonu konmuştur. Petriler 37° C ve % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
3. 2 saat sonra her numune için 2 petri alınarak içindeki besiyeri boşaltılmış, petrilere 1 ml tripsin/EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (Hyclone Logan, UT, USA) konarak hücreler yüzeyden ayrılmış ve hücre sayımı yapılmıştır. İki petrinin hücre sayısı ortalaması alınarak bu sayı t₀ olarak kaydedilmiştir.
4. Her gün aynı saatte 2 petri alınarak bu işlemler 10 gün boyunca tekrarlanmıştır. Sonuçlar t₁-t₁₀ olarak kaydedilmiştir. Excel programı kullanılarak üreme eğrisi çizilmiş ve populasyon ikilenme zamanı hesaplanmıştır.

3.3. Hiperisin (4,5,7,4',5',7'-hekzahidroksi-2,2'-dimetilnaptodiantron)

Hiperisin (HPLC grade, AppliChem, Darmstadt, Almanya) dimetil sülfoksit (DMSO) içinde 4 mM'lık stok çözelti olarak hazırlanmış ve -80 °C'de karanlıkta saklanmıştır. Çalışmada kullanılacak olan hiperisin konsantrasyonlarını tespit etmek için ön çalışmalar yapılmıştır. Bu sonuçlara göre hem HT-29 hem de Caco-2 hücreleri için 0,04 µM, 0,08 µM ve 0,15 µM hiperisin konsantrasyonları seçilmiştir. Bu konsantrasyonlar DMEM besiyeri içinde sulandırılarak stok çözülden taze olarak hazırlanmıştır. DMSO, besiyerindeki son konsantrasyonu % 0,1'i geçmeyecek şekilde kullanılmıştır.

3.4. Işıma Cihazı

Işıma cihazı, 590-600 nm'de maksimum yayılım (emmission) gösteren 12 adet L18 W/30 floresan lambadan (Osram, Berlin, Almanya) oluşturulmuştur. Lambaların verdiği yayılım aralığı, hiperisinin aktive olması için gereken absorbans aralığını (530-620 nm) içermektedir. Lambaların üzerine buzlu beyaz renkte ışığı kesmeyen ancak hücrelerin ışığa doğrudan temasını engelleyen poliakrilik (pleksiglas) bir levha yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Işıma süresince sıcaklık artışını engellemek için ışıma cihazının yanlarına toplam 8 adet fan yerleştirilmiştir.

Fotometride belirli bir alana düşen ışık şiddetinin uluslararası birimi lüks, lümen/cm² yüzey alanı ya da metrik olmayan sistemde foot candle (fc) olarak verilmektedir. Çalışmamızda, ışıma şiddeti 30 kilolüks (klüks) olarak belirlenmiş ve TES 1335 marka lüksmetre (ışık ölçer) (Rotronic, Taipei, Tayvan) ile ışıma süresince ölçülmüştür (Şekil 3.1). 15,1 dakika boyunca ışıma yapıldığında uygulanan ışık şiddeti 4 Joule/cm² (J/cm²) olarak hesaplanmıştır.

$$1 \text{ fc} = 10,7 \text{ lüks}$$

$$30 \text{ klüks} = 0.0044 \text{ watt/cm}^2$$

$$0.0044 \text{ watt/cm}^2 \times 15,1 \text{ dakika} = 4 \text{ J/cm}^2$$



Şekil 3.1. A.İşıma cihazının üzerinde pleksiglas kapağı ve yanlarda fanların, B.Üstten floresan lambaların, C.Lüksmetrenin görüntüsü.

3.5. Uygulama Basamakları ve Hiperisin Aktivasyonu

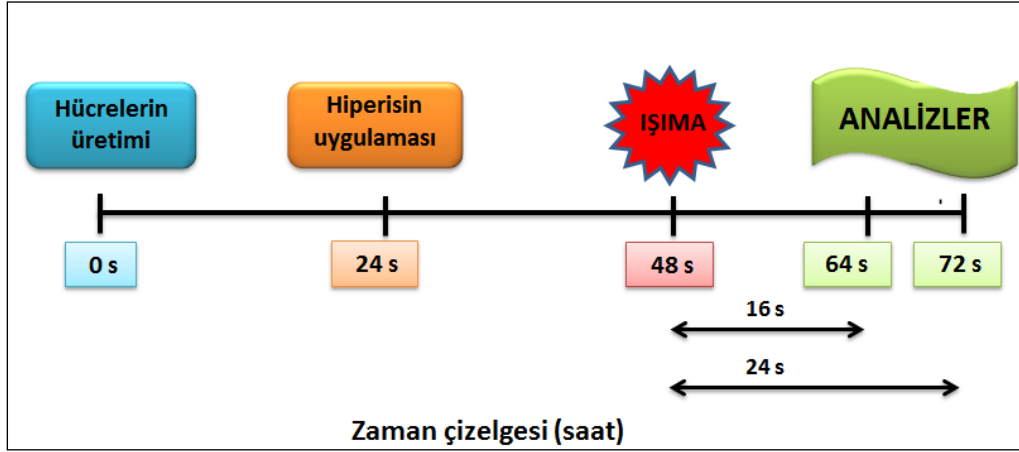
HT-29 ve Caco-2 hücreleri % 10 fetal sığır serumu içeren DMEM içerisinde 75 cm²'lik flasklarda üretilmiştir. Pasajlama olarak adlandırılan işlemle yüzeyi tamamen kaplayan hücreler, tripsin/EDTA ile yıkanarak tutundukları yüzeyden ayrılmış ve farklı analizlerin yapılacağı kültür kaplarında üretilmiştir.

Belirlenen üç hiperisin konsantrasyonu stok hiperisin çözeltisinden DMEM besiyeri içinde sulandırılarak karanlıkta taze olarak hazırlanmıştır. Hücreler üretime konduktan 24 saat sonra eski besiyeri dökülmüş, yerine hiperisinin farklı konsantrasyonlarını içeren DMEM besiyeri karanlık ortamda eklenmiştir. Oluşturulan deney grupları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deney grupları

Grup	Hücre	Hiperisin konsantrasyonu	Işık (4 J/cm ²)
Grup 1 (Kontrol)	HT-29	-	+
Grup 2 (DMSO Kontrol)	HT-29	- (DMSO +)	+
Grup 3	HT-29	0,04 µM hiperisin	+
Grup 4	HT-29	0,08 µM hiperisin	+
Grup 5	HT-29	0,15 µM hiperisin	+
Grup 6 (Işıma Kontrol)	HT-29	0,15 µM hiperisin	-
Grup 7 (Kontrol)	Caco-2	-	+
Grup 8 (DMSO Kontrol)	Caco-2	- (DMSO +)	+
Grup 9	Caco-2	0,04 µM hiperisin	+
Grup 10	Caco-2	0,08 µM hiperisin	+
Grup 11	Caco-2	0,15 µM hiperisin	+
Grup 12 (Işıma Kontrol)	Caco-2	0,15 µM hiperisin	-

Hiperisinli besiyeri eklendikten sonra plaklar alüminyum folyo ile sarılarak % 5 CO₂' li etüve kaldırılmıştır. 24 saat sonra etüvden çıkarılmış ve hiperisin içeren besiyeri dökülerek fenol kırmızısı içermeyen, % 8 FSS içeren DMEM ile değiştirilmiştir. Işıma cihazı, ışımadan 45 dakika önce açılmış, ışımada 30 klux olarak ölçülmüş ve ışık şiddetinin sabitlendiği görüldükten sonra hücreler 15,1 dakika boyunca cihazın üzerine konmuştur. Işıma süresince lehva üzerindeki termometre ile sıcaklık ölçülmüş ve 28 °C' yi geçmemiştir. Bu süre sonunda hücreler tekrar % 5 CO₂' li etüve kaldırılmıştır. Işımadan 16 saat ve 24 saat sonra etüvden çıkarılan plaklardaki hücreler analizler için kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Deney planı.

3.6. Hiperisinin Hücre İçine Alımının Analizi

HT-29 ve Caco-2 hücreleri 25 cm² flaklarda başlangıç sayısı 50x10⁴ olacak şekilde üretilmiştir. Hiperisin uygulaması ve ışımayı takiben 24 saat sonra akış sitometride hiperisini alan hücrelerin floresan ışımaya şiddeti ölçülmüştür. Hiperisin uygulama gruplarına ait ortalama floresan yoğunluğu, kontrol gruba oranlanarak relatif (bağıl) floresan yoğunluk hesaplanmış ve değerlendirmelerde kullanılmıştır (Jendzelovský et al., 2009).

1. Hiperisin ile inkübasyonu takiben hücrelerin üzerine 5 mM EDTA/PBS eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücre kazıyıcısı ile hücreler yüzeyinden kaldırılmıştır.
2. Daha sonra hücreler tüplere konmuş ve 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve hücreler hafifçe vortekslelendikten sonra akış sitometri (EPICS XL-MCL Beckman Coulter, USA) cihazında 10.000 hücre sayılarak floresan yoğunluğu ile hücre sayısını gösteren tek parametrelili histogramda analiz edilmiştir.

3.7. Hücre sayımı, Yüzen ve Tutunan Hücre Yüzdesi, Canlılık Analizi

HT-29 ve Caco-2 hücreleri sayımlar ve canlılık analizi için, 6 gözlü doku plaklarına 60x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde konmuş, deney planı doğrultusunda uygulama yapılmıştır. Hiperisinin aktivasyonundan 16 saat ve 24 saat sonra besiyerinde yüzen hücreler sayılırken, tutunan hücreleri saymak üzere hücreler tripsin/EDTA ile yüzeyden ayrılmıştır. Hücreler, % 0,5'lik tripan mavisi (Hyclone, Logan, UT) ile

boyanmış, sayım için hemositometre (Bürker lamı) kullanılmıştır. Bürker lamındaki tüm karelerde boyayı almayan (canlı) ve boyayı alan (ölü) hücreler ışık mikroskopunda sayılmıştır. Hücre canlılığı (yüzen + tutunan), sayılan toplam 100 hücreden boyayı almayan hücreler kullanılarak yüzde olarak, yüzen ve tutunan hücre yüzdeleri toplam hücre sayısına oranlanarak hesaplanmıştır.

3.8. Sitotoksosite Analizi

1. HT-29 ve Caco-2 hücreleriyle başlangıç sayısı 3×10^4 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır.
2. Hücre süspansiyonları 3 tane 96 gözlü plağa 100µl /göz olacak şekilde dağıtılmış ve % 5 CO₂' li etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 3.2'de gösterildiği şekilde deney planı uygulanmıştır.
3. 16 saat ve 24 saat inkübasyon sonrasında MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisinden 13 µl/göz olacak şekilde gözlere konmuş ve plaklar ışık almayacak şekilde aliminyum folyo ile sarılarak % 5 CO₂'li etüvde 4 saat inkübe edilmiştir.
4. Mikroskopta formazan kristallerinin oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir. Formazan kristallerini çözmek için bütün gözlere izopropil alkolden 100 µl/göz olacak şekilde konmuştur.
5. Plakların absorbanı 570 nm dalga boyunda mikroplak okuyucuda (BİOTEK, µQuant) okutulmuştur. Deney 3 farklı zamanda tekrarlanmış ve ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir. MTT sonucu elde edilen OD (optik density) değerleri kullanılarak % canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{Uygulama grubuna ait OD değeri}}{\text{Kontrol grubuna ait OD değeri}} \times 100$$

3.9. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesinin Ölçümü

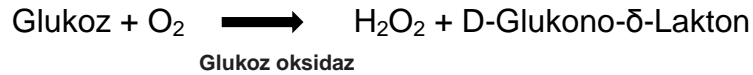
Bu metodun prensibi, NADH varlığında, LDH'ın katalizlediği reaksiyonla piruvatın indirgenmesi esasına dayanmaktadır. NADPH konsantrasyonundaki düşme hızı, spektrofotometrik olarak 340 nm'de ölçülen, örnekteki LDH katalitik konsantrasyonu ile orantılıdır. LDH aktivitesinin ölçümü için, hiperisin uygulaması öncesinde ve

aktivasyonundan 16/24 saat sonra hücrelerin kullandığı besiyeri örnekleri alınmıştır. Örnekler 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant LDH ölçümlerinde kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır. LDH salımı analiz için Spinreact LDH Pyruvate, Kinetic UV. DGKC (Sant Esteve De Bas, İspanya) kiti kullanılmış ve ölçümler Shimadzu UV-1700 marka spektrofotometrede yapılmıştır. Sonuçlar, hiperisin uygulaması öncesinde ve hiperisin aktivasyonu sonrasında ölçülen LDH enzim aktivitesi (U/L) ve LDH miktarındaki artış (%) olarak verilmiştir.



3.10. Metabolik Aktivasyon Testleri

Hiperisin uygulamasına bağlı olarak hücrelerin glukoz tüketiminde ve laktat üretiminde meydana gelen değişiklikler ölçülmüştür. Ölçümün yapıldığı cihaz, glukoz oksidaz ve laktat oksidaz enzimlerini içeren bir membrana sahiptir ve oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan H₂O₂ cihazın elektrokimyasal probu için sinyal yaratmaktadır.



1. Hiperisin uygulaması öncesinde ve ışığa ile aktivasyondan 16 veya 24 saat sonra HT-29 ve Caco-2 kolon adenokarsinom hücrelerinin kullandığı besiyeri örnekleri alınmıştır.
2. Besiyerindeki hücreleri uzaklaştırmak amacıyla örnekler 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant glukoz ve laktat konsantrasyonlarının (g/L) ölçümlerinde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.
3. Tüm örnekler YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Ohio, USA) cihazında otomatik olarak ölçülmüştür.
4. Hiperisin aktivasyonu öncesi ve sonrasında ölçülen glukoz konsantrasyonlarının farkı alınıp geçen inkübasyon süresine bölünerek "glukoz tüketimi" hesaplanmıştır.

$$\text{Glukoz tüketimi} = \frac{\Delta \text{ Glukoz tüketimi (g/L)}}{\Delta \text{ Zaman (saat)}}$$

5. Hiperisin aktivasyonu öncesi ve sonrasında ölçülen laktat konsantrasyonlarının farkı alınıp geçen inkübasyon süresine bölünerek "laktat üretimi" hesaplanmıştır.

$$\text{Laktat üretimi} = \frac{\Delta \text{ Laktat üretimi (g/L)}}{\Delta \text{ Zaman (saat)}}$$

6. Ayrıca çalışılan sistemin verim faktörü hesaplanmıştır.

$$\text{Verim faktörü (Y)} = \frac{\Delta \text{ Laktat üretimi (g/L)}}{\Delta \text{ Glukoz tüketimi (g/L)}}$$

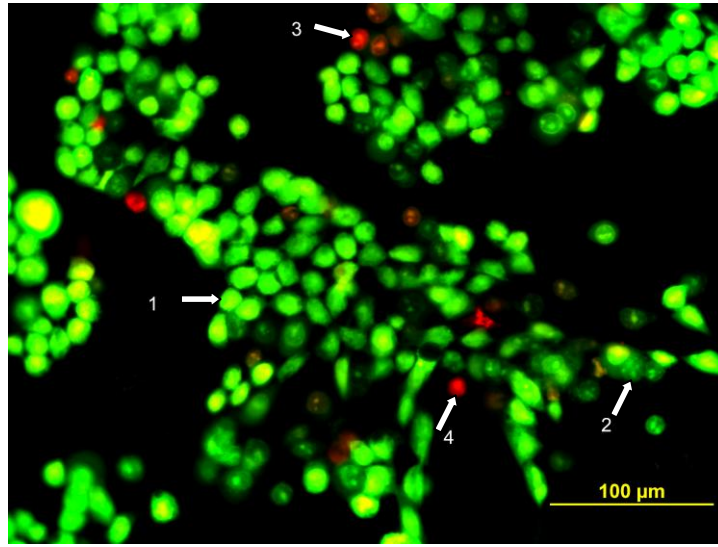
3.11. Apoptotik İndeksin DAPI Boyaması ile Belirlenmesi

Kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu ile karakterize olan apoptotik hücrelerin çekirdekleri DAPI ile boyanarak floresan mikroskopta incelenmiştir. DAPI, hücre zarından geçebilen, DNA'da özellikle adenin ve timince zengin bölgelere bağlanan floresan bir boyadır.

1. HT-29 ve Caco-2 hücreleri 6 gözlü plaklara başlangıç sayısı 50×10^4 /göz olacak şekilde hazırlanmıştır. Hiperisin aktivasyonundan 16 saat ve 24 saat sonra besiyeri dökülmüş, Carnoy's fiksatif yavaşça damlatılarak hücreler tespit edilmiştir.
2. $1 \mu\text{g/ml}$ DAPI ile 15 dakika karanlıkta boyanmıştır.
3. DAPI dökülmüş, plaklar etüvde 30 dakika kurutulmuştur.
4. Hücreler floresan ataşmanlı inverted mikroskopta (Olympus IX71, Japonya), DPController görüntüleme sisteminde incelenmiştir. Sonuçlar minimum 300 hücre sayılarak apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı (%) apoptotik indeks olarak verilmiştir.

3.12. Hücre Ölüm Tipinin Akridin Oranj/Propidyum İyodür (AO/PI) Boyaması ile Belirlenmesi

HT-29 ve Caco-2 hücreleri dört gözlü plaklarda 50×10^4 /göz başlangıç sayısı ile üretilmiştir. Hiperisin ve ışık uygulamasından 16 saat ve 24 saat sonra hücreler tespit edilmeden doğrudan 1:1 oranında karıştırılan AO/PI (AO 25 $\mu\text{g/ml}$: PI 25 $\mu\text{g/ml}$) ile boyanarak inverted mikroskopta (Olympus IX71, Japonya) incelenmiştir. Toplam 200 hücre sayılarak canlı, apoptotik, sekonder nekrotik ve nekrotik hücre sayısı yüzde olarak verilmiştir. Değerlendirmeler, çekirdek morfolojisi ve zar bütünlüğüne göre yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Akridin oranj ve propidyum iyodür boyamasına göre canlı ve ölü hücrelerin boyanması (1. Canlı hücre, 2. Erken apoptoz, 3. Geç apoptoz (Sekonder nekroz), 4. Nekroz).

Canlı hücreler kompakt çekirdeğe sahiptir ve zar bütünlüğü bozulmadığından PI hücre içine girmez ve sadece yeşil renklidir; apoptotik hücreler kondanse veya fragmente olmuş çekirdeğe sahip ve yeşil renklidir; nekrotik hücreler canlı hücreler gibi kompakt bir çekirdeğe sahiptir ve zar bütünlüğü bozulduğundan PI hücre içine alınmış, kırmızı renklidir; sekonder nekrotik hücreler ise apoptotik özellikleri taşıyan ama zar hasarı nedeniyle kırmızı boyanan hücrelerdir (Mikeš et al., 2007).

3.13. Hücre Morfolojisinin Giemsa Boyamasıyla Belirlenmesi

Hücreleri morfolojik açıdan incelemek üzere hiperisin uygulamasından 16 saat ve 24 saat sonra Giemsa ile boyanarak ışık mikroskobunda incelenmiştir. Giemsa nötr, iyonik olmayan ve suda çözünen renkli bir boyadır.

1. 6 gözlü plaklara başlangıç sayısı 1×10^4 /göz olacak şekilde hazırlanan HT-29 ve Caco-2 hücreleri PBS ile yıkanmıştır.
2. Hücreler önce PBS: metanol (1:1,5) karışımı, sonra saf metanol ile (iki defa değiştirilerek) tespit edilmiştir.
3. Hücreler, Giemsa solüsyonu (PAA, Pasching, Austria) ile 1 dakika boyanmış ve akan suda yıkanmış, kurumadan ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Japonya) incelenmiştir.

3.14. Akış Sitometride Hücre Döngüsünün Belirlenmesi

HT-29 ve Caco-2 hücreleri 25 cm^2 flaklarda başlangıç sayısı 5×10^4 olacak şekilde kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hiperisin uygulaması ve ışımadan 16 saat ve 24 saat sonra akış sitometride hücre döngüsü analizi yapılmıştır.

1. Hiperisin ile inkübasyonu takiben hücrelerin üzerine 5 mM EDTA/PBS eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücre kazıyıcısı ile hücreler flaskın yüzeyinden kaldırılmıştır.
2. Daha sonra hücreler tüplere konulmuş ve 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve hücrelerin üzerine 1 ml PBS eklenip vortekslenerek hücreler % 99'luk etil alkolde tespit edilmiştir.
3. Bir gece $+4^\circ \text{C}$ 'de inkübe edildikten sonra tespit edilen hücrelerin üzerine 3 ml PBS eklenmiş ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve hücrelerin üzerine 70 μl RNaz ve 50 μl Propidyum iyodür (PI) ilave edilerek 20 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücre döngüsü analizi akış sitometri cihazında (EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, USA) 10000 çekirdek sayılarak iki değişkenli histogramdan hücre döngüsü değerlendirilmiştir.
4. G0/G1, S, G2/M fazları Multicycle (Phoenix, USA) yazılım programı kullanılarak yüzde olarak belirlenmiştir.

3.15. Disaderin ve F-aktinin İmmünfloresan Boyaması

HT-29 ve Caco-2 hücreleri başlangıç sayısı 5×10^4 olacak şekilde 8 kuyucuklu plaklarda (Lab-Tek™ II Chamber Slide, NUNC A/S, Roskilde, Danimarka) üretilmiştir. Hiperisin uygulaması ve ışımadan 16 saat ve 24 saat sonra immünboyama yapılmıştır.

1. Besiyeri dökülerek hücreler PBS ile yıkandıktan sonra % 4'lük paraformaldehit ile 10 dakika tespit edilmiştir.
2. Absol alkolde -20 °C'de 20 dakika tutulduktan sonra üç kere 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır.
3. % 0,1'lik TritonX 100 ile 1 dakika bekletilmiş ve üç kere 5'er dakika PBS ile yıkanmıştır.
4. Sekonder antikorun geliştirildiği canlı olan keçi serumu (sc-2043, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) % 2'lik PBS ile hazırlanmıştır. Hücreler, 30 dakika bu serumda bekletilerek spesifik olmayan bağlantılar engellenmiştir.
5. Üç kere 5'er dakika PBS ile yıkama yapılmıştır.
6. Primer antikor tavşanda geliştirilen poliklonal disaderin (sc-98246, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) % 1,5'lik keçi serumu ile 1:50 sulandırılmış ve hücrelerle 1 gece nemli ortamda + 4 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.
7. Üç kere 5'er dakika PBS ile yıkama yapılmıştır.
8. Keçide tavşana karşı geliştirilen ve Texas red (kırmızı) işaretli sekonder antikor (sc-2780, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) % 1,5'lik keçi serumu ile 1:100 sulandırılmış ve karanlıkta 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
9. Üç kere 5'er dakika PBS ile yıkama yapılmıştır.
10. Fibröz aktini boyamak üzere Alexa Fluor 488 (yeşil) işaretli phalloidin (Invitrogen A 12379, CA, USA) ile doğrudan boyama yapılmıştır. 5 µl stok çözelti her bir örnek için % 0,1 BSA/PBS ile 200 µl'ye sulandırılmış ve karanlıkta 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Phalloidin, *Amanita phalloides* mantarından elde edilen ve zehirli bisiklik heptapeptid olan phallotoksinlerden biridir. Phalloidin, F-aktinlere sıkıca bağlanıp depolimerizasyonunu engelleyerek F-aktini sabitlemektedir.
11. Üç kere 5'er dakika PBS ile yıkama yapılmıştır.
12. DAPI'li kapatma ortamı (sc-24941, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) kullanılarak lamın üzeri lamel ile kapatılmış ve -20°C'de karanlıkta saklanmıştır. Preparatlar, Olympus IX71 floresan ataşmanlı inverted mikroskopta DPController sisteminde uygun filtreler kullanılarak incelenmiştir.

3.16. Disaderin İfadesinin RT-PZR ile Ölçülmesi

3.16.1. Total RNA izolasyonunun yapılması

Başlangıç sayısı 6×10^4 olacak şekilde 25 cm^2 lik flasklarda üretilen HT-29 ve Caco-2 hücrelerinden hiperisin aktivasyonundan 16 saat ve 24 saat sonra RNA izolasyon kiti kullanılarak (Qiagen 74104, Valencia, CA, USA) total RNA izolasyonu yapılmıştır.

1. Yüzen hücreleri de analize dahil etmek amacıyla, besiyeri 1800 rpm'de 20°C 'de 5 dakika santrifüj edilmiş, pelet kullanılmıştır. β -merkaptoetanol içeren denatüre edici solusyon eklenerek hücre lizisi sağlanmıştır.
2. Üzerine aynı hacimde yıkama solusyonu eklenmiş, 15 saniye 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
3. Kitten çıkan kolona aktarılmış ve üzerine 0,5 ml ekstraksiyon çözeltisi eklenmiştir. 15 saniye 10000 rpm'de santrifüj edilmiş, kolondan süzülüp alta geçen kısım atılmıştır.
4. Ekstraksiyon çözeltisi, aynı hacimde yeniden eklenmiş ve 2 dakika 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süzülüp kolonun altına geçen kısım atılmıştır. 3 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
5. Üst kısma 50 μl RNAaz içermeyen su konmuş ve RNA'nın çözünmesi sağlanmıştır. 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Alta geçen kısım yeniden kolonun üst kısmına konup 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
6. Elde edilen RNA miktarı, Nano Drop cihazında (Thermoscientific 2000C) ölçülmüştür. Örnekler -80°C 'de saklanmıştır.

3.16.2. Elde edilen RNA'nın RT-PZR ile cDNA'ya çevrilmesi

Daha kırılgan olan RNA'nın PZR ile çoğaltılabilmesi için cDNA'ya çevrilmesi gereklidir. Bu amaç için RT-PZR kiti (Invitrogen 18080-051, CA, USA) kullanılmıştır. Elde edilen cDNA miktarı, Nano Drop cihazında (Thermoscientific 2000C) ölçülmüştür.

1. RNA sentez karışımı:

- | | | |
|-----------------------------------|---|--|
| - 3 μl elde edilen RNA | } | 10 μl lik karışım |
| - 1 μl primer oligo dT | | 65 $^\circ\text{C}$ ' de 5 dakika inkübasyon |
| - 1 μl 10 mM dNTP | | |
| - 5 μl DEPC steril su | | |

2. cDNA sentez karışımı:

- 2 µl 10X RT buffer
- 4 µl 25 mM MgCl₂
- 2 µl 0,1 mM DTT
- 1 µl RNAaz OUT
- 1 µl superscript III Reverse transkriptaz

-10 µl RNA sentez karışımı ve
10 µl cDNA sentez karışımı bir tüpe alınmıştır.
-PZR cihazında aşağıdaki koşullarda reaksiyon başlatılmıştır.

3. cDNA sentezi

- 50 °C'de 50 dakika
- 85 °C'de 5 dakika

4. Ortamda kalan RNA'ların parçalanması:

- Örnekler hızla buza alınıp soğutulmuştur.
- 1 µl RNAaz H eklenmiştir.
- 37 °C'de 20 dakika beklenmiş ve elde edilen cDNA -20 °C'de saklanmıştır.

3.16.3. Elde edilen cDNA'nın disaderin primerleri kullanılarak PZR'sinin yapılması

RT-PZR ile total RNA'dan cDNA ya çevrilen örneklerde, disaderin genine özgü tasarlanan primerler sadece bu gen bölgesine eşlenik dizilere bağlanacak ve PZR reaksiyonu ile sadece bu gen bölgesi çoğaltılmış olacaktır. Pozitif kontrol olarak tüm hücrelerde sentezlendiği bilinen siklofilin A'ya ait primerler kullanılarak ayrı bir reaksiyon hazırlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. RT-PZR için kullanılan primerlerin özellikleri.

Gen	Primer (5'-3')	Baz çifti	Yapışma sıcaklığı (°C)
Disaderin	İleri: TCCCACTGATGACACCACGA	201	59,8
	Geri: ACTTGCCCACTGGTGAGGATGAT		60,3
Siklofilin A	İleri: AGGTCCCAAAGACAGCAGAA	406	58
	Geri: TGTCCACAGTCAGCAATGGT		58

Negatif kontrol olarak cDNA yerine su konmuş ve ayrı bir reaksiyon hazırlanmıştır. Çalışmada Thermo Hybaid Px2 96 gözlü gradient PZR cihazı kullanılmıştır.

Disaderin primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR karışımı toplamda 25 µl' dir.

- 2,5 µl 10X tampon	} <u>PZR koşulları:</u>	94 °C'de 2 dakika	} 30 döngü
- 0,4 µl MgCl ₂ (25 mM)		94 °C'de 30 saniye	
- 0,2 µl dNTP (25 mM)		56 °C'de 30 saniye	
- 1 µl Primer ileri (10 pmol)		72 °C'de 45 saniye	
- 1 µl Primer geri (10 pmol)			
- 0,2 µl Taq polimeraz			
- 18 µl dH ₂ O			
- 2 µl kalıp cDNA			

3.16.4. Örneklerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

Disaderin gen bölgesi 201 baz çifti büyüklüğündedir ve % 2'lik agaroz jel, tris borat ETDA (TBE) tampon çözeltisiyle hazırlanarak kullanılmıştır. İçerisine DNA'nın UV ışıkta görünmesini sağlayan EtBr eklenmiştir. Oda sıcaklığında donan jelle 5 µl DNA ve 2 µl yükleme boyası eklenerek jeldeki kuyucuklara yükleme yapılmıştır. Örnekler, negatif yüklü DNA'nın elektrik akımı sayesinde pozitif kutba doğru ilerlemesi için 70 Volta 60 dakika yatay elektroforezde yürütülmüştür. Bant büyüklüğünü karşılaştırmak üzere 100 bp marker da jelle yürütülmüştür. Syngene Gene Genius görüntüleme sistem ile jelin resmi çekilmiş, bant yoğunlukları Gene Tools Analysis Software 3.02.00 (Synoptecs) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Deneyler farklı zamanlarda üç kere tekrarlanmıştır. Sonuçlar bağıl ifade düzeyi (disaderin bant bütüklüğü/siklofilin A bant büyüklüğü) olarak verilmiştir.

3.17. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizinde STATISTICA istatistik programları kullanılmıştır. İstatistiksel önem kontrolü $P \leq 0,05$ düzeyinde yapılmıştır. Hiperisin uygulamasının etkileri varyans analizi (ANOVA) kullanılarak araştırılmıştır. Analizler uygulamadan 16 ve 24 saat süre sonra yapıldığından, varyans analizi modeli kurulurken her parametre için "hiperisin konsantrasyonu" ve "inkübasyon süresi" olmak üzere iki değişken seçilmiş; dolayısıyla çok-yönlü varyans analizi (Factorial ANOVA) yapılmıştır. Bu analizler sonucunda, istatistiksel açıdan anlamlı F-

değerleri veren parametreler için ileri (*post hoc*) testler uygulanmıştır. Her grup için örnek büyüklüğü aynı olduğundan, post hoc testlerin yapılması gerektiğinde eşit örneklem büyüklüğüne dayalı Tukey testi kullanılmıştır. Çok-yönlü varyans analizine göre, inkübasyon süresinde hiperisin uygulamasına verilen yanıt açısından bir fark olmadığı durumda her bir inkübasyon süresi için standart tek-yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) kullanılmıştır. Varyans analizleri uygulanmadan önce, çalışmadaki parametrelerin normal dağılıp dağılmadıkları Kolmogorov-Smirnov parametrik-olmayan (*non-parametric*) testi ile incelenmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. Sterilite Test Sonuçları

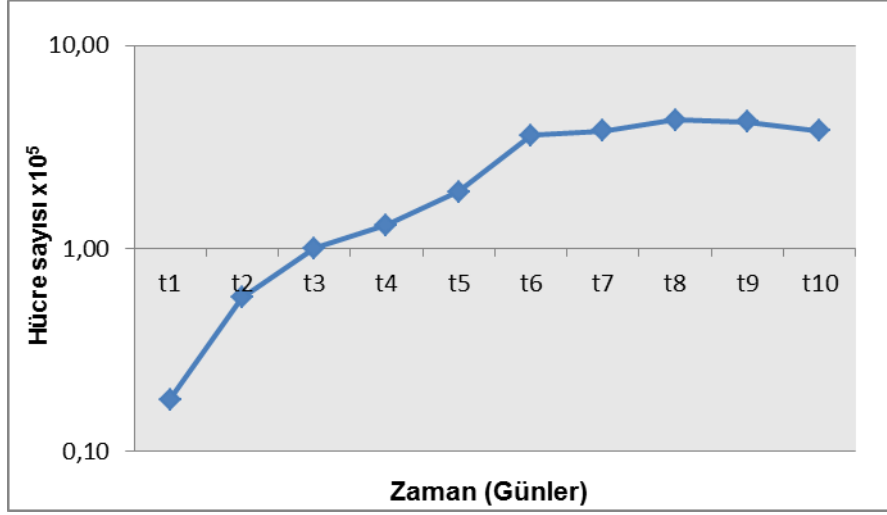
HT-29 ve Caco-2 hücreleri ile çalışmaya başlamadan önce sterilite testleri yapılmıştır. Bu amaçla hücreler, *in vitro* koşullarda sıklıkla rastlanan mikoplazma ve inklüzyon cisimciklerinin varlığı açısından test edilmiştir. Sterilite sonuçlarına göre, her iki hücre hattı da inklüzyon cisimciği ve mikoplazma açısından negatif bulunmuştur.

4.2. HT-29 ve Caco-2 Hücrelerinin Üreme Eğrisi ve Morfolojisi

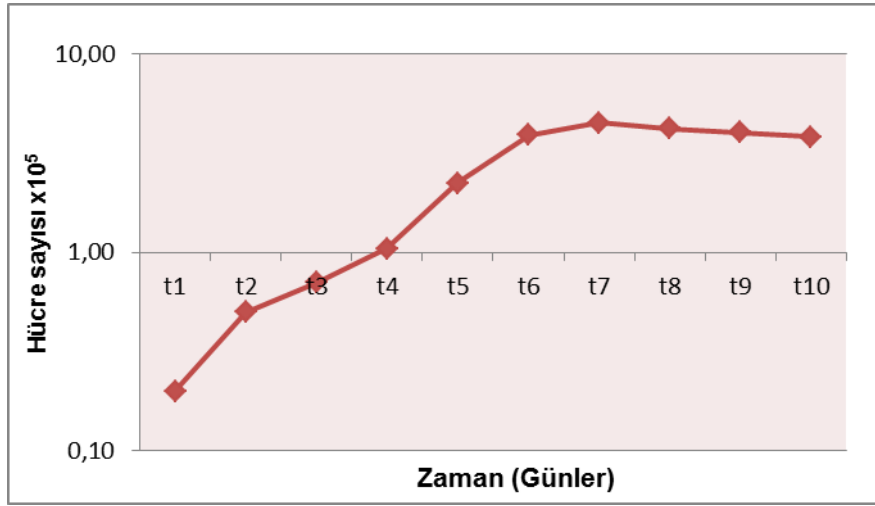
Hücre üreme eğrileri HT-29 (Şekil 4.1) ve Caco-2 (Şekil 4.2) hücrelerinin 10 gün boyunca sayılması sonucunda çıkartılmıştır. HT-29 hücreleri için, hücre sayısında t=4'de başlayan artış, t=5 ve t=6'da artmaya devam ederek t=7'de en yüksek hücre sayısına ulaşmıştır. Bu sonuçlara göre çizilen logaritma grafiği ile elde edilen üreme eğrisine göre HT-29 hücrelerinin ikilenme zamanı 25 saat olarak hesaplanmıştır. Caco-2 hücreleri için hücre sayısı artışı en fazla t=5 ve t=6 arasında, en yüksek hücre sayısı ise t=8'de gözlenmiştir. Çizilen logaritma grafiği ile elde edilen üreme eğrisine göre Caco-2 hücrelerinin ikilenme zamanı 30 saat olarak hesaplanmıştır.

Hiperisinin ışıkla aktivasyonundan sonra HT-29 (Şekil 4.3) ve Caco-2 (Şekil 4.4) hücrelerinin morfolojileri boyanmadan inverted mikroskopta incelenmiştir. HT-29 hücreleri epitel karakterde, yuvarlak şekilli ve tek tabaka halinde üreyen hücrelerdir. Caco-2 hücreleri de epitel karakterde, farklı şekillerde olabilen, daha büyük, adacıklar halinde, tek tabaka olarak ve süspanse üreyen hücrelerdir. Bu incelemelere göre, kontrol ve DMSO grubuna ait hücrelerde morfolojik bir farklılık görülmemiştir.

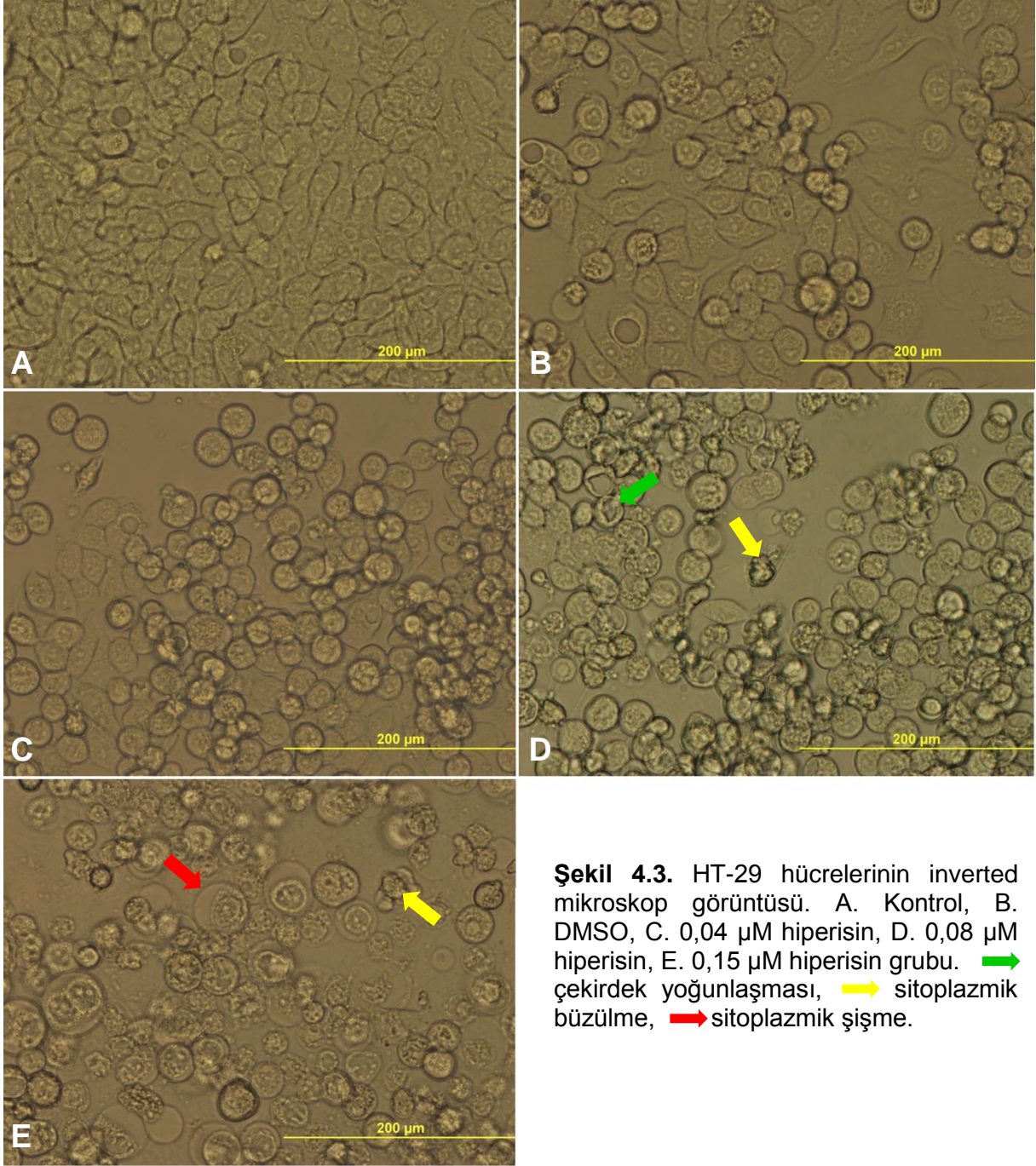
Hiperisinin 4 J/cm^2 ışıkla aktivasyonundan sonra hem HT-29 hem de Caco-2 hücrelerinde $0,04 \text{ } \mu\text{M}$ ve $0,08 \text{ } \mu\text{M}$ hiperisin uygulama gruplarında sitoplazmik büzülme ve çekirdek yoğunlaşması; $0,15 \text{ } \mu\text{M}$ hiperisin uygulama grubunda ise hücresel şişme ve liziz gözlenmiştir.



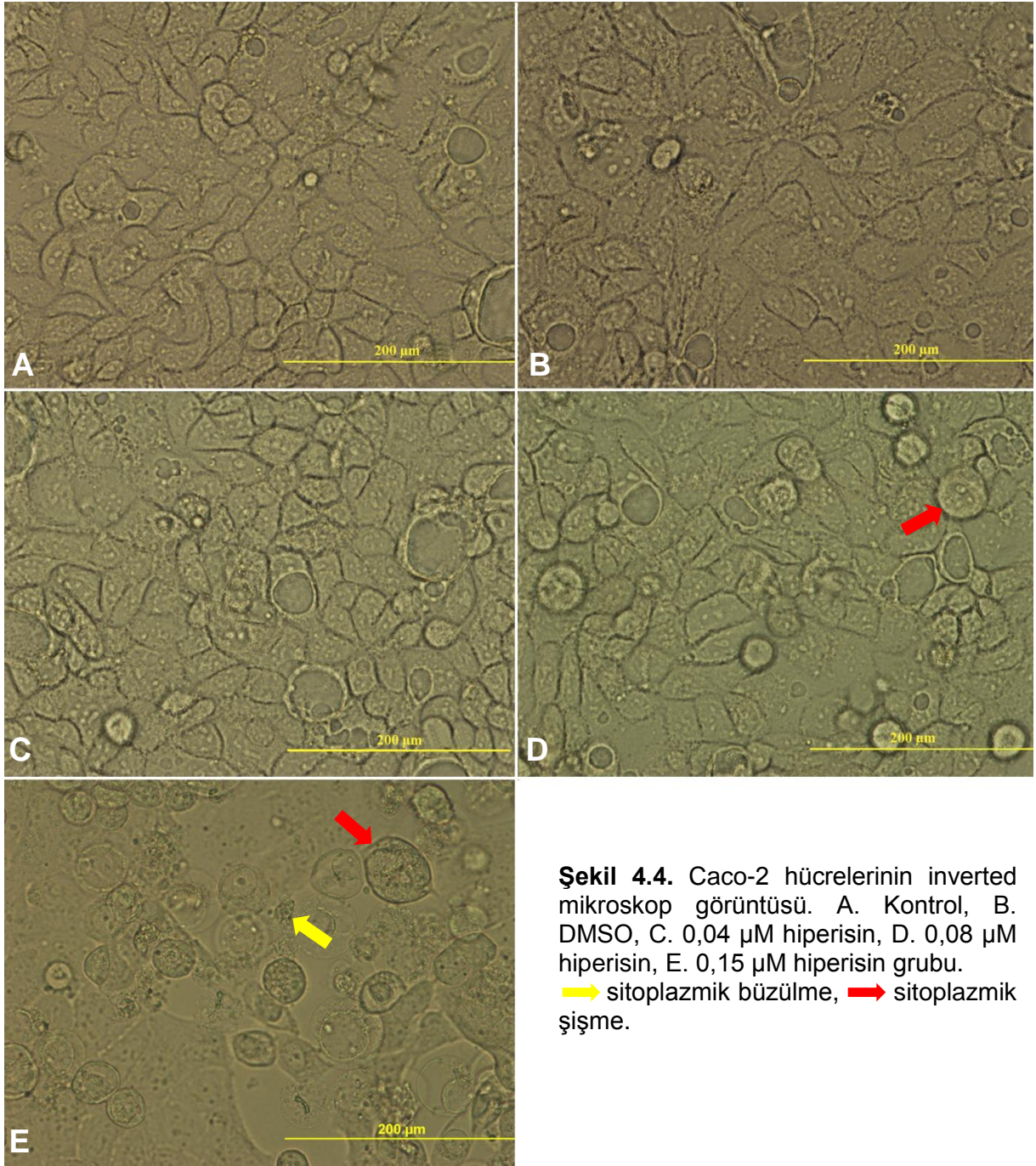
Şekil 4.1. HT-29 hücrelerine ait üreme eğrisi.



Şekil 4.2. Caco-2 hücrelerine ait üreme eğrisi.



Şekil 4.3. HT-29 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. DMSO, C. 0,04 μ M hiperisin, D. 0,08 μ M hiperisin, E. 0,15 μ M hiperisin grubu. **→** çekirdek yoğunlaşması, **→** sitoplazmik büzülme, **→** sitoplazmik şişme.



Şekil 4.4. Caco-2 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. DMSO, C. 0,04 µM hiperisin, D. 0,08 µM hiperisin, E. 0,15 µM hiperisin grubu. **→** sitoplazmik büzülme, **→** sitoplazmik şişme.

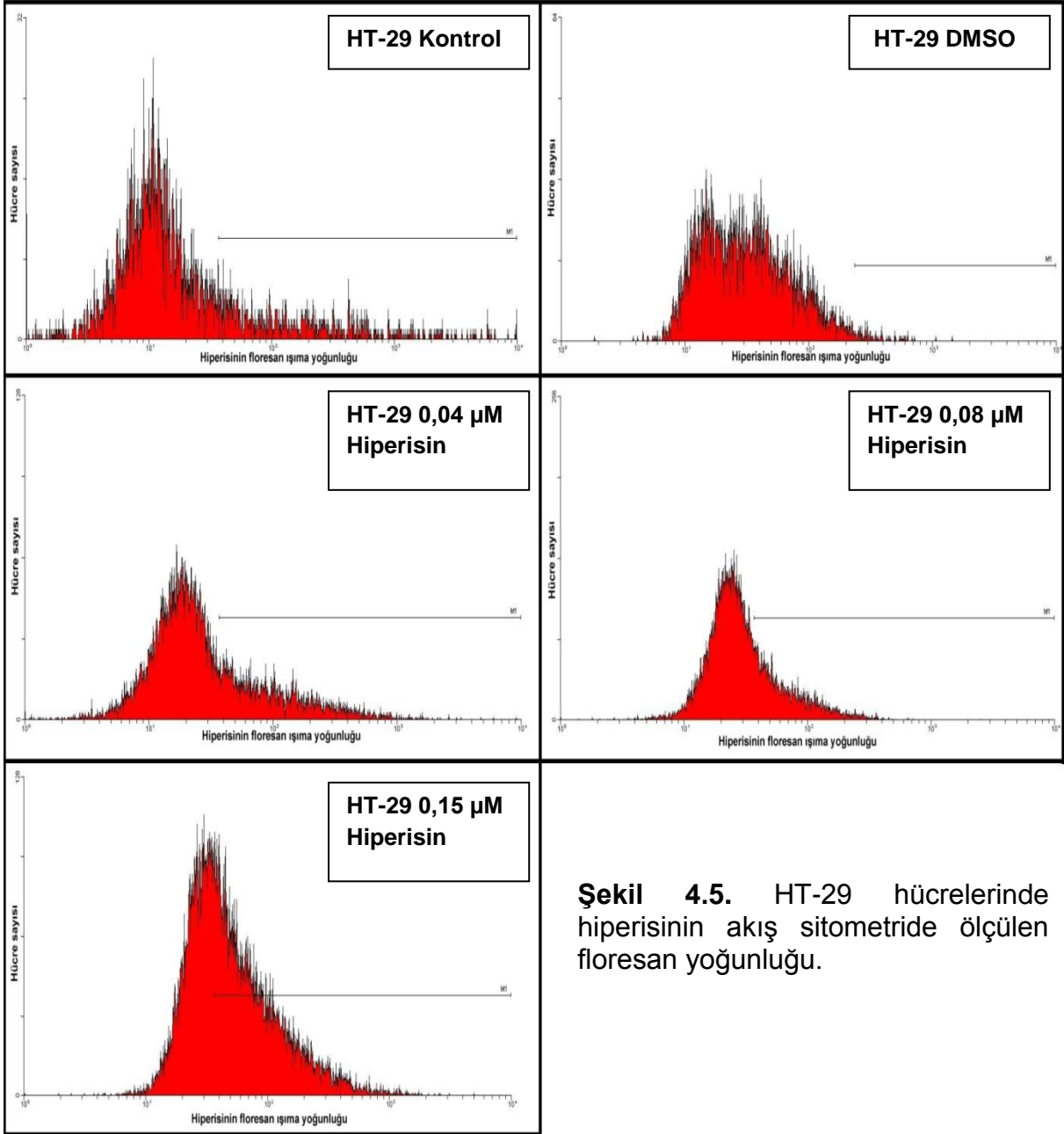
4.3. Hiperisinin Hücre İçine Alım Sonuçları

HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde akış sitometride yapılan ölçümler Çizelge 4.1'de verilmiştir. Her iki hücrede hiperisin aktivasyonundan sonra, ortalama kırmızı floresan ışımının ve kontrol grubuyla karşılaştırılarak hesaplanan relatif floresan ışımının hiperisinin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak arttığı görülmüştür. HT-29 hücrelerinde floresan yoğunluğu katlanarak artarken, Caco-2 hücrelerinde artış daha düşük oranlarda olmuştur.

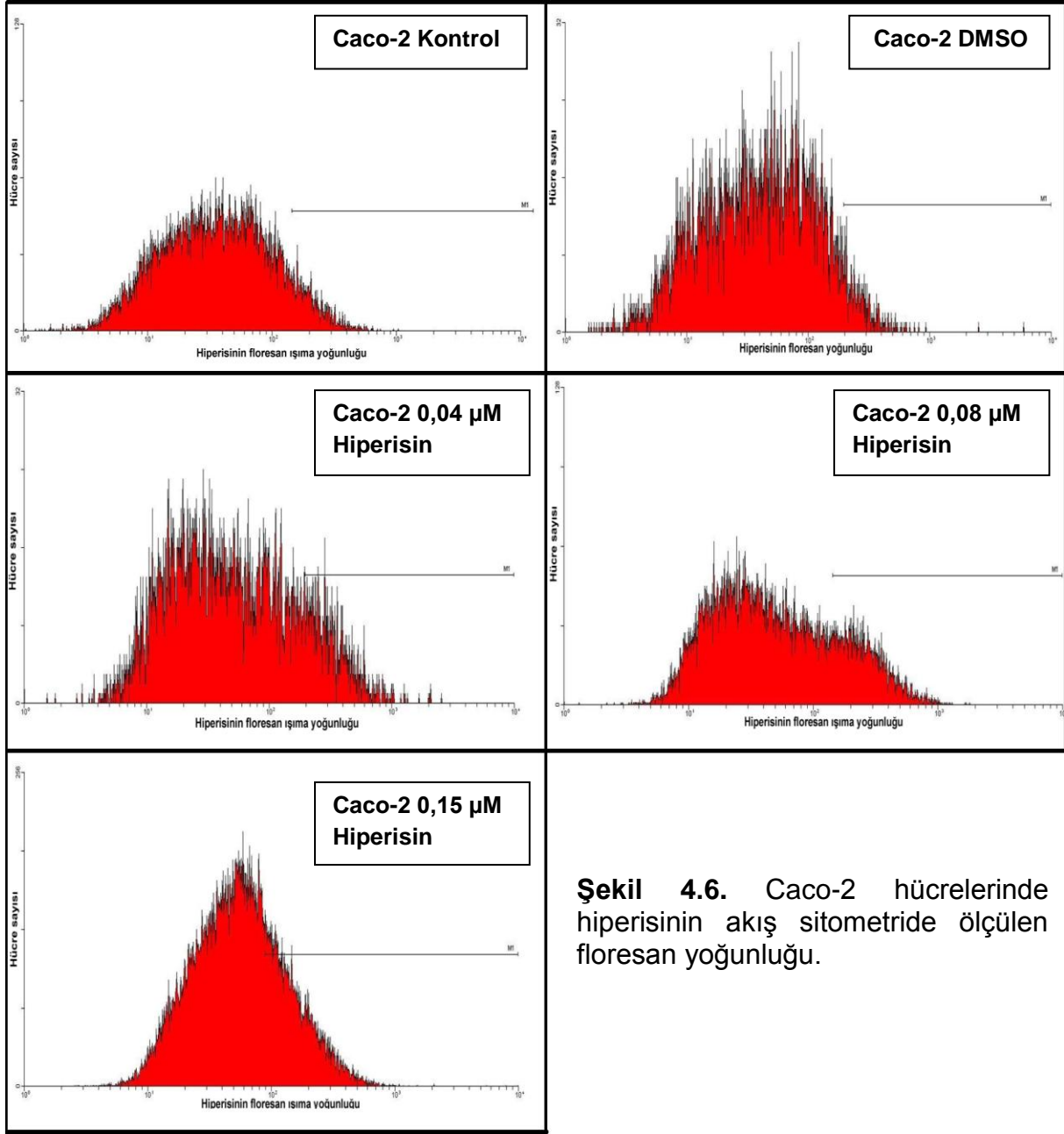
Hücre başına düşen floresan yoğunluğunu gösteren histogramlar, HT-29 hücreleri için Şekil 4.5'te, Caco-2 hücreleri için ise Şekil 4.6'da verilmiştir. Hiperisini hücre içine alan hücreler, kırmızı floresan ışımaya vermektedir.

Çizelge 4.1. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında ortalama floresan yoğunluğu ve relatif floresan yoğunluğu.

	Ortalama floresan yoğunluğu (MFI)	Relatif floresan yoğunluğu (RFI)
HT-29		
Kontrol	2,89	1,00
DMSO	2,97	1,03
0,04 µM hiperisin	4,11	1,42
0,08 µM hiperisin	8,81	3,05
0,15 µM hiperisin	18,1	6,26
Caco-2		
Kontrol	4,10	1,00
DMSO	4,72	1,15
0,04 µM hiperisin	16,10	3,93
0,08 µM hiperisin	18,20	4,44
0,15 µM hiperisin	23,20	5,66



Şekil 4.5. HT-29 hücrelerinde hiperisinin akış sitometride ölçülen floresan yoğunluğu.



Şekil 4.6. Caco-2 hücrelerinde hiperisinin akış sitometride ölçülen floresan yoğunluğu.

4.4. Hücre Sayımı, Yüzen ve Tutunan Hücre Yüzdesi, Canlılık Analizi

HT-29 hücreleri hiperisinin ışıkla aktivasyonundan 16 ve 24 saat sonra hemasitometrede sayılmıştır. Yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdelerine ait veriler Çizelge 4.2'de, grafikler ise Şekil 4.7'de verilmiştir. Sonuçlar, hiperisinin üç konsantrasyonu kontrol grubuyla karşılaştırılarak, ayrıca tüm gruplar iki inkübasyon süresi açısından birbiriyle karşılaştırılarak verilmiştir. Kontrol grubu ile DMSO grubu arasında farklılık bulunmamıştır. Sonuçlara göre, 0,15 µM hiperisin uygulanan ancak ışıkla aktive edilmeyen ışık kontrol grubu (karanlık) ile kontrol ve DMSO kontrol grupları arasında bir farklılık olmadığı görülmüştür. Yüzen hücre yüzdelerindeki artış, aktivasyondan 16 saat sonra sadece 0,08 µM ve 0,15 µM hiperisin grubunda ($P=0,0001$), 24 saat sonra ise tüm hiperisin uygulama gruplarında kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($P=0,0001$). Hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra 0,04 µM ($P=0,002$), 0,08 µM ve 0,15 µM ($P=0,0001$) hiperisin gruplarında canlılık yüzdesi istatistiksel olarak kontrol grubuna göre önemli derecede azalmıştır. Aktivasyondan 24 saat sonra 0,04 µM ($P=0,0002$) 0,08 µM ve 0,15 µM ($P=0,0001$) hiperisin gruplarına ait canlılık yüzdeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşmüştür. Ölü hücre yüzdeleri hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan hem 16 saat hem de 24 saat sonra kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli derecede artmıştır ($P=0,0001$).

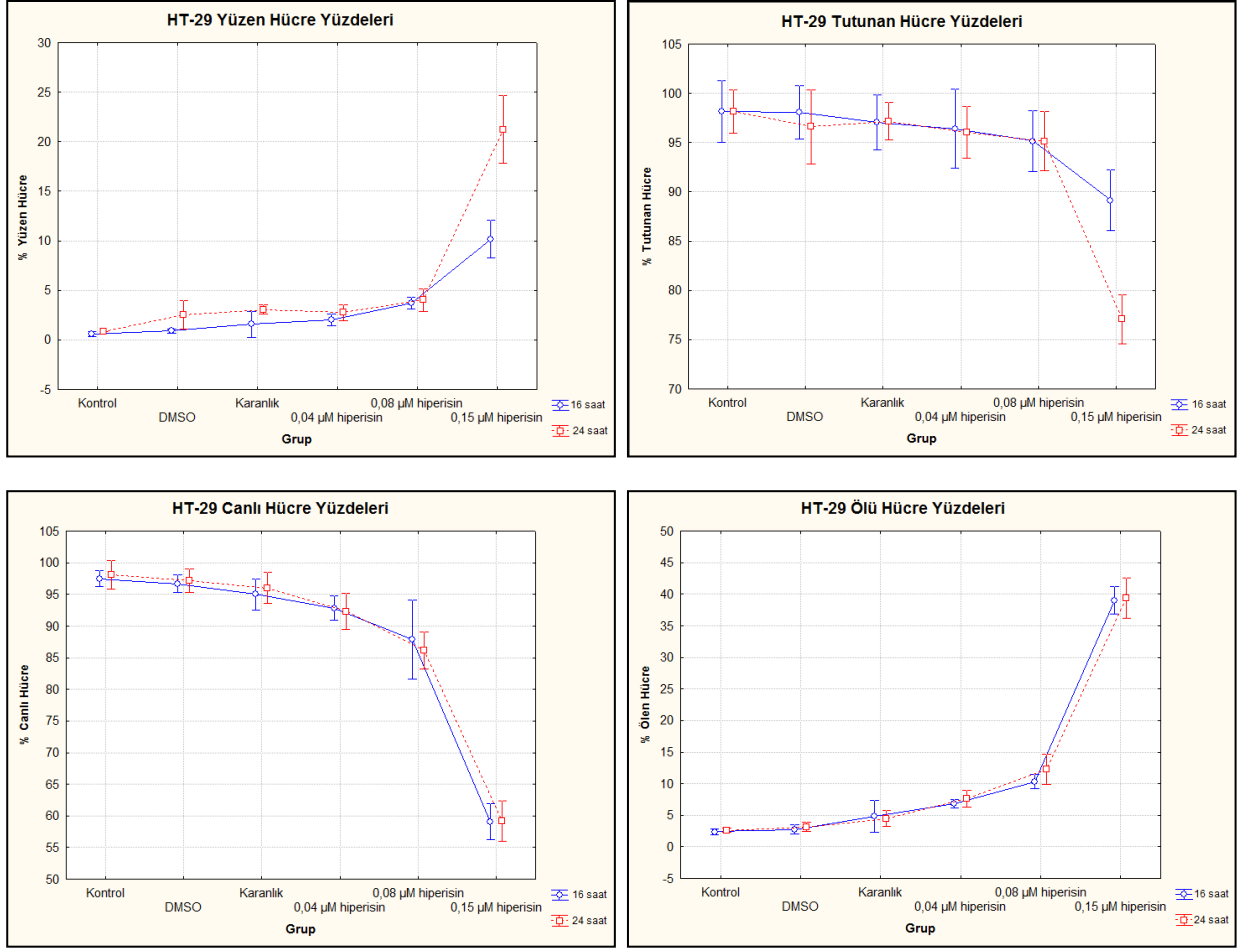
Çizelge 4.2. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdeleri.

	Gruplar					
	Kontrol	DMSO	Işıma Kontrol (Karanlık)	0,04 µM hiperisin	0,08 µM hiperisin	0,15 µM hiperisin
16 s						
Yüzen hücre	0,60±0,05	0,91±0,05	1,58±0,30	2,04±0,14	3,74±0,15 ^{a,b}	10,17±0,44 ^{a,b,c}
Tutunan hücre	99,40±0,72	99,09±1,20	98,42±0,65	97,96±0,94	92,26±0,72	89,83±0,72 ^{a,b,c}
Canlı hücre	97,48±0,29	96,65±0,32	95,01±0,57	92,85±0,44 ^a	87,87±1,45 ^{a,b}	60,11±0,67 ^{a,b,c}
Ölü hücre	2,52±0,10	3,35±0,16	4,99±0,83	7,15±0,26 ^a	12,13±0,34 ^{a,b}	39,89±0,51 ^{a,b,c}
24 s						
Yüzen hücre	0,86±0,001	2,54±0,33	3,08±0,11	2,77±0,19 ^a	4,03±0,27 ^a	21,25±0,80 ^{a,b,c}
Tutunan hücre	99,14±0,51	97,46±0,88	96,92±0,75	97,23±0,61	95,7±0,70	78,75±0,58 ^{a,b,c}
Canlı hücre	98,07±0,52	97,18±0,43	96,01±0,57	92,32±0,66 ^a	85,11±1,17 ^{a,b}	58,19±0,74 ^{a,b,c}
Ölü hücre	1,93±0,16	2,82±0,10	3,99±0,32	7,68±0,31 ^a	14,89±0,55 ^{a,b}	41,81±0,72 ^{a,b,c}

^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P\leq 0,001$).

^b: 0,04 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P\leq 0,001$).

^c: 0,08 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P\leq 0,001$).



Şekil 4.7. Kontrol ve hiperisin uygulanan HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdeleri.

Her iki inkübasyon süresi için 0,15 µM hiperisin uygulama grubunda, yüzen ve ölü hücre yüzdelerindeki artış kontrolden ve düşük doz hiperisin gruplarından istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P=0,0001$). Ayrıca tutunan hücre ve canlı hücre yüzdelerindeki azalma 0,15 µM hiperisin grubunda, kontrol ve düşük doz hiperisin gruplarından istatistiksel açıdan önemli derecede farklı bulunmuştur.

HT-29 canlı hücre yüzdeleri inkübasyon süreleri açısından karşılaştırıldığında, kontrol ve hiperisin uygulama grupları arasında farklılık yoktur. Ölü hücre yüzdeleri inkübasyon süresi açısından karşılaştırıldığında 0,08 µM hiperisin grubunda istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur ($P=0,05$). Ayrıca, hiperisin aktivasyonundan 16 saat ve 24 saat sonra yüzen ve tutunan hücre yüzdeleri 0,15 µM hiperisin grubunda istatistiksel açıdan birbirinden farklı bulunmuştur ($P=0,0001$).

Caco-2 hücrelerinde hiperisinin ışıkla aktivasyonundan 16 ve 24 saat sonra hemasitometre sayımları ile hesaplanan yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdelerine ait veriler Çizelge 4.3'te, grafikler ise Şekil 4.8'de verilmiştir. Kontrol grubu, DMSO grubu ve ışıma kontrol grubu arasında farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.3. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdeleri.

	Gruplar					
	Kontrol	DMSO	Işıma Kontrol (Karanlık)	0,04 µM hiperisin	0,08 µM hiperisin	0,15 µM hiperisin
16 s						
Yüzen hücre	2,10±0,95	1,75±0,41	2,70±0,36	8,64±0,86 ^a	18,57±0,87 ^{a,b}	30,28±0,83 ^{a,b,c}
Tutunan hücre	97,90±0,96	98,25±0,41	97,30±0,36	91,36±0,86 ^a	81,43±0,87 ^{a,b}	69,72±0,83 ^{a,b,c}
Canlı hücre	89,90±2,40	92,01±2,30	89,97±0,61	76,12±2,54 ^a	62,24±1,53 ^{a,b}	44,88±1,26 ^{a,b,c}
Ölü hücre	10,10±2,40	7,99±2,3	10,07±0,64	23,88±2,54 ^a	37,76±1,53 ^{a,b}	55,12±1,26 ^{a,b,c}
24 s						
Yüzen hücre	3,08±1,5	3,22±1,15	3,00±0,58	3,78±1,21	5,62±0,56	30,09±1,52 ^{a,b,c}
Tutunan hücre	97,13±1,39	96,38±1,45	97,00±0,58	96,22±1,21	94,38±0,56	69,91±1,52 ^{a,b,c}
Canlı hücre	92,69±2,30	92,58±2,07	91,67±1,86	90,88±1,81	89,48±1,69	66,75±1,46 ^{a,b,c}
Ölü hücre	7,31±2,30	7,42±2,07	8,33±1,86	9,12±1,81	10,52±1,69	33,33±1,45 ^{a,b,c}

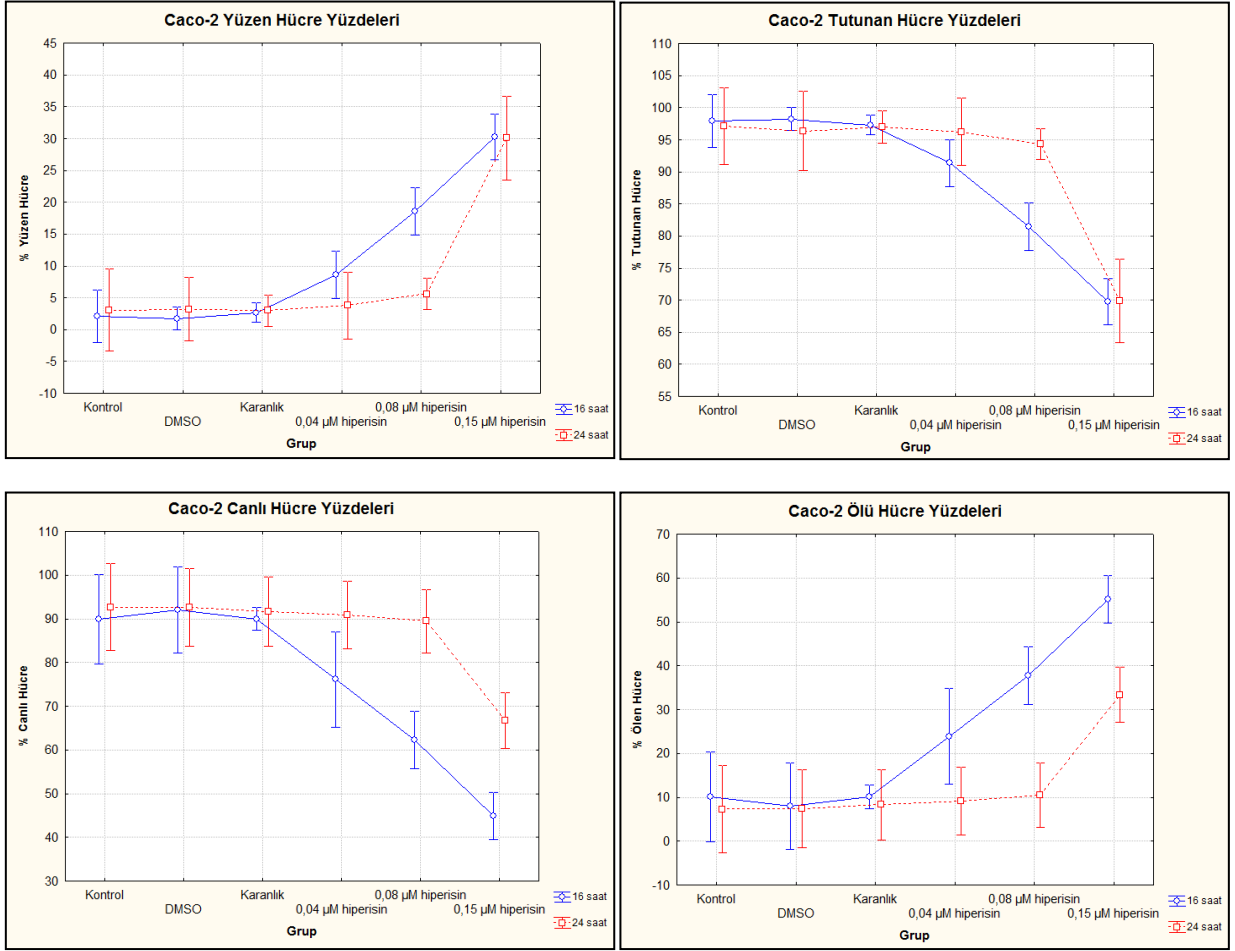
^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P \leq 0,001$).

^b: 0,04 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P \leq 0,001$).

^c: 0,08 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P \leq 0,001$).

Hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra yüzen ve ölü hücre yüzdesindeki artış ile tutunan ve canlı hücre yüzdesindeki azalma 0,04 µM ($P=0,004$), 0,08 µM ve 0,15 µM ($P=0,0001$) hiperisin gruplarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemlidir. İki inkübasyon süresi için de 0,15 µM hiperisin grubunda yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdeleri, iki düşük doz hiperisin grubundan istatistiksel açıdan farklı bulunmuştur ($P=0,0001$). Aktivasyondan 16 saat sonra, 0,08 µM hiperisin grubunda yüzen ve ölü hücre yüzdesi artışı ile tutunan ve canlı hücre yüzdesindeki azalma 0,04 µM hiperisin grubundan anlamlı derecede farklıdır ($P=0,0001$).

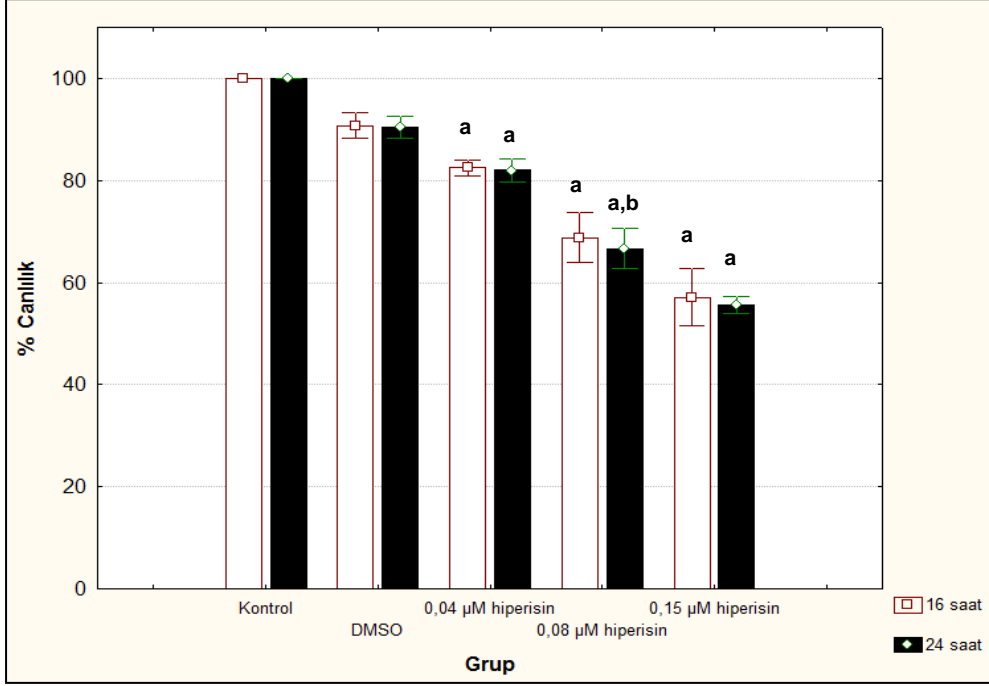
Yüzen hücre ve tutunan hücre yüzdeleri inkübasyon süreleri açısından karşılaştırıldığında sadece 0,08 µM hiperisin grubundaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P=0,0001$). Caco-2 hücrelerinde hiperisin uygulama gruplarındaki canlı hücre ve ölü hücre yüzdeleri, inkübasyon süreleri açısından karşılaştırıldığında birbirinden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.



Şekil 4.8. Kontrol ve hiperisin uygulanan Caco-2 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra yüzen, tutunan, canlı ve ölü hücre yüzdeleri.

4.5. Sitotoksosite Sonuçları

MTT testi sonuçlarına göre, HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde kontrol grubu ile DMSO grubu arasında hücre canlılığı yüzdeleri açısından farklılık bulunmamıştır. HT-29 hücrelerinde 4 J/cm^2 ışığa ile hiperisin aktivasyonundan sonra hiperisin konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücre canlılığındaki azalma Şekil 4.9'da görülmektedir. En yüksek saat konsantrasyon olan $0,15 \text{ µM}$ hiperisin grubunda sitotoksosite en yüksek bulunmuştur. Hücre canlılığındaki azalma aktivasyondan 16 saat sonra $0,04 \text{ µM}$ ($P=0,01$), $0,08 \text{ µM}$ ve $0,15 \text{ µM}$ ($P=0,0002$) hiperisin gruplarında kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Aktivasyondan 24 saat sonra $0,04 \text{ µM}$ ($P=0,007$), $0,08 \text{ µM}$ ve $0,15 \text{ µM}$ ($P=0,0002$) hiperisin gruplarında sitotoksosite kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır; ayrıca $0,08 \text{ µM}$ hiperisin grubundaki hücre canlılığı $0,04 \text{ µM}$ hiperisin grubundan farklı ($P=0,04$) bulunmuştur.

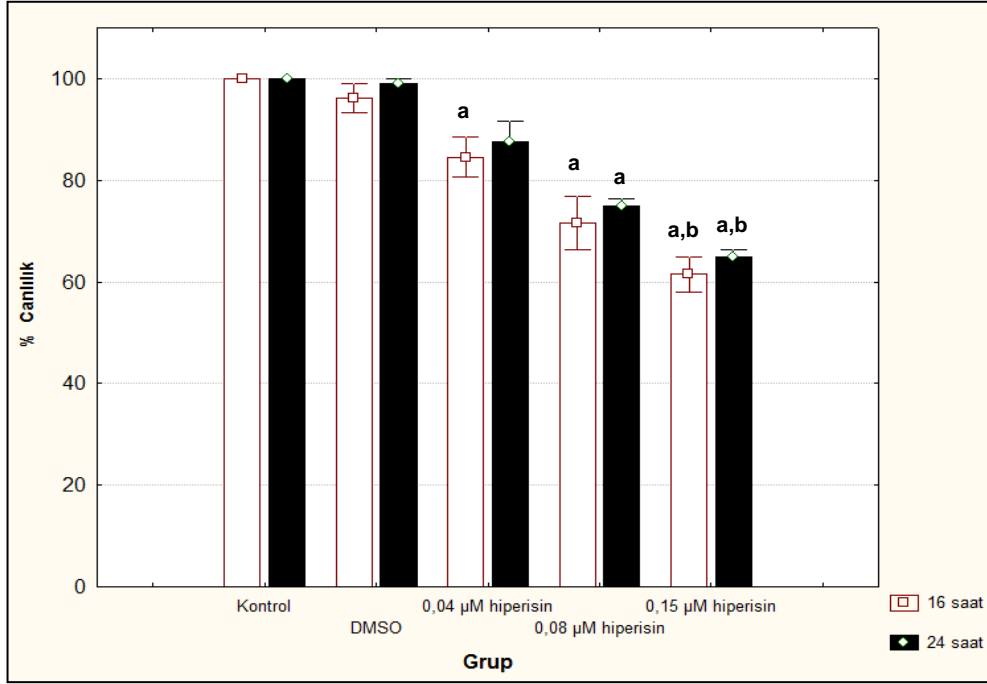


^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P \leq 0,05$).
^b: 0,04 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P \leq 0,05$).

Şekil 4.9. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarına ait canlı hücre yüzdeleri.

HT-29 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarındaki canlılık yüzdeleri inkübasyon süreleri açısından karşılaştırıldığında sitotoksosite, aktivasyondan 24 saat sonra artmıştır, ancak istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Caco-2 hücrelerinde 4 J/cm^2 ışımadan 16 ve 24 saat sonra hiperisin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak sitotoksosite artmış, Şekil 4.10'da görüldüğü gibi hücre canlılık yüzdesi azalmıştır. Hücre canlılığı yüzdesindeki azalma 0,04 µM ($P=0,02$), 0,08 µM ve 0,15 µM ($P=0,0002$) hiperisin gruplarında aktivasyondan 16 saat sonra kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemlidir. Aktivasyondan 24 saat sonra ise 0,08 ve 0,15 µM hiperisin gruplarında artan sitotoksosite kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($P=0,0002$).



^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır (P≤0,05).

^b: 0,04 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır (P≤0,05).

Şekil 4.10. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarına ait canlı hücre yüzdeleri.

Aktivasyondan 16 ve 24 saat sonra Caco-2 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarındaki canlılık yüzdeleri karşılaştırıldığında sitotoksosite aktivasyondan 24 saat sonra azalmıştır, ancak istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.4'te HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde hiperisin uygulamasıyla oluşan sitotoksosite derecelendirme sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre, kontrol ve DMSO gruplarında hücre canlılığı % 90'ın üstünde bulunmuştur. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde, her iki inkübasyon süresi için 0,04 ve 0,08 µM hiperisin uygulamasıyla hücre canlılığı % 60-90 arasında olduğundan az toksik olarak değerlendirilmiştir. 0,15 µM hiperisin uygulaması HT-29 hücreleri için orta derecede toksik (16 saat % 57, 24 saat % 55,5), Caco-2 hücreleri için bu konsantrasyon her iki inkübasyon süresi için de az toksik (16 saat % 61,5, 24 saat % 65) olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.4. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında sitotoksosite derecelendirilme sonuçları.

Hücre	İnkübasyon süresi	Gruplar				
		Kontrol	DMSO	0,04 µM hiperisin	0,08 µM hiperisin	0,15 µM hiperisin
HT- 29	16 s	Toksik değil	Toksik değil	Az toksik	Az toksik	Orta derecede toksik
	24 s	Toksik değil	Toksik değil	Az toksik	Az toksik	Orta derecede toksik
Caco-2	16 s	Toksik değil	Toksik değil	Az toksik	Az toksik	Az toksik
	24 s	Toksik değil	Toksik değil	Az toksik	Az toksik	Az toksik

4.6. LDH Aktivitesi Ölçüm Sonuçları

HT-29 hücrelerinde, hiperisinin aktivasyonundan önce ve sonra ölçülen LDH aktivitesi ve LDH aktivite artış yüzdesi sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir. Hiperisin aktivasyonundan önce ölçülen LDH aktivitesinde, iki inkübasyon süresi için de gruplar arasında farklılık bulunmamıştır. Ancak, aktivasyondan 16 saat sonra 0,15 µM hiperisin grubunda, 24 saat sonra ise hem 0,08 µM hem de 0,15 µM hiperisin grubunda LDH aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir artış olmuştur ($P=0,0002$). Hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra 0,15 µM hiperisin grubundaki LDH aktivitesi, düşük doz hiperisin grubundan (0,04 µM) istatistiksel olarak farklıdır. LDH aktivitesindeki artış yüzdesi, kontrol grubuna göre 16 saat için 0,08 µM ve 0,15 µM hiperisin grubunda, 24 saat için hiperisinin her üç konsantrasyonu için istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P=0,0002$) (Şekil 4.11). Ayrıca düşük ve yüksek hiperisin uygulama grupları arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemlidir ($P=0,01$).

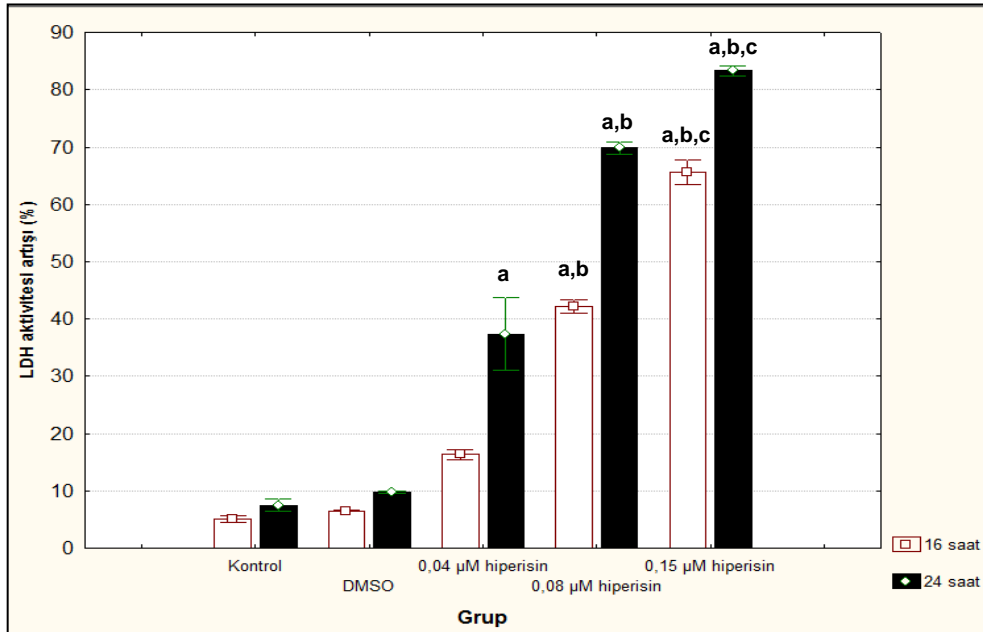
Çizelge 4.5. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan önce ve sonra ölçülen LDH aktivitesi, LDH artışı.

	LDH (U/L) Aktivasyon öncesi	LDH (U/L) Aktivasyon sonrası	LDH artışı (%)
16 s			
Kontrol	147,29±11,80	153,22±5,29	5,03±0,57
DMSO	154,22±9,66	164,27±13,76	6,52±0,12
0,04 µM hiperisin	179,27±15,07	207,31±13,44	16,33±0,88
0,08 µM hiperisin	158,27±8,35	224,54±5,23	42,23±1,17 ^{a,b}
0,15 µM hiperisin	271,64±19,05	447,27±21,65 ^{a,b}	65,60±2,15 ^{a,b,c}
24 s			
Kontrol	119,51±10,21	126,99±12,49	7,48±1,06
DMSO	125,43±9,64	137,64±7,33	9,74±0,19
0,04 µM hiperisin	129,52±12,07	176,22±23,13	37,33±13,01 ^a
0,08 µM hiperisin	152,81±17,12	256,73±13,0 ^a	69,85±1,03 ^{a,b}
0,15 µM hiperisin	159,38±10,11	290,21±27,98 ^{a,b}	83,78±1,03 ^{a,b,c}

^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır (P≤0,001).

^b: 0,04 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır (P≤0,05).

^c: 0,08 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır (P≤0,001).



^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır (P≤0,001).

^b: 0,04 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır (P≤0,05).

^c: 0,08 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır (P≤0,001).

Şekil 4.11. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra LDH aktivitesi artışı (%).

HT-29 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarındaki LDH aktivitesindeki artış yüzdeleri, inkübasyon süreleri açısından tüm hiperisin uygulama gruplarında birbirinden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Tüm gruplarda, aktivasyondan 24 saat sonra LDH artış yüzdesi, aktivasyondan 16 saat sonraki LDH artış yüzdesine göre daha yüksek bulunmuştur.

Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra 0,15 µM hiperisin grubunda LDH aktivitesi, kontrol ve 0,04 µM hiperisin grubundan ($P=0,0002$) istatistiksel açıdan farklı bulunmuştur. LDH aktivitesi artış yüzdesi iki inkübasyon süresi için de, 0,08 µM hiperisin grubunda kontrol ve 0,04 µM hiperisin grubundan ($P=0,0001$) istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır. LDH aktivitesi artış yüzdesi 0,15 µM hiperisin grubunda aktivasyondan 16 saat sonra kontrol, 0,04 µM ($P=0,0001$) ve 0,08 µM hiperisin gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır ($P=0,0005$). 0,15 µM hiperisin grubunda LDH aktivitesi artış yüzdesi, aktivasyondan 24 saat sonra kontrol ve 0,04 µM hiperisin gruplarına göre ($P=0,0001$) istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (Çizelge 4.6, Şekil 4.12).

Çizelge 4.6. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan önce ve sonra ölçülen LDH aktivitesi, LDH artışı.

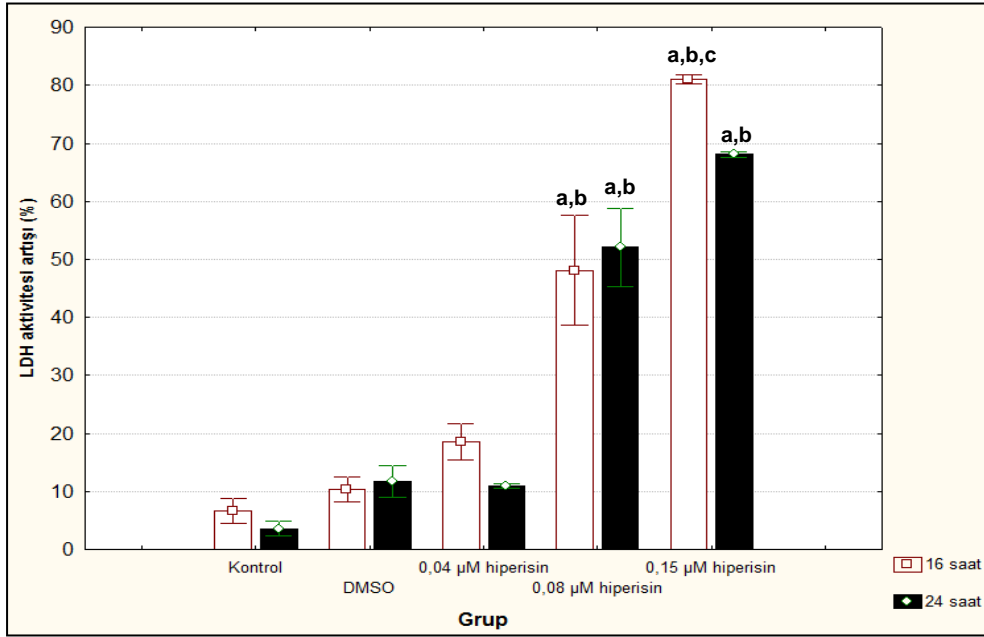
	LDH (U/L) Aktivasyon öncesi	LDH (U/L) Aktivasyon sonrası	LDH artışı (%)
16 s			
Kontrol	112,46±2,08	119,84±0,16	6,63±2,08
DMSO	122,33±1,46	135,00±2,89	10,36±2,20
0,04 µM hiperisin	137,17±18,88	161,66±19,66	18,55±3,14
0,08 µM hiperisin	140,28±17,72	206,51±26,05	48,14±9,56 ^{a,b}
0,15 µM hiperisin	165,74±3,02	300,00±5,77 ^{a,b}	81,01±0,72 ^{a,b,c}
24 s			
Kontrol	149,33±19,18	154,23±18,28	3,60±1,31
DMSO	141,67±7,26	158,67±11,98	11,73±2,67
0,04 µM hiperisin	159,30±31,02	176,76±34,35	10,97±0,38
0,08 µM hiperisin	177,44±8,81	271,00±24,64 ^a	52,07±6,67 ^{a,b}
0,15 µM hiperisin	185,33±12,72	311,44±20,75 ^{a,b}	68,09±0,48 ^{a,b}

^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P\leq 0,05$).

^b: 0,04 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P\leq 0,05$).

^c: 0,08 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P\leq 0,05$).

Aktivasyondan 24 saat sonra LDH aktivitesi, 0,08 μ M hiperisin grubunda kontrolden; 0,15 μ M hiperisin grubunda ise hem kontrolden hem de 0,04 μ M hiperisin grubundan farklıdır. Ayrıca, LDH artış yüzdesi 0,08 ve 0,15 μ M hiperisin grubunda kontrol ve 0,04 μ M hiperisin grubundan da istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (Çizelge 4.6, Şekil 4.12).



^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P \leq 0,001$).

^b: 0,04 μ M hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P \leq 0,001$).

^c: 0,08 μ M hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklıdır ($P \leq 0,001$).

Şekil 4.12. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra LDH aktivitesi artışı (%).

0,08 μ M hiperisin grubunda LDH artış yüzdesi aktivasyondan 24 saat sonra artarken; 0,04 ve 0,15 μ M hiperisin grubunda azalmıştır. Ancak Caco-2 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarındaki LDH aktivitesindeki artış yüzdeleri inkübasyon süreleri açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır.

4.7. Metabolik Aktivasyon Test Sonuçları

HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 ve 24 saat sonra glukoz tüketimi ve laktat üretimi sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre iki inkübasyon süresi için tüm hiperisin gruplarında glukoz tüketimi (Şekil 4.13) ve laktat üretimindeki (Şekil 4.14) azalma istatistiksel olarak kontrol grubundan farklı bulunmuştur ($P=0,0002$). Aktivasyondan 16 saat sonra 0,08 μM ve 0,15 μM hiperisin gruplarındaki glukoz tüketimi 0,04 μM hiperisin grubuna göre önemli derecede azalmıştır ($P=0,0003$; $P=0,0001$). 0,15 μM hiperisin grubunda 16 ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda laktat üretimindeki azalma 0,04 ve 0,08 μM hiperisin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P=0,0002$).

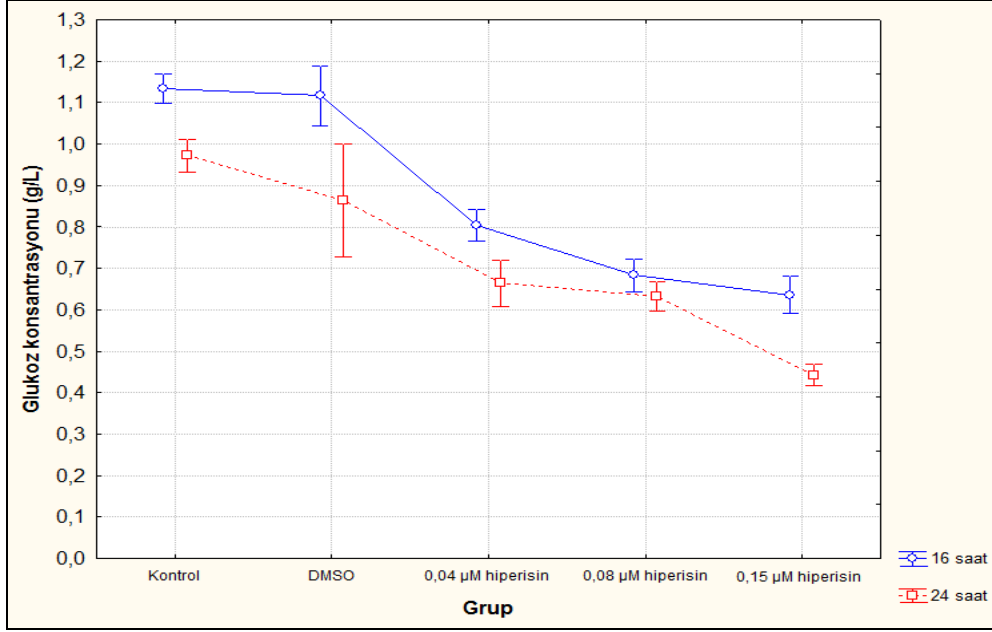
Çizelge 4.7. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra glukoz tüketimi (g/L s) ve laktat üretimi (g/L s).

	Glukoz tüketimi ($\times 10^{-1}$)	Laktat üretimi ($\times 10^{-1}$)
16 s		
Kontrol	1,13 \pm 0,008	0,91 \pm 0,002
DMSO	1,11 \pm 0,005	0,87 \pm 0,002
0,04 μM hiperisin	0,80 \pm 0,034 ^a	0,58 \pm 0,008 ^a
0,08 μM hiperisin	0,68 \pm 0,009 ^{a,b}	0,56 \pm 0,004 ^a
0,15 μM hiperisin	0,63 \pm 0,015 ^{a,b}	0,47 \pm 0,001 ^{a,b,c}
24 s		
Kontrol	0,97 \pm 0,009	0,78 \pm 0,001
DMSO	0,86 \pm 0,005	0,68 \pm 0,01
0,04 μM hiperisin	0,66 \pm 0,013 ^a	0,54 \pm 0,005 ^a
0,08 μM hiperisin	0,63 \pm 0,008 ^a	0,53 \pm 0,001 ^a
0,15 μM hiperisin	0,44 \pm 0,006 ^a	0,36 \pm 0,003 ^{a,b,c}

^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,001$).

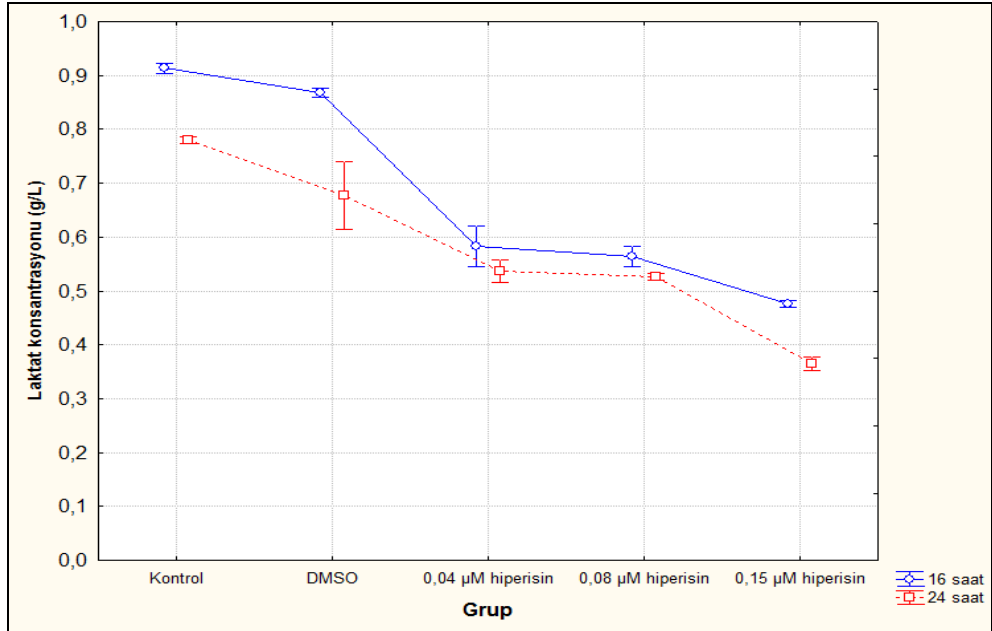
^b: 0,04 μM hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,001$).

^c: 0,08 μM hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,001$).



Şekil 4.13. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra glukoz tüketimi.

İnkübasyon süreleri açısından glukoz tüketimi karşılaştırıldığında 0,04 µM ve 0,15 µM hiperisin gruplarında; laktat üretimi ise tüm gruplarda istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur.



Şekil 4.14. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra laktat üretimi.

Caco-2 hücrelerine ait glukoz tüketimi ve laktat üretimi sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, aktivasyondan 16 ve 24 saat sonra hiperisin uygulama gruplarında glukoz tüketimindeki azalma, kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan

önemli bulunmuştur ($P=0,0002$) (Şekil 4.15). 0,15 μM hiperisin grubunda glukoz tüketimindeki azalma 0,04 μM ve 0,08 μM hiperisin gruplarına göre aktivasyondan 16 saat (sırasıyla $P=0,009$; $P=0,0002$) ve 24 saat ($P=0,0002$) sonra istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Laktat üretimindeki azalma ise, tüm hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 ve 24 saat sonra kontrolden farklı ($P=0,0002$) bulunmuştur. Ayrıca, 0,08 μM ve 0,15 μM hiperisin gruplarında 16 saat ($P=0,0002$) ve 24 saat (sırasıyla $P=0,007$; $P=0,0002$) inkübasyon süresi sonunda laktat üretimindeki azalma, 0,04 μM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur (Şekil 4.16).

Çizelge 4.8. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra glukoz tüketimi (g/L s) ve laktat üretimi (g/L s).

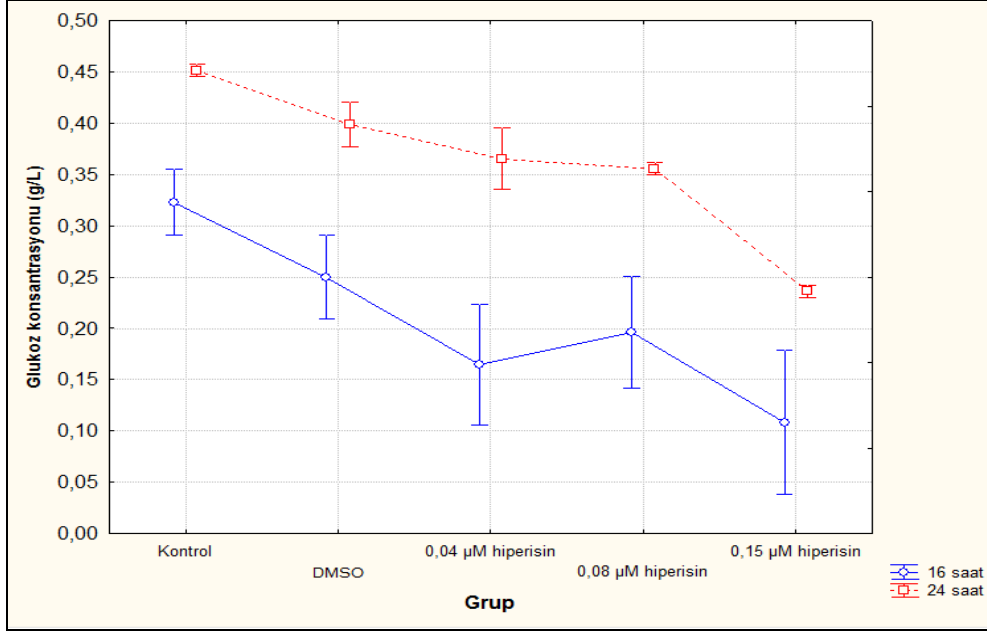
	Glukoz tüketimi ($\times 10^{-1}$)	Laktat üretimi ($\times 10^{-1}$)
16 s		
Kontrol	0,32 \pm 0,007	0,28 \pm 0,001
DMSO	0,27 \pm 0,009	0,24 \pm 0,001
0,04 μM hiperisin	0,16 \pm 0,013 ^a	0,17 \pm 0,001 ^a
0,08 μM hiperisin	0,20 \pm 0,012 ^a	0,19 \pm 0,001 ^{a,b}
0,15 μM hiperisin	0,11 \pm 0,016 ^{a,b,c}	0,13 \pm 0,001 ^{a,b,c}
24 s		
Kontrol	0,45 \pm 0,001	0,38 \pm 0,001
DMSO	0,40 \pm 0,005	0,33 \pm 0,001
0,04 μM hiperisin	0,37 \pm 0,006 ^a	0,31 \pm 0,002 ^a
0,08 μM hiperisin	0,35 \pm 0,00 ^a	0,32 \pm 0,001 ^{a,b}
0,15 μM hiperisin	0,24 \pm 0,001 ^{a,b,c}	0,21 \pm 0,001 ^{a,b,c}

^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,001$).

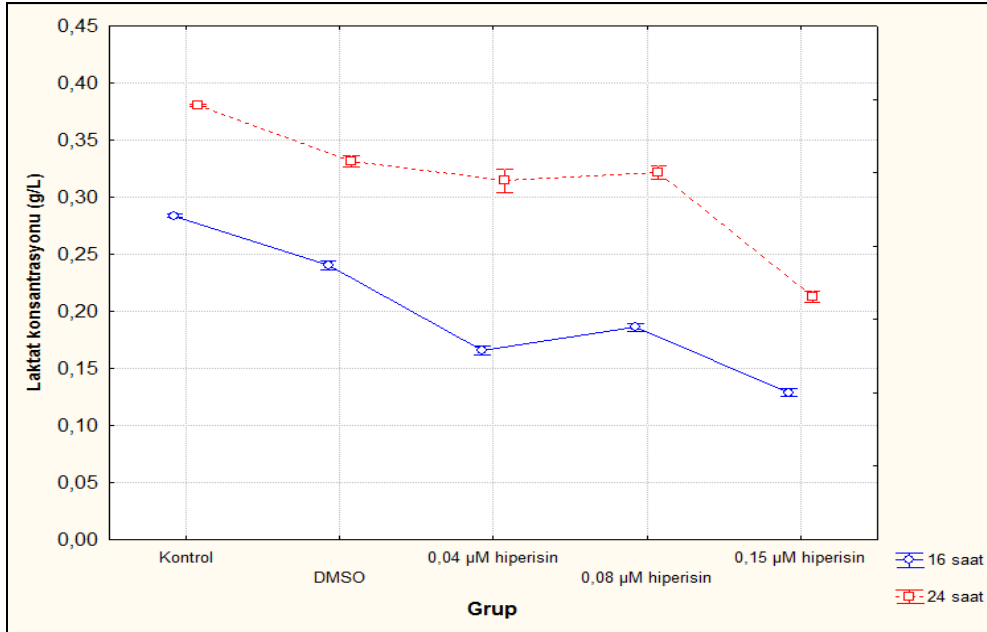
^b: 0,04 μM hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,001$).

^c: 0,08 μM hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,001$).

Caco-2 hücrelerinde tüm gruplarda glukoz tüketimi ve laktat üretimi inkübasyon süresi açısından karşılaştırıldığında farklılıklar, istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.



Şekil 4.15. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve uygulama hiperisin gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra glukoz tüketimi.



Şekil 4.16. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra laktat üretimi.

Çizelge 4.9'da HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde hiperisin ile aktivasyondan 16 ve 24 saat sonra hesaplanan verim faktörleri verilmiştir. Bu değerler incelendiğinde kontrol ve uygulama gruplarında glukoz tüketimi ve laktat üretimi açısından sistemlerin dengede olduğu görülmektedir. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16

saat sonra 0,08 μM hiperisin grubu kontrolden ($P=0,02$); 0,15 μM hiperisin grubu ise 0,08 μM hiperisin grubundan ($P=0,002$) istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. HT-29 hücrelerinde verim faktörleri inkübasyon süresi açısından karşılaştırıldığında, 0,04 μM ($P=0,004$) ve 0,15 μM ($P=0,001$) hiperisin gruplarında istatistiksel açıdan önemli farklılık bulunmuştur. Caco-2 hücrelerinde ise aktivasyondan 16 saat sonra 0,15 μM hiperisin grubunda verim faktörü kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan farklı ($P=0,04$) bulunmuştur. Caco-2 hücrelerine ait verim faktörü sonuçlarında inkübasyon süreleri açısından gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.9. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra verim faktörleri.

	HT-29	Caco-2
16 s		
Kontrol	0,77 \pm 0,005	0,88 \pm 0,02
DMSO	0,79 \pm 0,005	0,96 \pm 0,04
0,04 μM hiperisin	0,78 \pm 0,011	1,02 \pm 0,09
0,08 μM hiperisin	0,82 \pm 0,012 ^a	0,96 \pm 0,06
0,15 μM hiperisin	0,75 \pm 0,010 ^b	1,18 \pm 0,13 ^a
24 s		
Kontrol	0,80 \pm 0,008	0,84 \pm 0,002
DMSO	0,82 \pm 0,0010	0,83 \pm 0,009
0,04 μM hiperisin	0,84 \pm 0,010	0,86 \pm 0,012
0,08 μM hiperisin	0,82 \pm 0,011	0,90 \pm 0,007
0,15 μM hiperisin	0,82 \pm 0,008	0,90 \pm 0,009

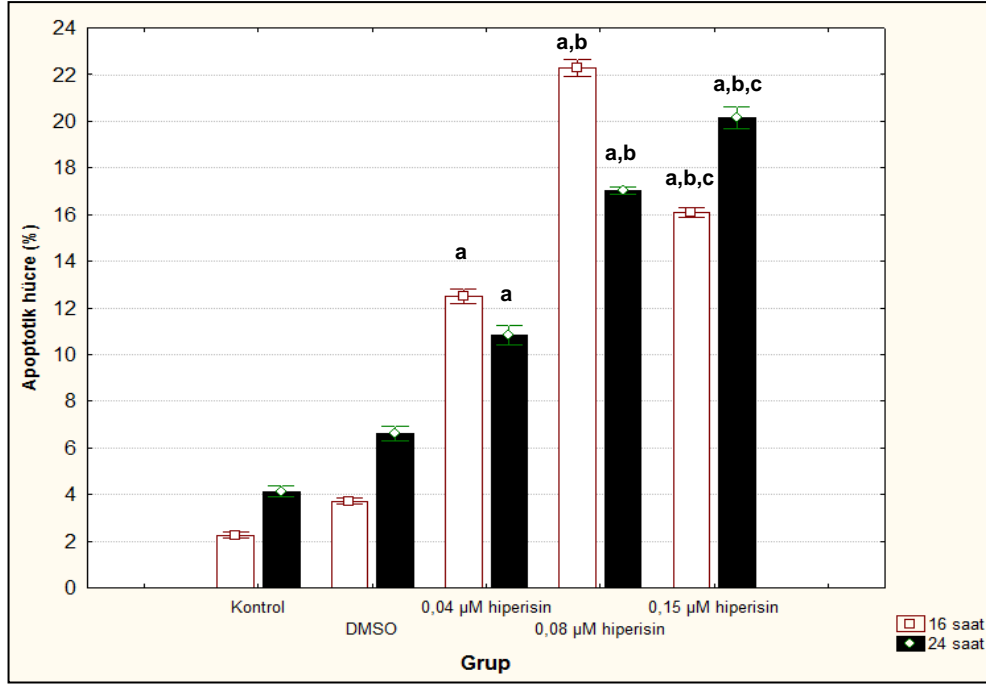
^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,05$).

^b: 0,08 μM hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,05$).

4.8. Apoptotik İndeks sonuçları

Apoptotik indeks sonuçları minimum 300 hücre sayılarak, apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı (%) olarak verilmiştir. HT-29 hücrelerinde hiperisinin aktivasyonundan 16 ve 24 saat sonra tüm hiperisin konsantrasyonlarında apoptotik indeksteki artış ($P=0,0002$) kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (Şekil 4.17). İki inkübasyon süresi için apoptotik indeksteki artış 0,08 μM hiperisin grubunda 0,04 μM hiperisin grubundan; 0,15 μM hiperisin grubunda ise her iki düşük doz grubundan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($P=0,0002$). Her bir grup kendi içinde inkübasyon süresi açısından karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. Apoptotik indeks, aktivasyondan 16 saat sonra 0,08 μM

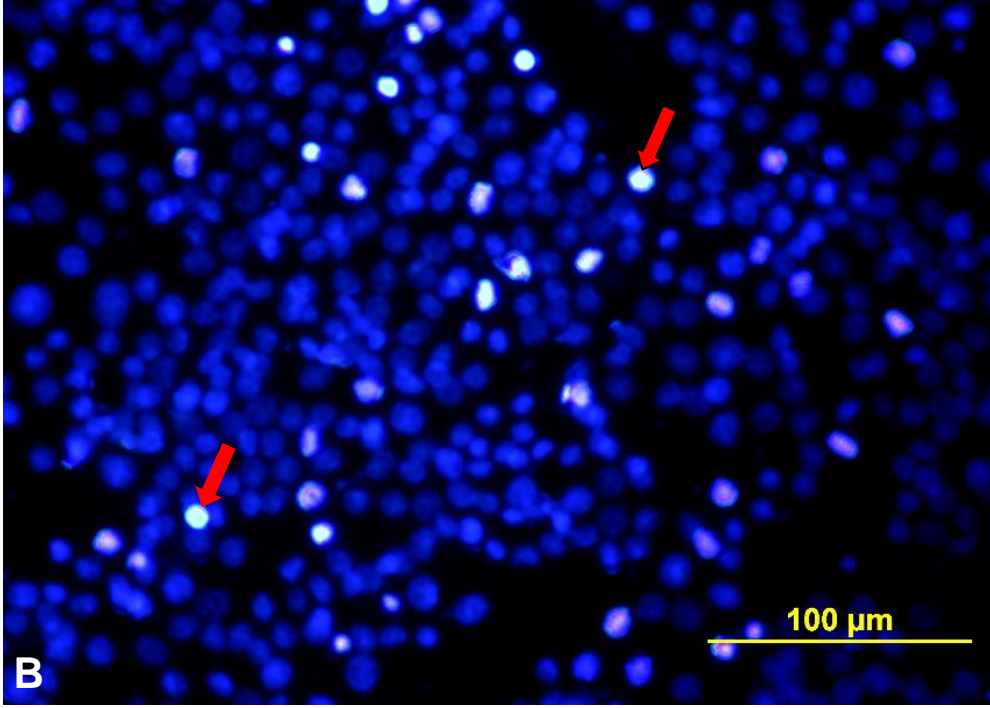
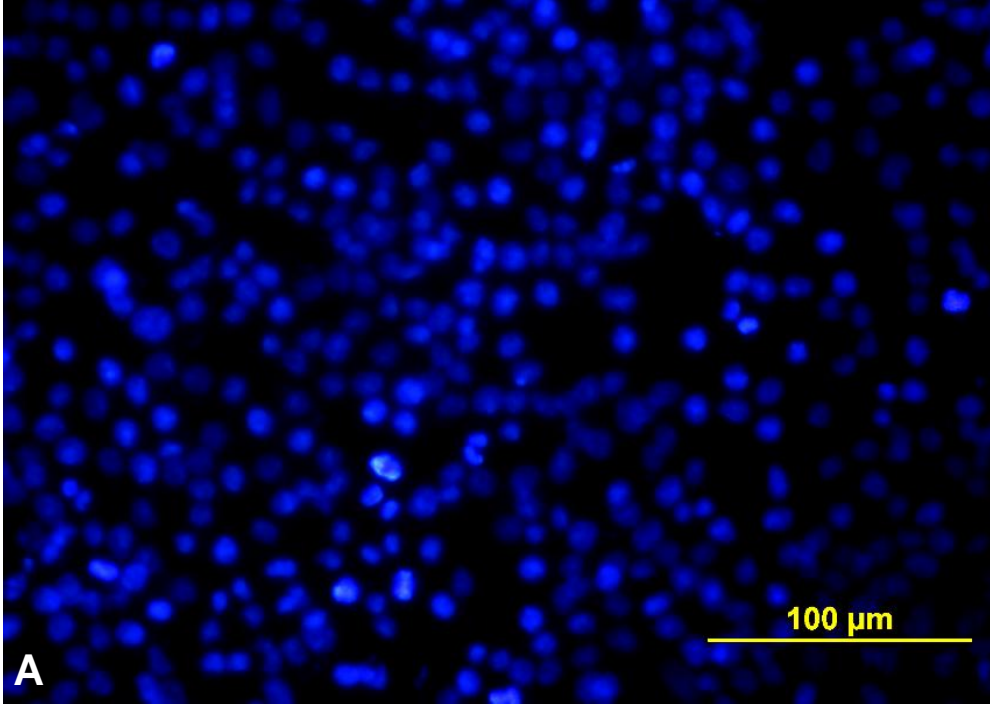
hiperisin grubunda en çok artmıştır. 24 saat sonra apoptotik indeksteki artış 0,15 μ M hiperisin grubunda en fazla olmuştur.



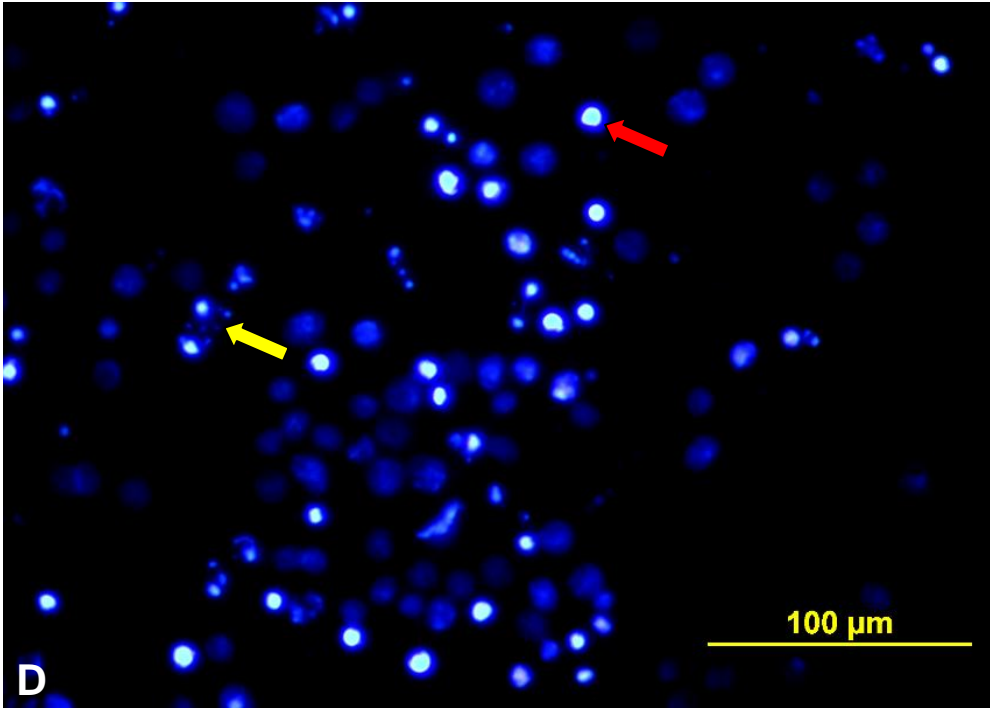
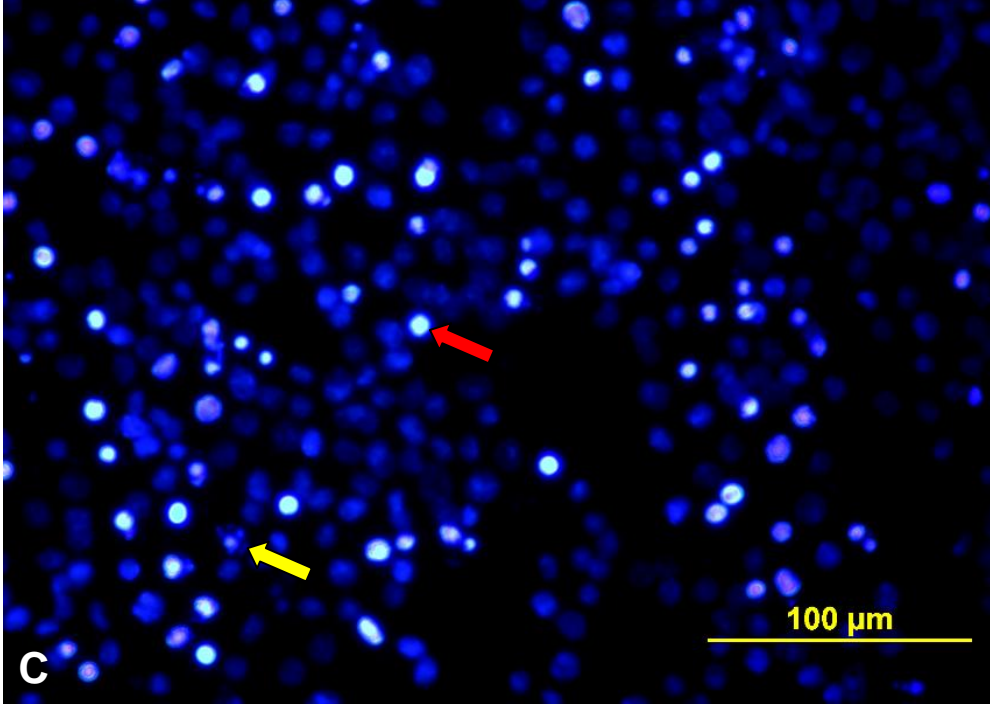
- ^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P \leq 0,001$).
^b: 0,04 μ M hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P \leq 0,001$).
^c: 0,08 μ M hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P \leq 0,001$).

Şekil 4.17. Kontrol ve hiperisin uygulanan HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra apoptotik indeks.

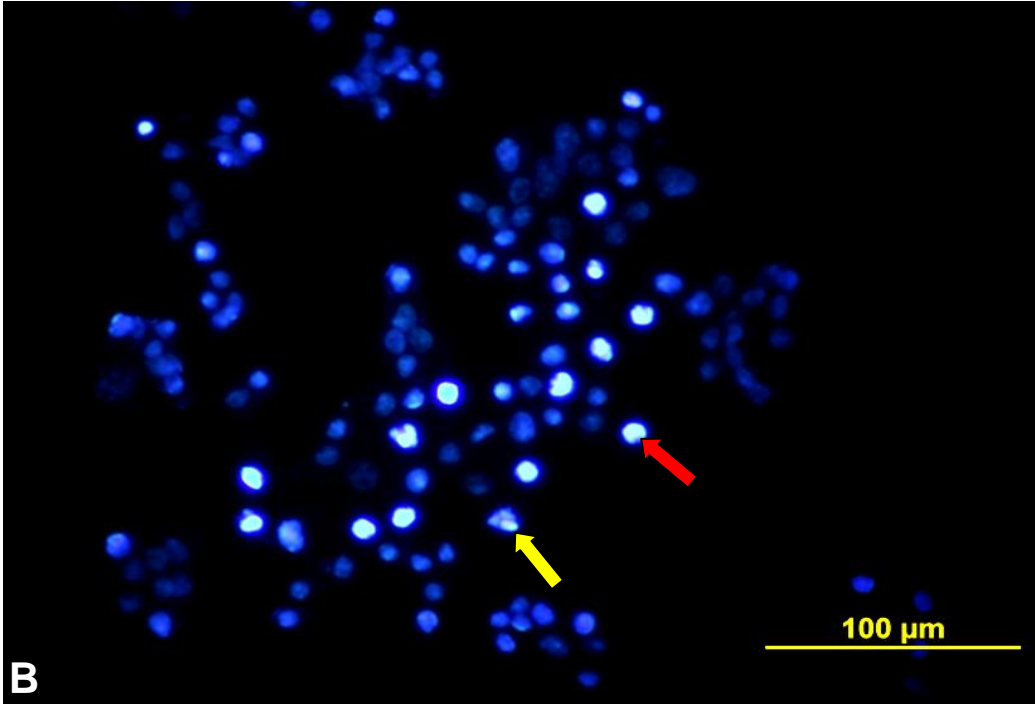
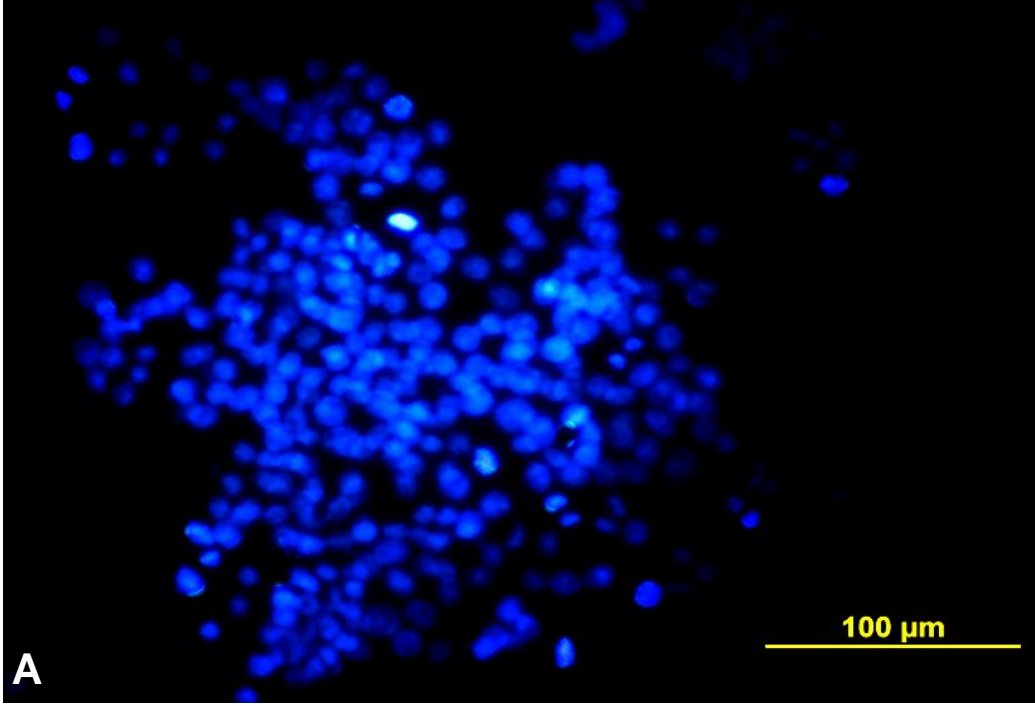
Şekil 4.18'de hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra, Şekil 4.19'da 24 saat sonra HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında DAPI boyaması ile mavi boyanan apoptotik hücreler görülmektedir. Düşük hiperisin konsantrasyonlarında (0,04 μ M ve 0,08 μ M) çekirdek yoğunlaşması ile karakterize olan erken apoptotik hücreler daha fazla, 0,15 μ M hiperisin grubunda ise fragmente olmuş çekirdek ve apoptotik cisimlerde artışın olduğu geç apoptotik hücreler daha fazla görülmüştür.



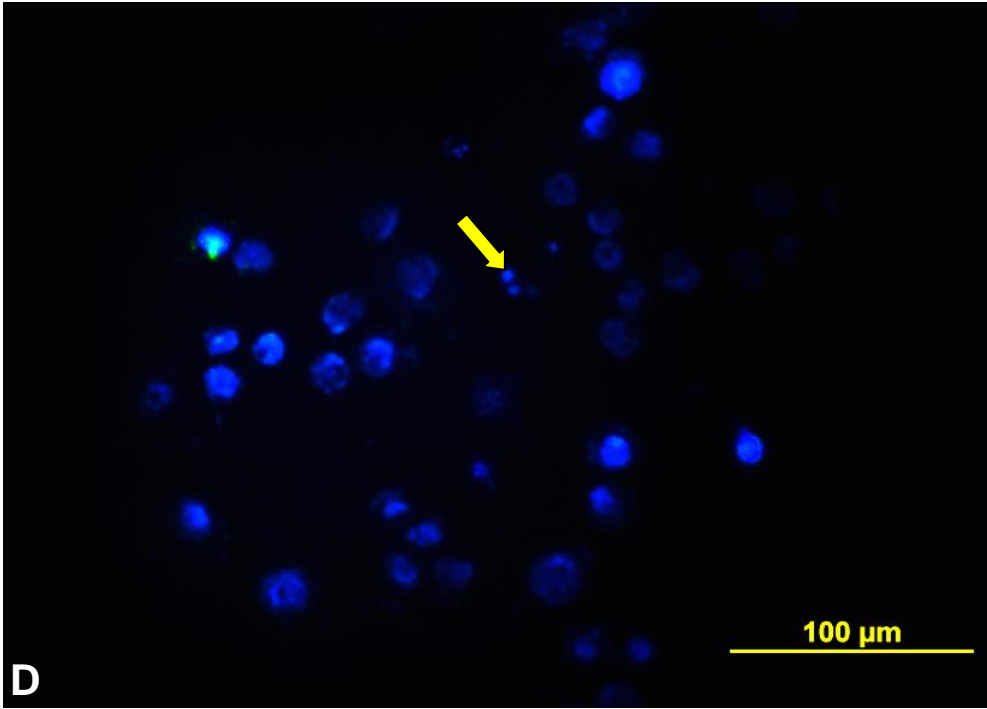
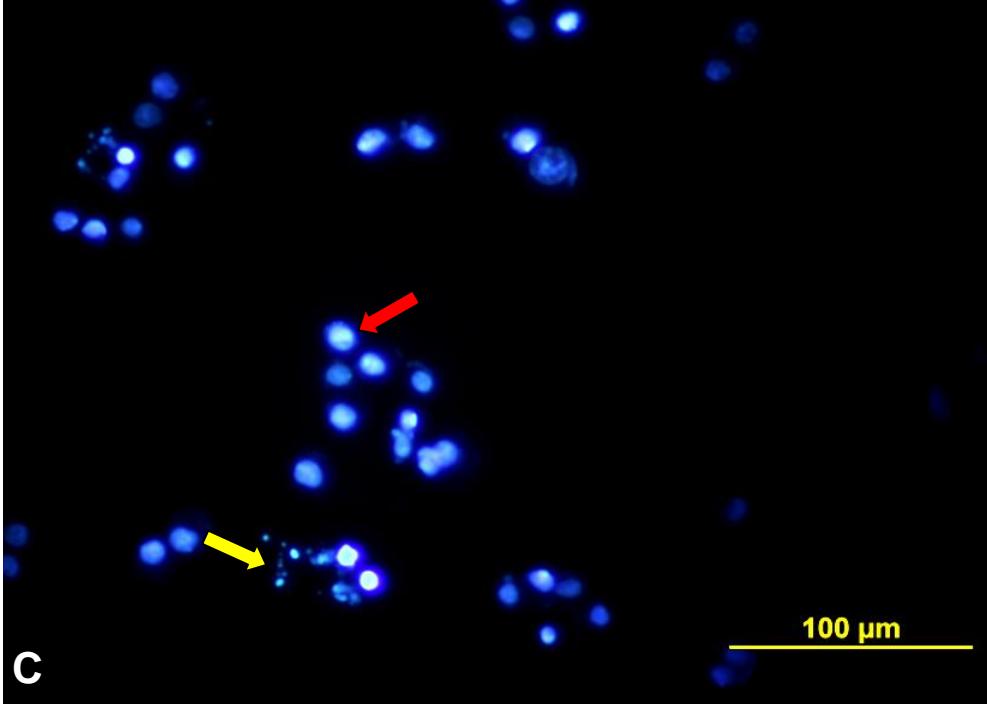
Şekil 4.18. HT-29 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 μ M hiperisin grubu. **→** çekirdek yoğunlaşması.



Şekil 4.18. (*devam ediyor*) HT-29 hücrelerinin hiperisin ativasyonundan 16 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 µM hiperisin, D. 0,15 µM hiperisin grubu. **→** çekirdek yoğunlaşması, **→** çekirdek fragmentasyonu.

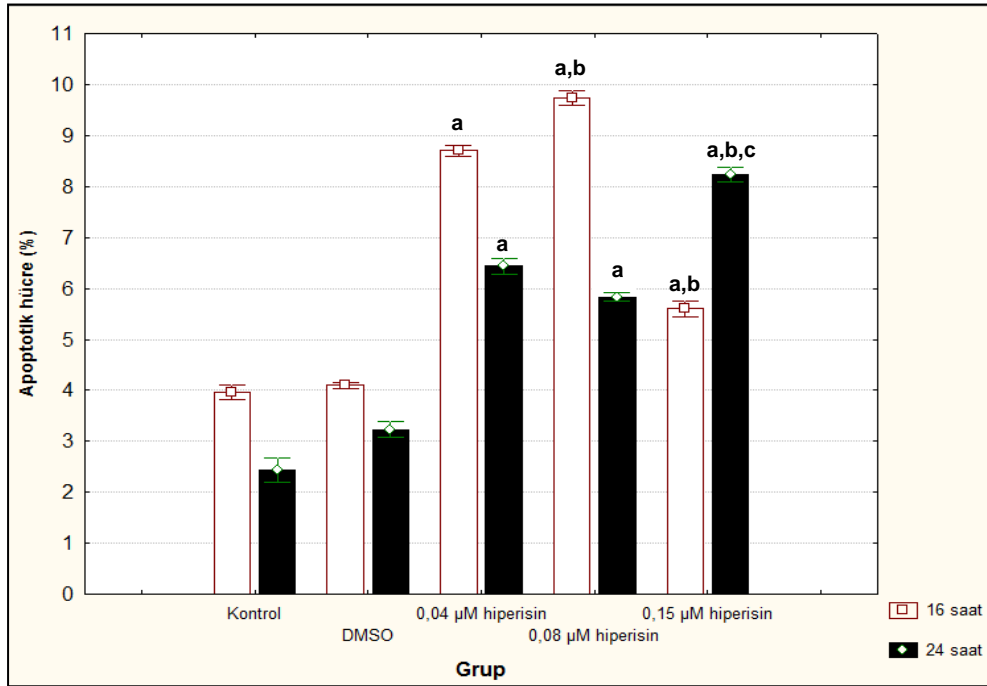


Şekil 4.19. HT-29 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu.
→ çekirdek yoğunlaşması, → çekirdek fragmentasyonu.



Şekil 4.19. (*devam ediyor*) HT-29 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü C. 0,08 µM hiperisin, D. 0,15 µM hiperisin grubu. **→** çekirdek yoğunlaşması, **→** çekirdek fragmentasyonu.

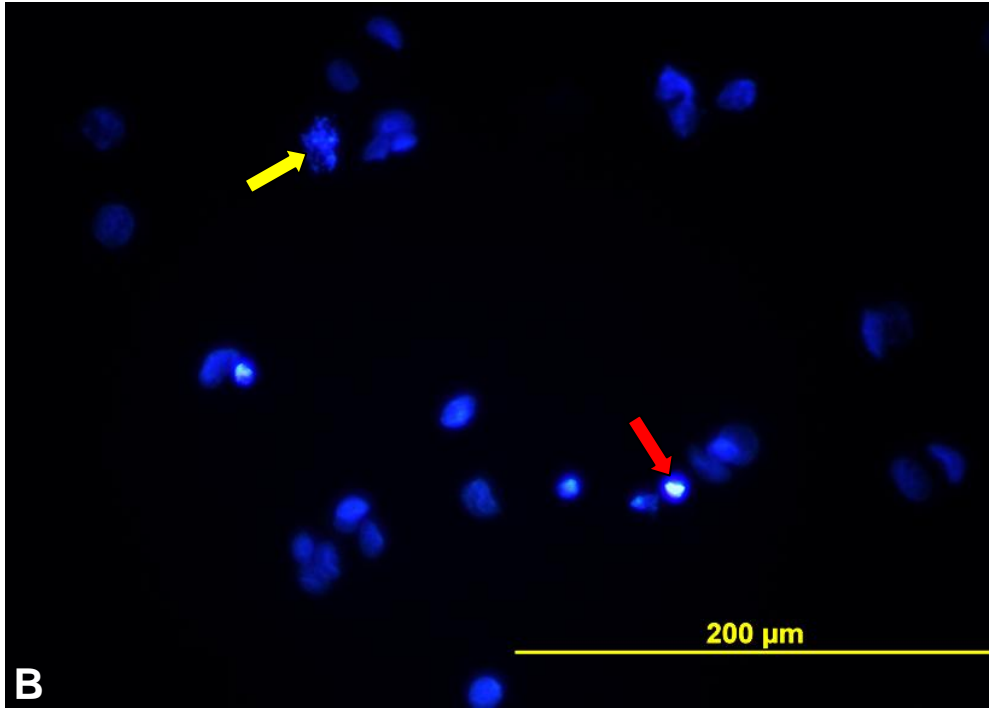
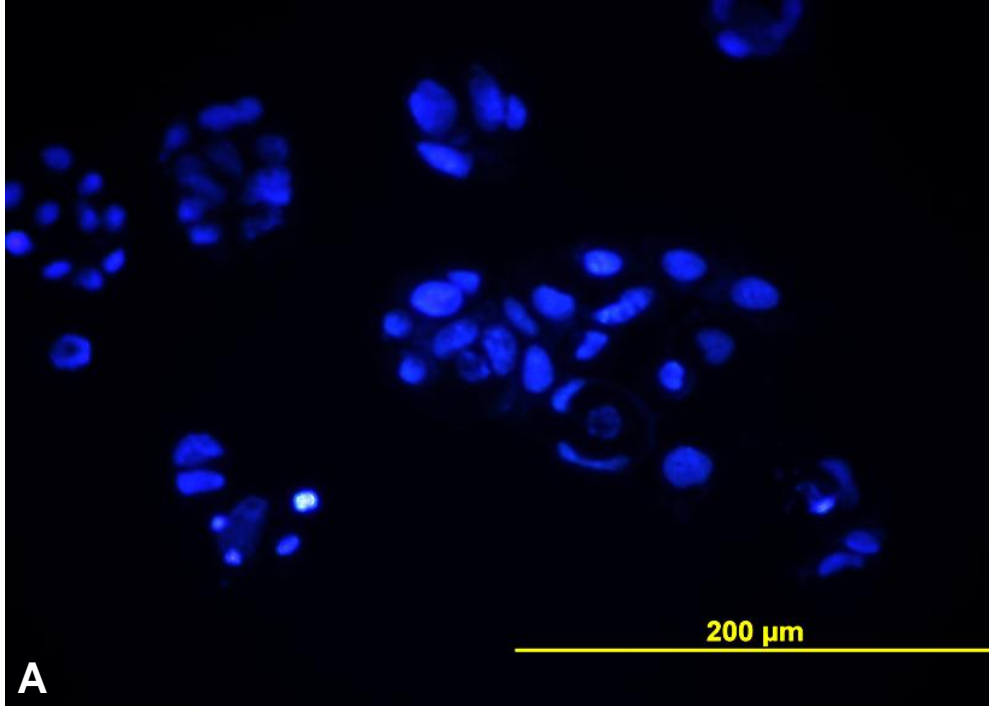
Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 ve 24 saat sonra hesaplanan apoptotik indeks grafiği Şekil 4.20'de verilmiştir. Aktivasyondan 16 saat sonra tüm hiperisin uygulama gruplarında apoptotik indeksteki artış ($P=0,0002$) kontrol grubundan; 0,08 μM hiperisin grubundaki artış ve 0,15 μM hiperisin grubundaki azalma ($P=0,0002$) 0,04 μM hiperisin grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Aktivasyondan 24 saat sonra tüm hiperisin gruplarında apoptotik indeks artışı ($P=0,0002$) kontrol grubundan; 0,15 μM hiperisin grubundaki artış ise 0,04 μM ve 0,08 μM hiperisin gruplarından ($P=0,0002$) istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur. İnkübasyon süreleri açısından gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında, apoptotik indeks 24 saat sonra kontrol ve düşük doz hiperisin gruplarında istatistiksel açıdan anlamlı derecede azalırken; 0,15 μM hiperisin grubunda artmıştır.



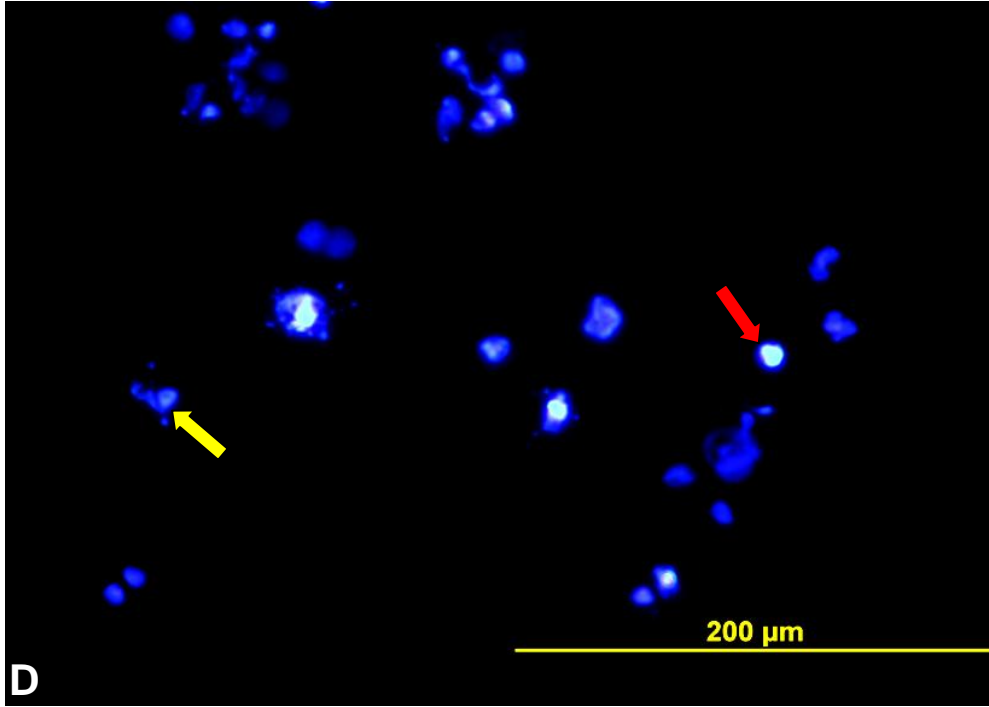
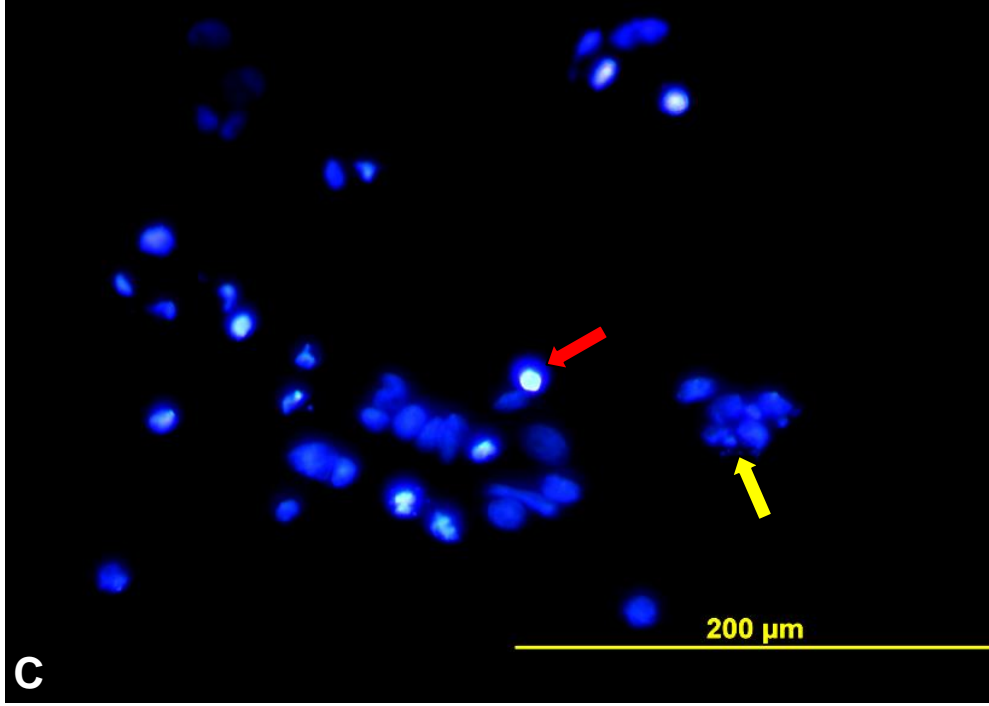
- ^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,001$).
^b: 0,04 μM hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,001$).
^c: 0,08 μM hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P\leq 0,001$).

Şekil 4.20. Kontrol ve hiperisin uygulanan Caco-2 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra apoptotik indeks.

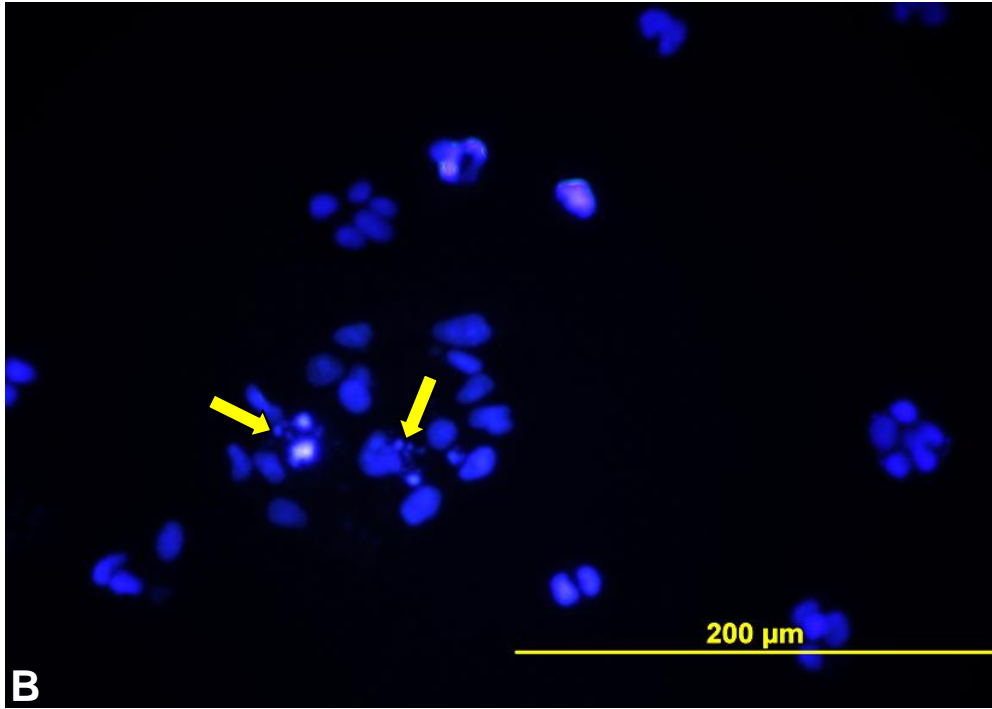
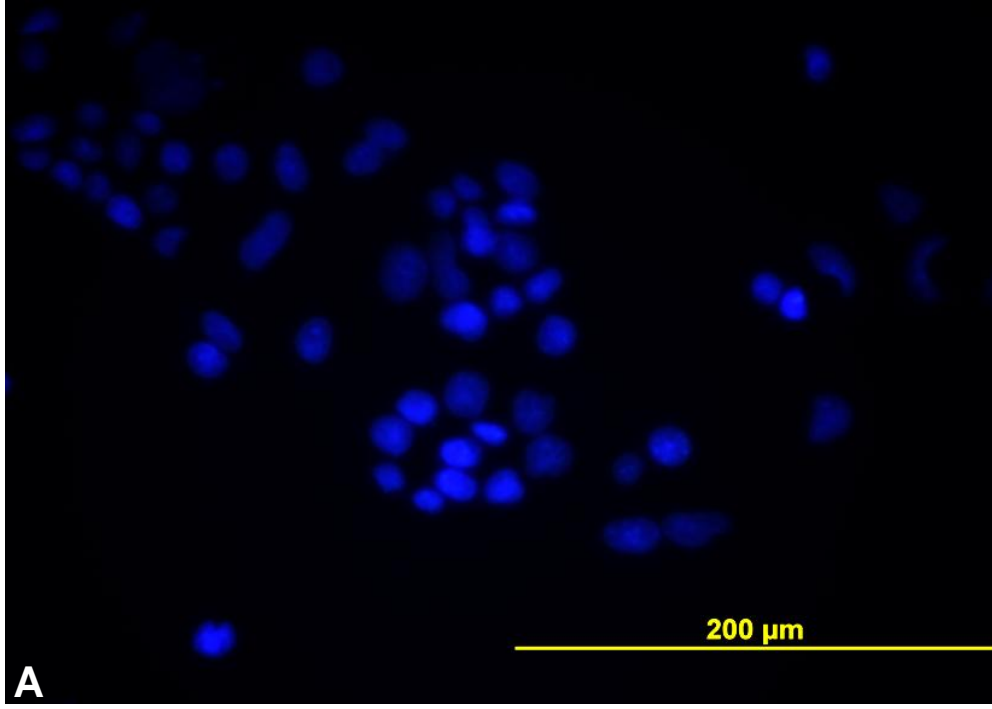
Şekil 4.21'de hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra, Şekil 4.22'de 24 saat sonra Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında DAPI boyaması ile mavi boyanan apoptotik hücreler gösterilmiştir.



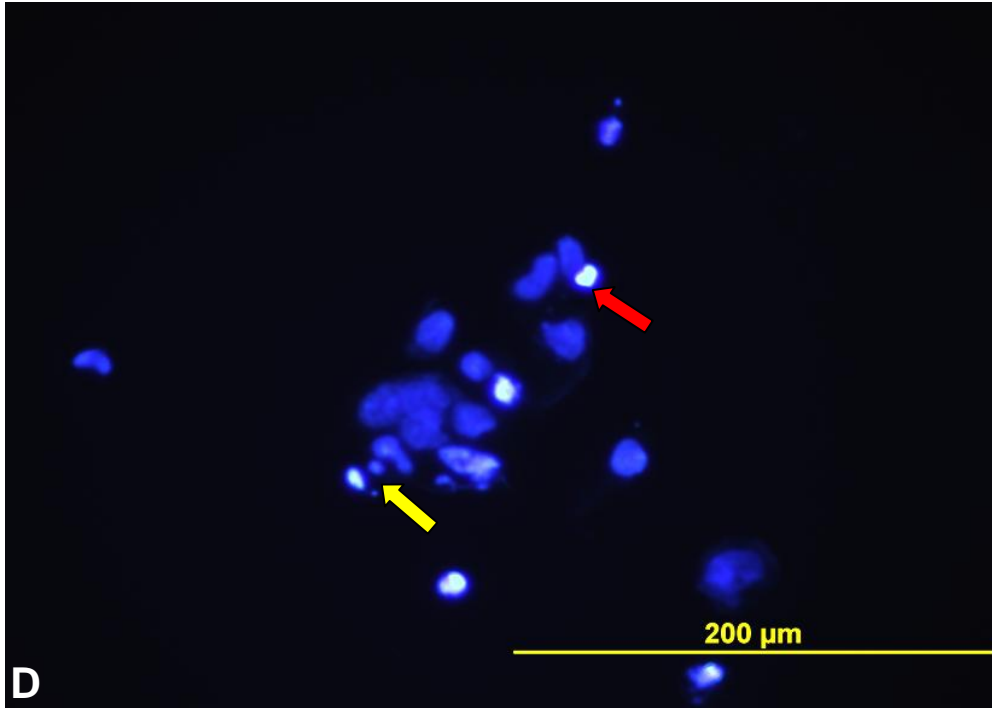
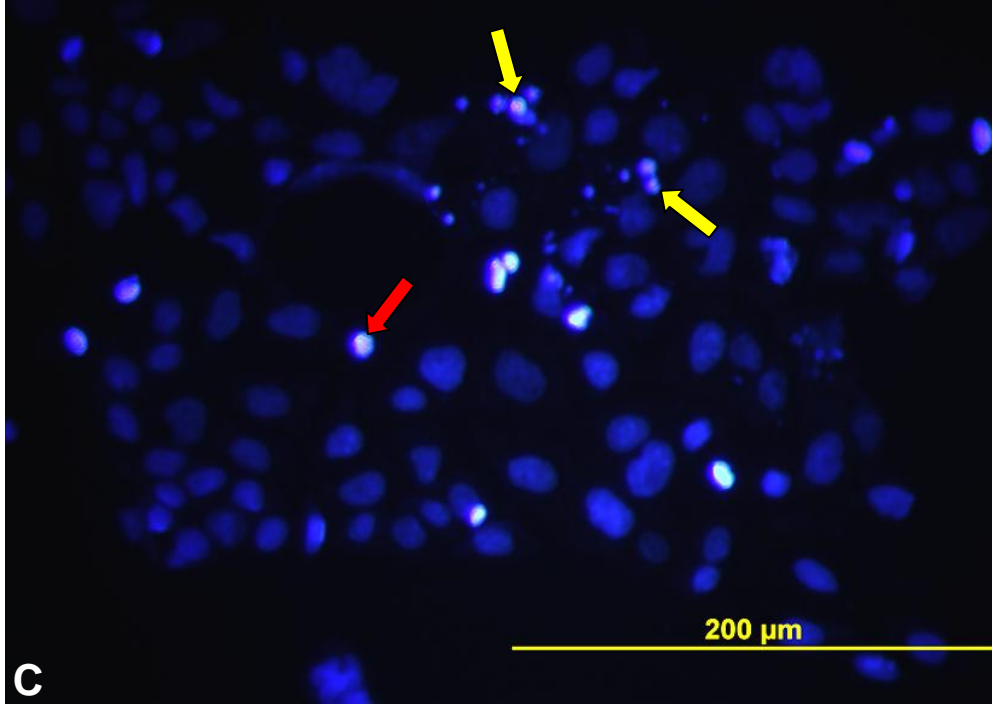
Şekil 4.21. Caco-2 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 μ M hiperisin grubu.
→ çekirdek yoğunlaşması, → çekirdek fragmentasyonu.



Şekil 4.21. (devam ediyor) Caco-2 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 µM hiperisin, D. 0,15 µM hiperisin grubu. → çekirdek yoğunlaşması, → çekirdek fragmentasyonu.



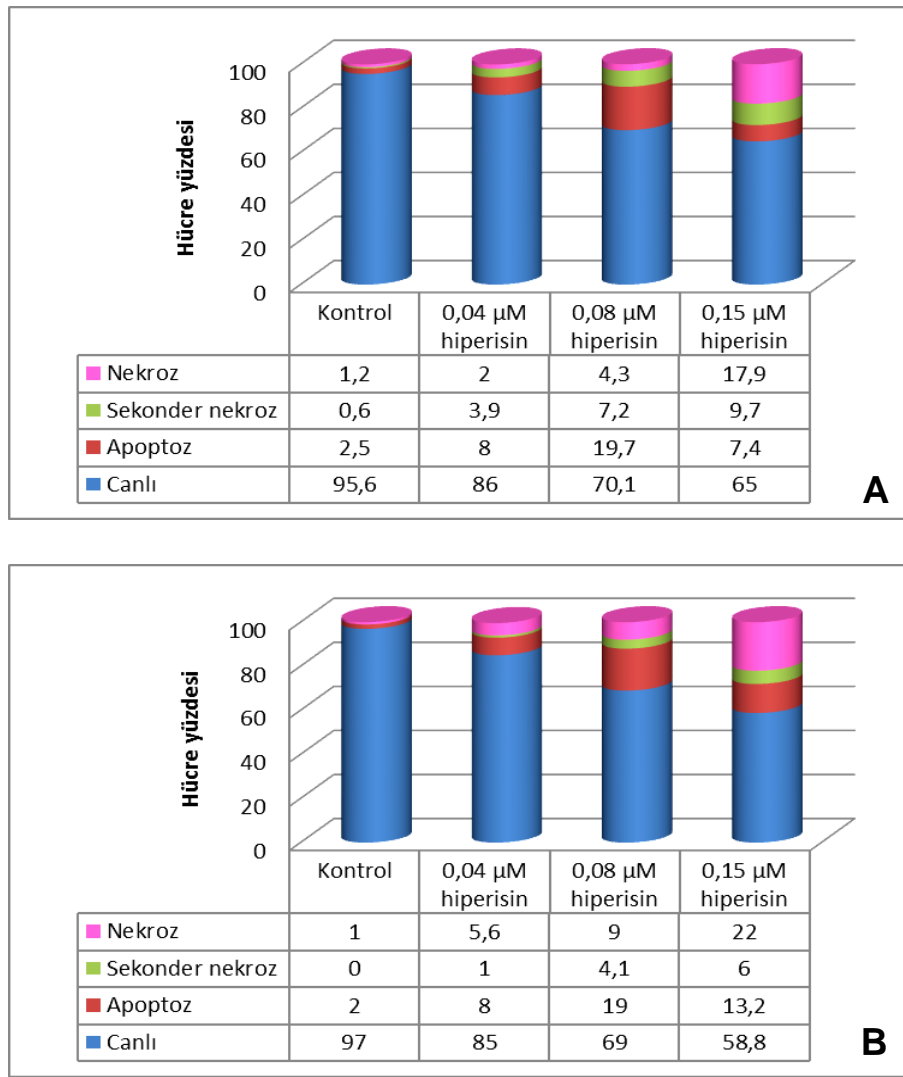
Şekil 4.22. Caco-2 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 μM hiperisin grubu.
→ çekirdek yoğunlaşması, → çekirdek fragmentasyonu.



Şekil 4.22. (devam ediyor) Caco-2 hücrelerinin hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra DAPI ile boyanmış inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 µM hiperisin, D. 0,15 µM hiperisin grubu. → çekirdek yoğunlaşması, → çekirdek fragmentasyonu

4.9. Hücre Ölüm Tipinin AO/PI Boyaması ile Belirlenmesi

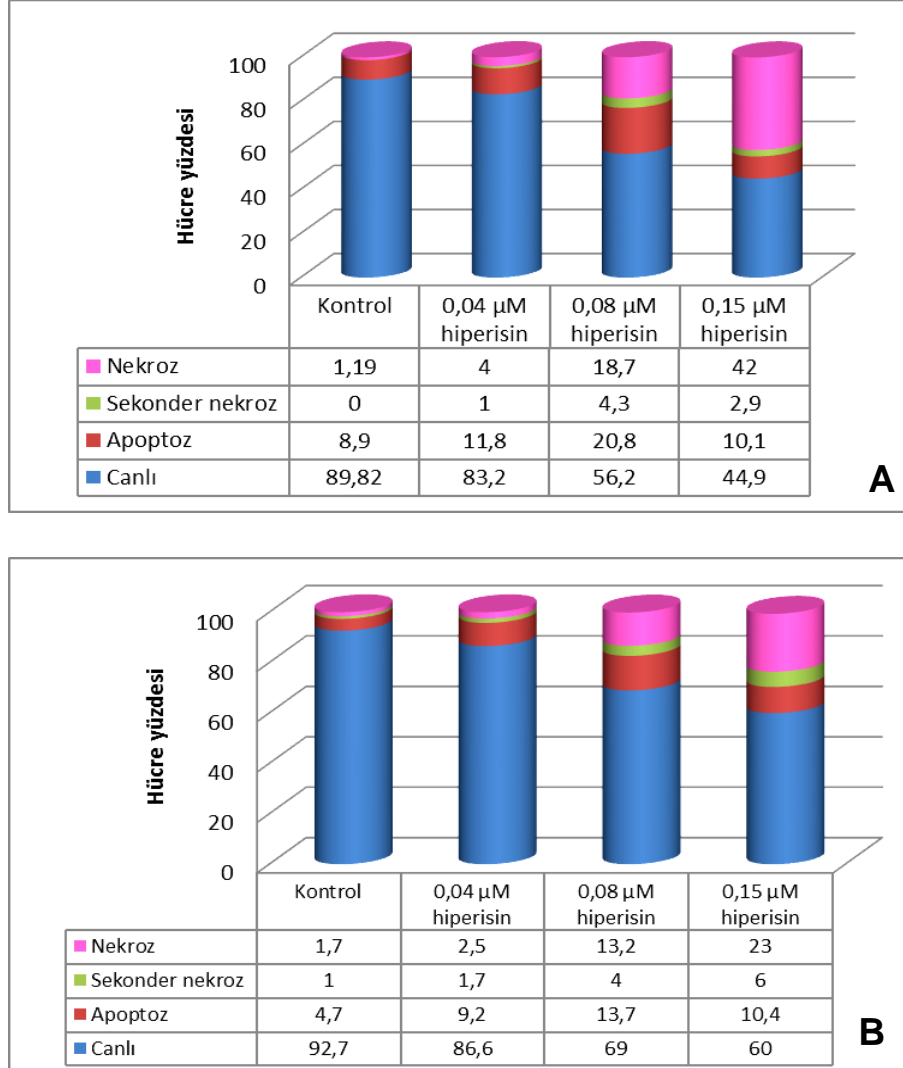
AO/PI ikili boyaması kullanılarak hücre zarının bütünlüğü ve çekirdek morfolojisi incelenerek hücrenin ölüm şekli belirlenmiştir. HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonu ile farklı oranlarda farklı hücre ölümleri gözlenmiştir. Bunlar, çekirdek yoğunlaşmasının olduğu erken apoptotik; hücrelerde çekirdek fragmentasyonunun ve apoptotik cisimciklerin olduğu geç apoptotik; çekirdek fragmentasyonu ile birlikte hücre zarında hasarın görüldüğü sekonder nekrotik ve çekirdek bozulmasının olmadığı sadece hücre zarında bozulmanın olduğu nekrotik hücre ölümü tipleridir. HT-29 hücrelerine ait ölüm tipi yüzdeleri Şekil 4.23'te verilmiştir.



Şekil 4.23. Kontrol ve hiperisin uygulanan HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat (A) ve 24 saat (B) sonra canlı, apoptotik, sekonder nekrotik ve nekrotik hücre yüzdeleri (%).

Bu sonuçlara göre apoptotik hücre yüzdesi her iki inkübasyon süresi için de 0,08 μM hiperisin grubunda en fazladır. Sekonder nekrotik ve nekrotik hücre ölümlerinin 0,15 μM hiperisin grubunda en fazla olduğu tespit edilmiştir.

Caco-2 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdesi her iki inkübasyon süresi için de 0,08 μM hiperisin grubunda, nekrotik hücre yüzdesi ise 0,15 μM hiperisin grubunda en fazla bulunmuş ve 24 saat sonra bu ölüm yüzdeleri azalmıştır (Şekil 4.24).

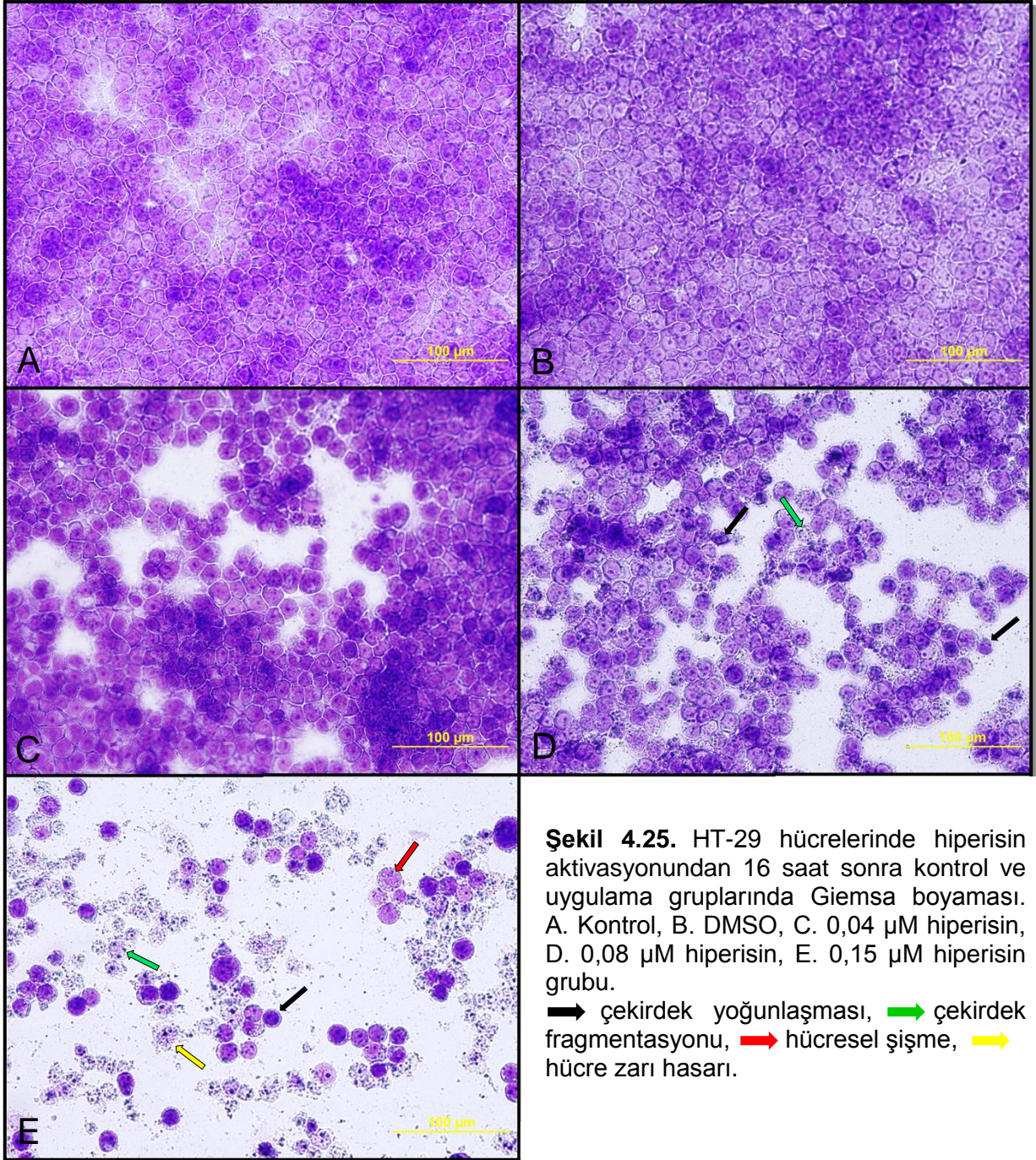


Şekil 4.24. Kontrol ve hiperisin uygulanan Caco-2 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat (A) ve 24 saat (B) sonra canlı, apoptotik, sekonder nekrotik ve nekrotik hücre yüzdeleri (%).

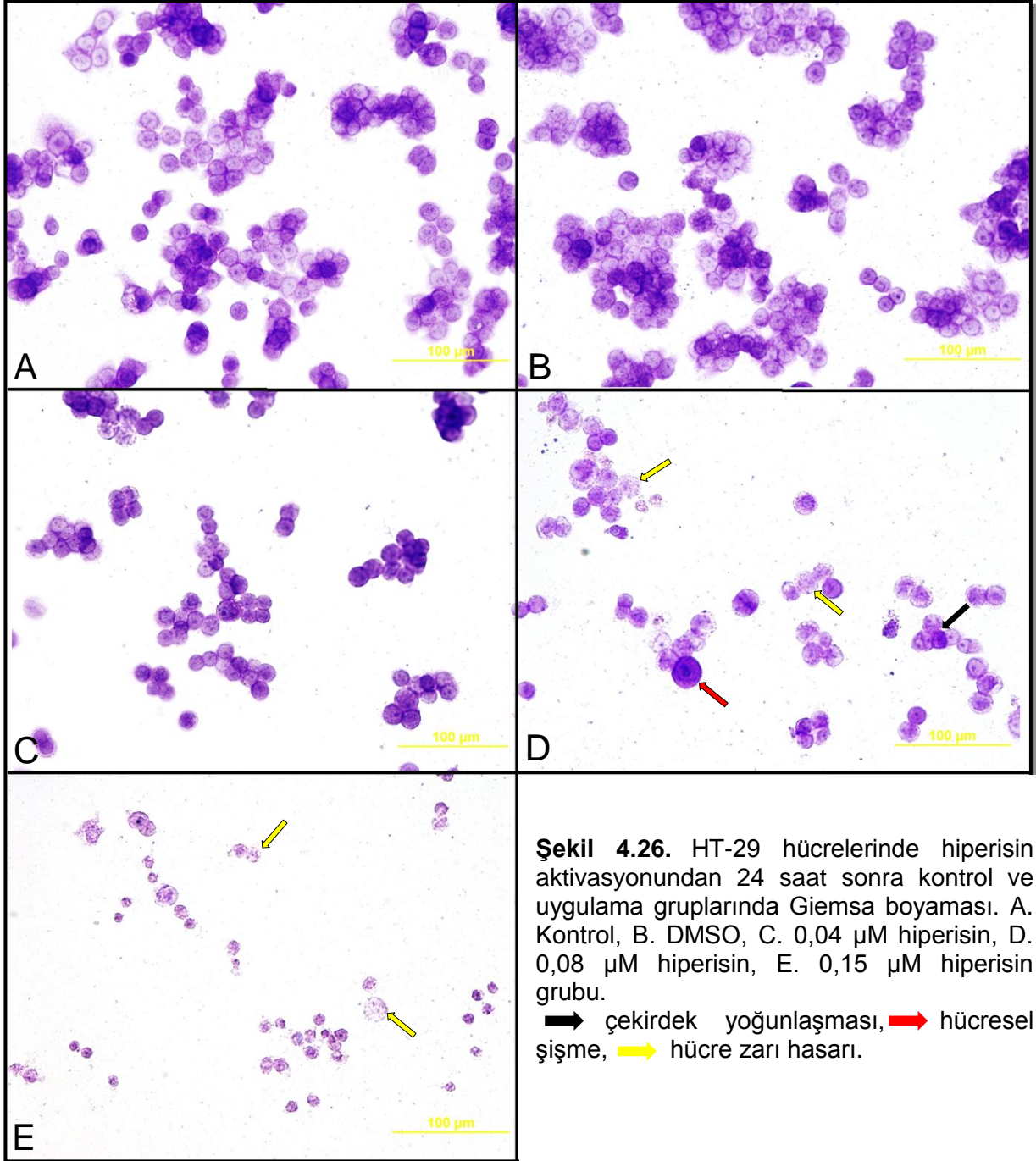
Sekonder nekroz yüzdesi 16 saat için 0,08 μM hiperisin grubunda, 24 saat için ise 0,15 μM hiperisin grubunda en fazla bulunmuştur.

4.10. Hücre Morfolojisinin Giemsa Boyaması ile Belirlenmesi

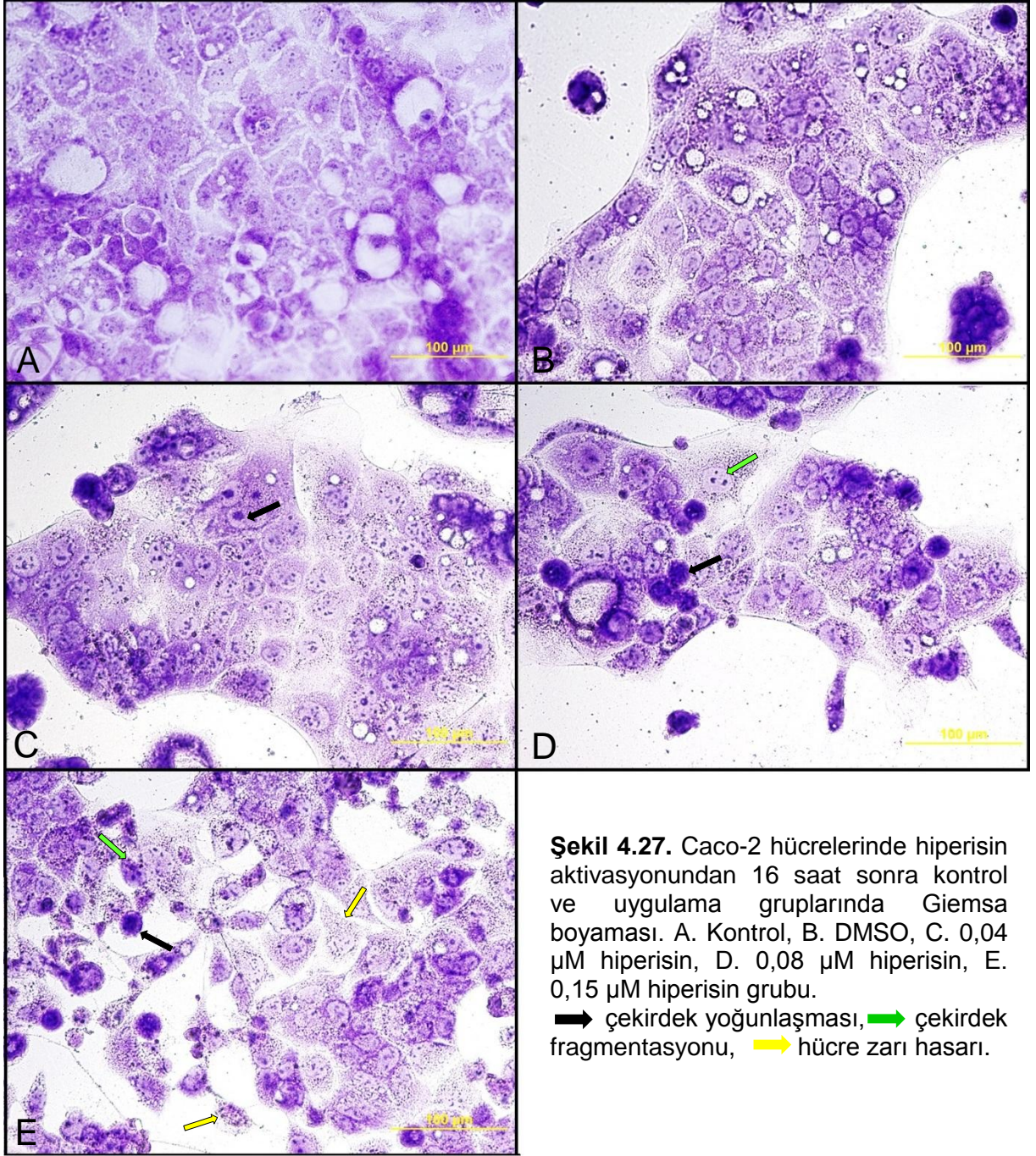
Hiperisin aktivasyonundan sonra HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde çekirdek ve hücre zarındaki morfolojik değişiklikleri incelemek üzere Giemsa boyaması yapılmıştır. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarına ait Giemsa boyamaları aktivasyondan 16 saat sonra için Şekil 4.25'te, 24 saat sonra için Şekil 4.26'da verilmiştir.



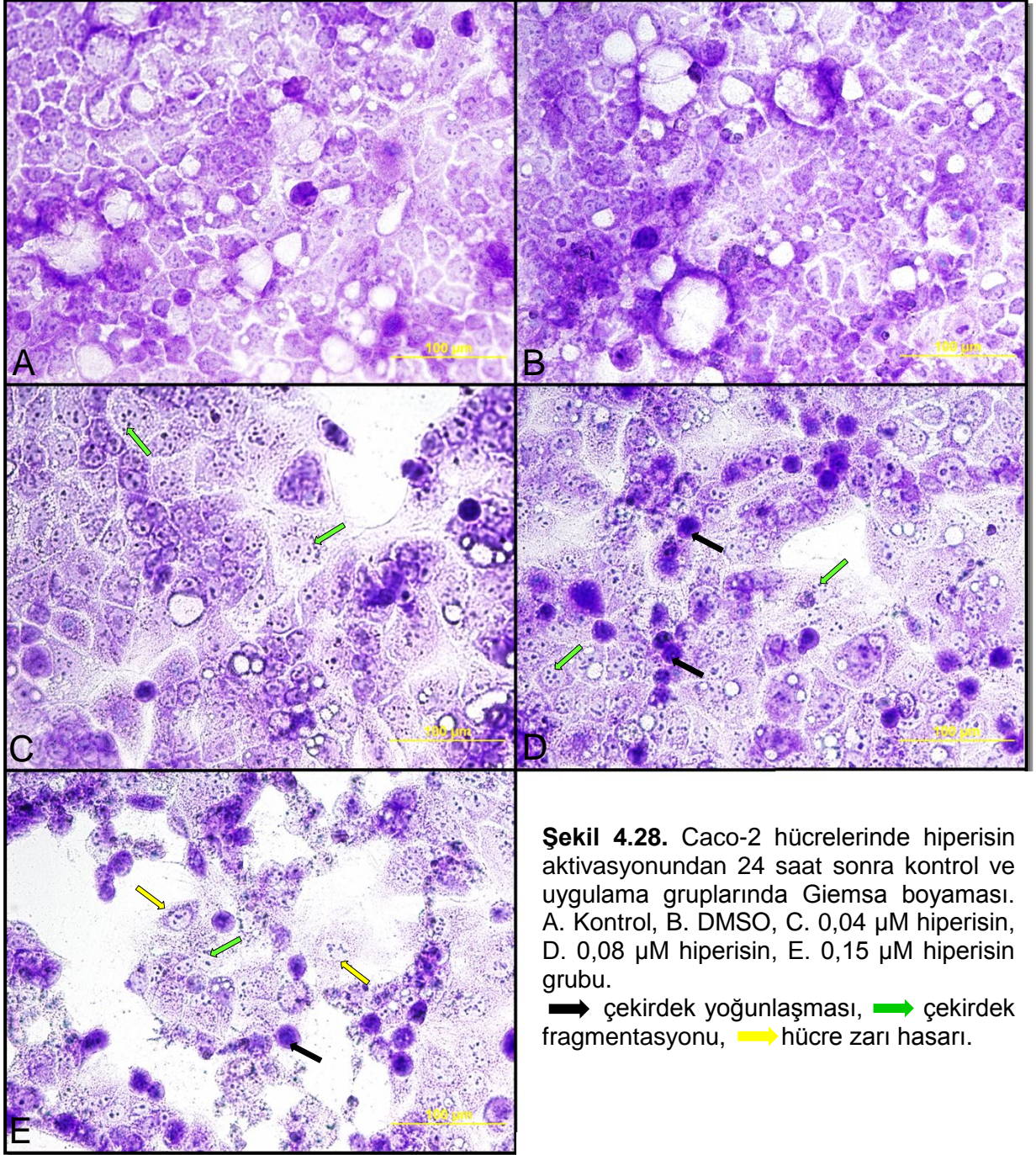
Boyamalara göre, hiperisin konsantrasyonundaki artışa paralel olarak tüm hiperisin uygulama gruplarında çekirdek yoğunlaşması ve çekirdek fragmentasyonu görülürken, özellikle 0,15 μM hiperisin grubunda hücre zarında hasar ve lizis görülmüştür. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra özellikle yüksek doz hiperisin gruplarında (0,08 μM ve 0,15 μM) çekirdek yoğunlaşması ve hücre zarı hasarında artış gözlenmiştir.



Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında Giemsa boyamaları, aktivasyondan 16 saat sonra Şekil 4.27'de, aktivasyondan 24 saat sonra Şekil 4.28'de verilmiştir. Çekirdek yoğunlaşması, çekirdek fragmentasyonu tüm hiperisin uygulama gruplarında gözlenirken, özellikle 0,08 μM hiperisin grubunda en fazla olmuştur. Hücre zarı hasarı her iki inkübasyon süresi için de hiperisin konsantrasyonuna bağlı olarak artmış ve en fazla 0,15 μM hiperisin grubunda gözlenmiştir.



Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra, 16 saate benzer şekilde çekirdeklerde yoğunlaşma, fragmentasyon, özellikle yüksek hiperisin konsantrasyonlarında (0,08 μ M ve 0,15 μ M) hücre zarı hasarı gözlenmiştir.



Şekil 4.28. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra kontrol ve uygulama gruplarında Giemsa boyaması. A. Kontrol, B. DMSO, C. 0,04 μ M hiperisin, D. 0,08 μ M hiperisin, E. 0,15 μ M hiperisin grubu.

➡ çekirdek yoğunlaşması, ➡ çekirdek fragmentasyonu, ➡ hücre zarı hasarı.

4.11. Akış Sitometride Hücre Döngüsünün Belirlenmesi

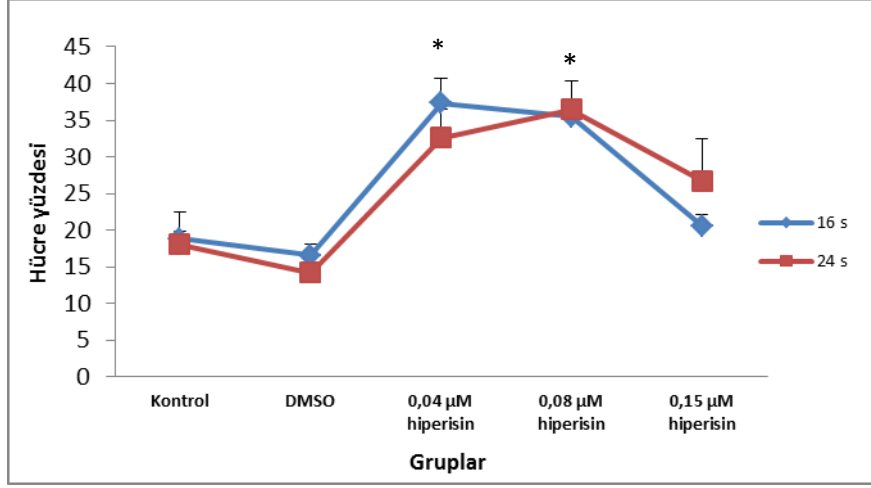
HT-29 hücrelerinde kontrol, 0,04 μM , 0,08 μM ve 0,15 μM hiperisin ve 4 J/cm^2 ışık uygulamasından 16 ve 24 saat sonra akış sitometri cihazında hücre döngüsü analizleri yapılmıştır. HT-29 hücreleri için hücre döngüsünün G1, S ve G2/M fazdaki hücre yüzdeleri Çizelge 4.10'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre, aktivasyondan 16 ve 24 saat sonra 0,08 μM hiperisin grubunda G0/G1 fazındaki hücre yüzdesindeki azalma ($P=0,009$; $P=0,046$) ve aktivasyondan 24 saat sonra G2/M fazındaki hücre yüzdesindeki artış ($P=0,007$) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. 0,04 μM ve 0,08 μM hiperisin grubunda G2/M fazında duran hücre yüzdelerindeki artış (Şekil 4.29) hücre döngüsünün bu fazında durduğunu göstermektedir. Ayrıca aktivasyondan 16 saat sonra 0,04 μM hiperisin grubunda G2/M fazındaki hücre yüzdesindeki artış kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan farklı bulunmuştur ($P=0,03$). 0,04 μM ve 0,15 μM hiperisin gruplarında, iki inkübasyon süresi için hücre döngüsü dağılımında kontrol grubuna göre önemli bir farklılık gözlenmezken, 16 saat S fazı için iki grup birbirinden farklı bulunmuştur ($P=0,001$). Hücre döngüsünün her bir fazında bulunan hücre populasyonlarını gösteren DNA histogramları 16 saat Şekil 4.30'da, 24 saat Şekil 4.31'de verilmiştir. Gruplara ait hücre döngüsü sonuçları inkübasyon süreleri açısından karşılaştırıldığında önemli bir farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 4.10. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra hücre döngüsü fazlarının dağılımı (%).

	16 s			24 s		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
Kontrol	62,5 \pm 2,08	18,8 \pm 1,62	18,8 \pm 3,54	62,7 \pm 2,71	19,1 \pm 1,41	18,1 \pm 1,74
DMSO	63,9 \pm 0,78	19,5 \pm 0,90	16,5 \pm 1,58	63,2 \pm 5,43	22,5 \pm 2,30	14,2 \pm 3,10
0,04 μM hiperisin	51,7 \pm 1,37	10,9 \pm 2,15	37,3 \pm 3,48 ^a	48,8 \pm 4,14	18,6 \pm 4,47	32,6 \pm 3,97
0,08 μM hiperisin	42,2 \pm 1,88 ^a	22,3 \pm 3,91	35,4 \pm 4,95	44,6 \pm 1,02 ^a	18,9 \pm 0,45	36,4 \pm 1,28 ^a
0,15 μM hiperisin	52 \pm 1,32	27,4 \pm 2,60 ^b	20,6 \pm 1,59	53,1 \pm 2,82	20,2 \pm 3,57	26,7 \pm 5,71

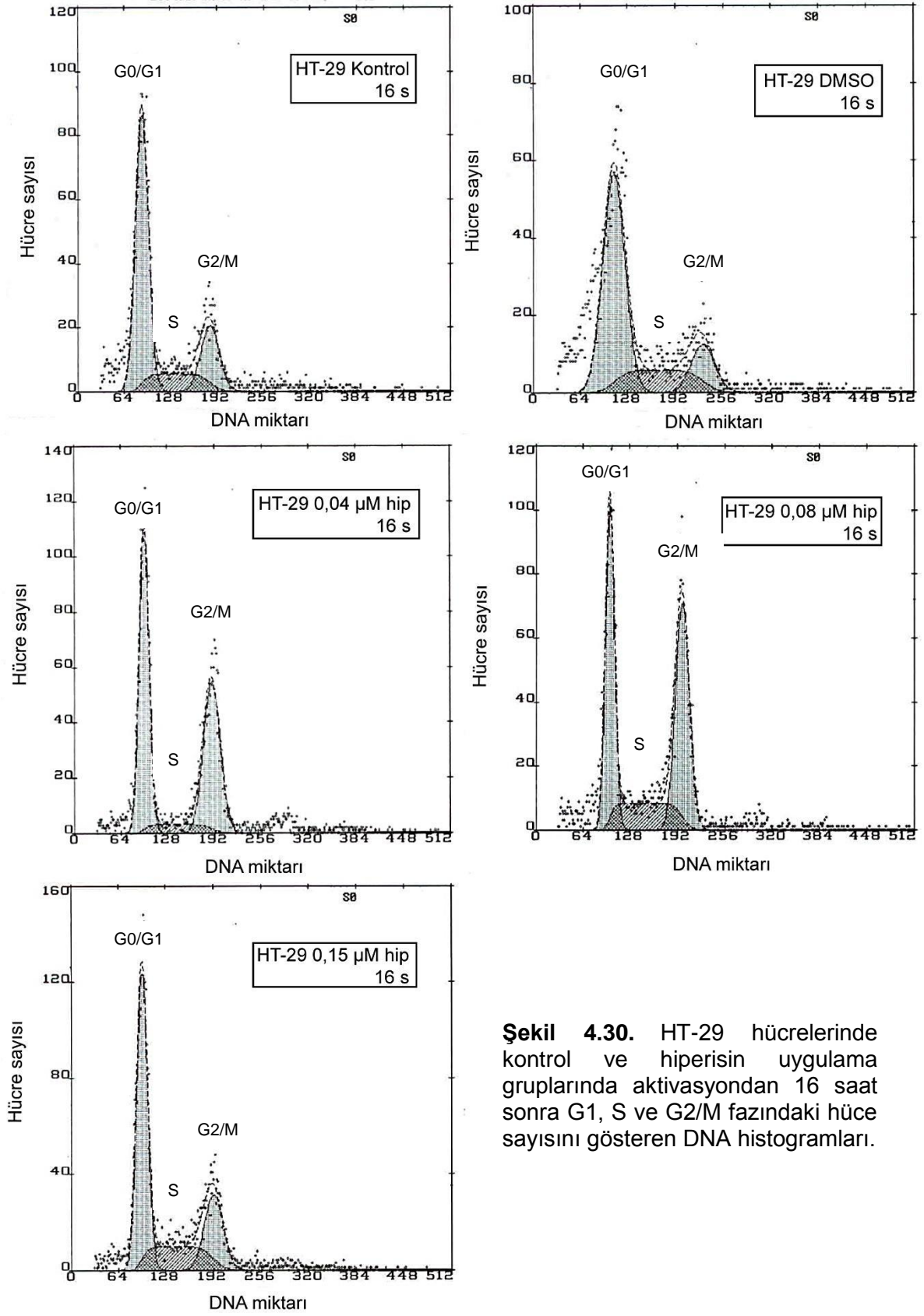
^a: Kontrol grubundan önemli derecede farklıdır ($P\leq 0,05$).

^b: 0,04 μM hiperisin grubundan önemli derecede farklıdır ($P\leq 0,05$).

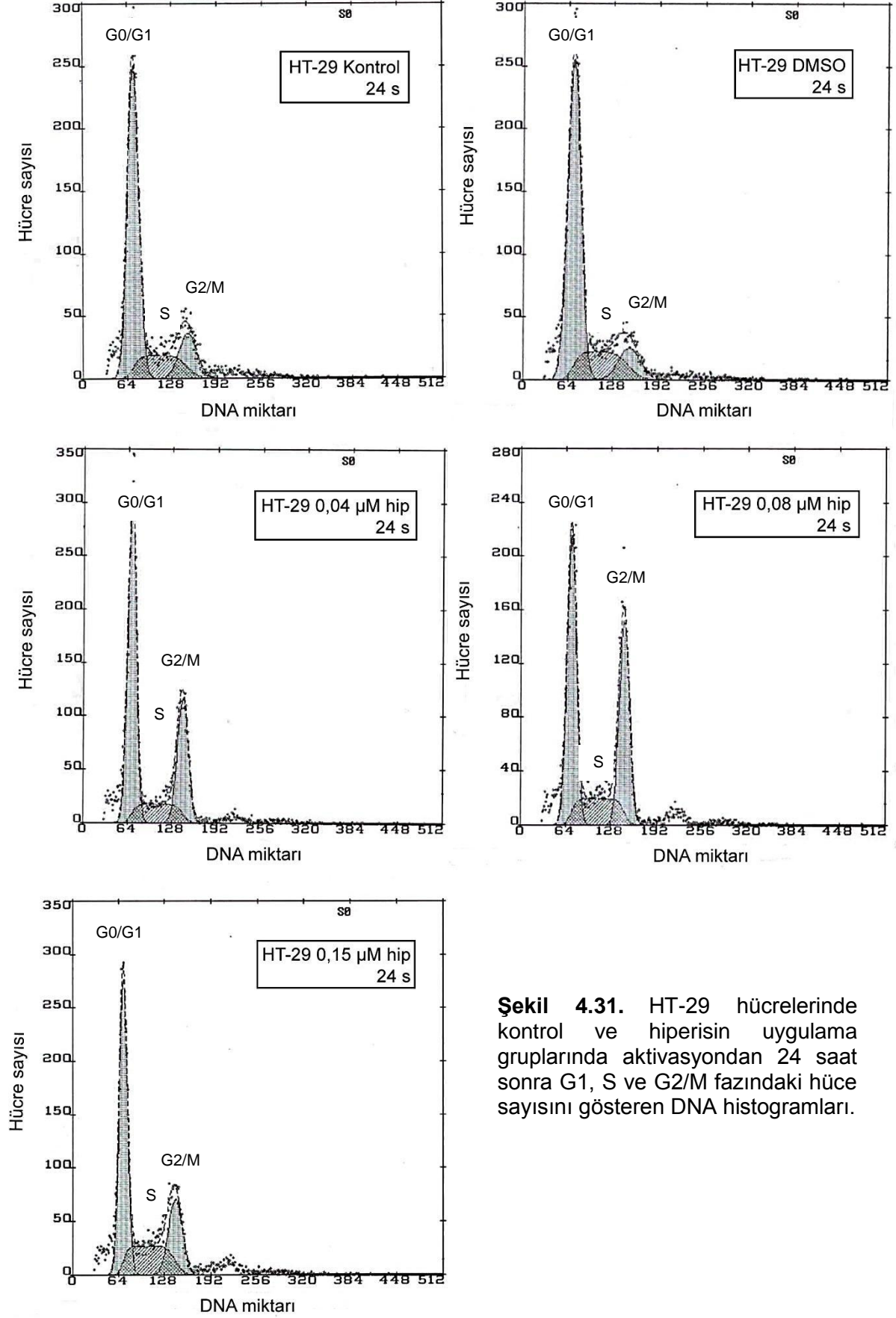


*: Kontrol grubundan önemli derecede farklıdır (P≤0,05).

Şekil 4.29. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra hücre döngüsünün G2/M fazında duran hücre yüzdesi.



Şekil 4.30. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat sonra G1, S ve G2/M fazındaki hücre sayısını gösteren DNA histogramları.



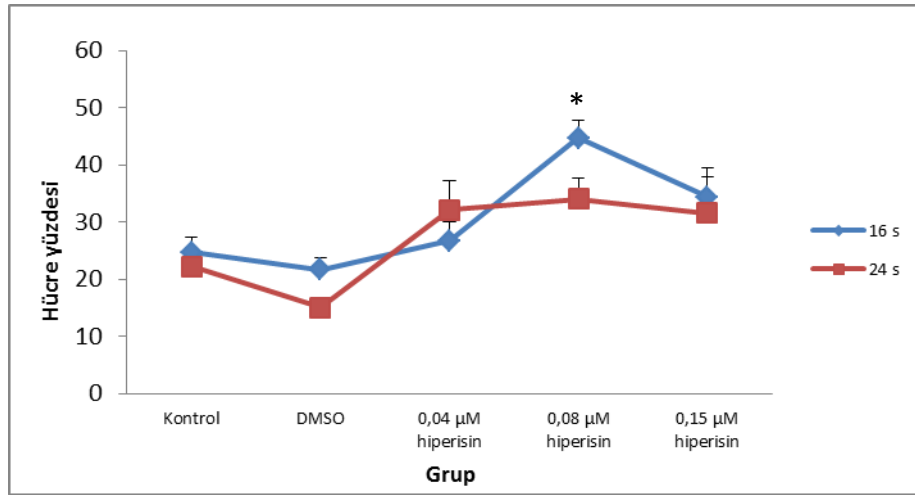
Şekil 4.31. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 24 saat sonra G1, S ve G2/M fazındaki hücre sayısını gösteren DNA histogramları.

Caco-2 hücrelerinde kontrol, 0,04 μ M, 0,08 μ M ve 0,15 μ M hiperisin ve ışımadan sonra hücre döngüsünün G1, S ve G2/M fazındaki hücre yüzdeleri Çizelge 4.11’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre 0,08 μ M hiperisin grubunda uygulamadan 16 saat sonra G0/G1 ve S fazındaki hücre yüzdesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değilken, G2/M fazındaki hücre yüzdesindeki artış ($P=0,026$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar, Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra hücre döngüsünün G2/M fazında durduğunu göstermektedir (Şekil 4.32).

Çizelge 4.11. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra hücre döngüsü fazlarının dağılımı (%).

	16 s			24 s		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
Kontrol	37,5±1,74	37,6±2,79	24,7±2,63	38,1±6,07	39,5±7,70	22,3±1,80
DMSO	37,3±0,99	41±1,59	21,7±2,09	42,8±3,03	42,1±4,77	15,1±1,45
0,04 μM hiperisin	35,5±2,21	35,1±1,97	26,7±3,34	35,7±6,54	32,1±3,0	32,1±5,03
0,08 μM hiperisin	26,7±1,93	28,4±2,52	44,7±3,10 ^a	38,8±7,80	27,9±4,21	33,2±3,63
0,15 μM hiperisin	30,2±2,42	35,4±3,06	34,3±5,14	36,1±6,06	32,2±5,79	31,6±6,24

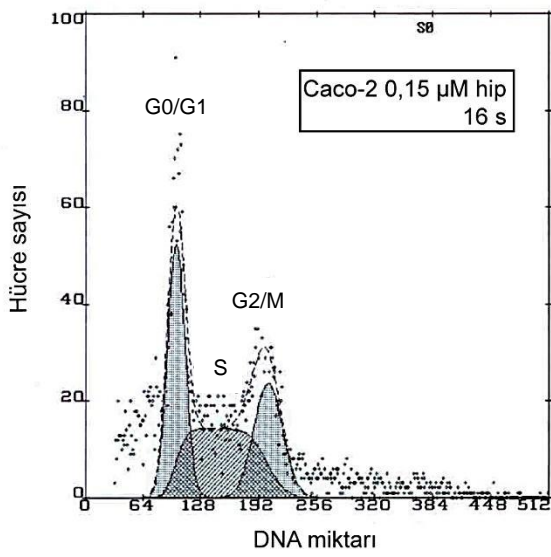
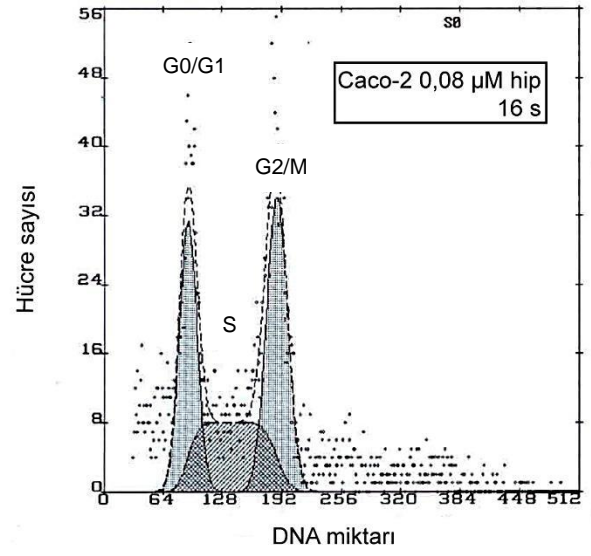
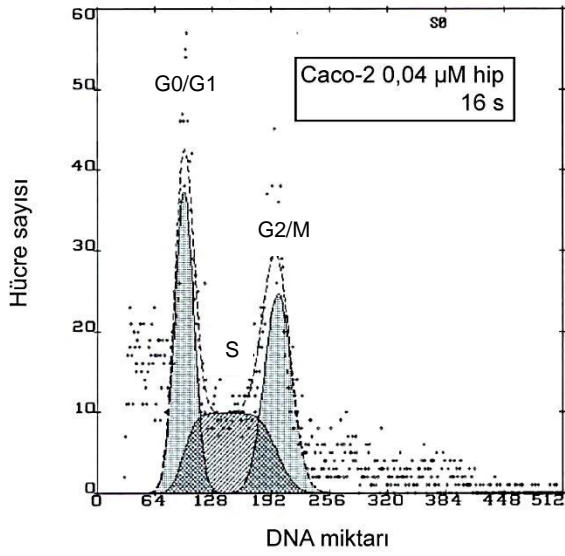
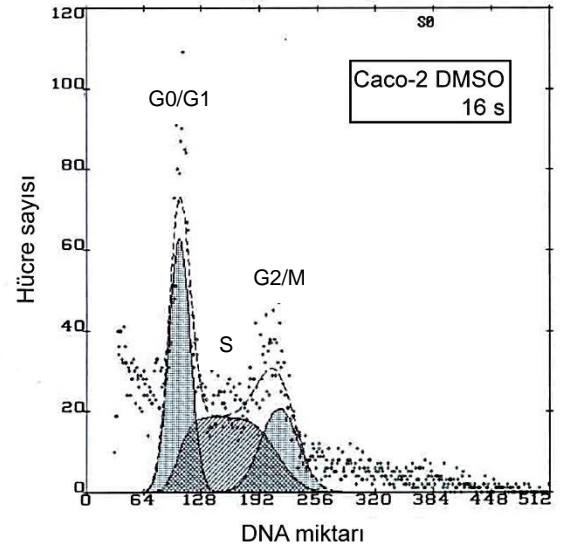
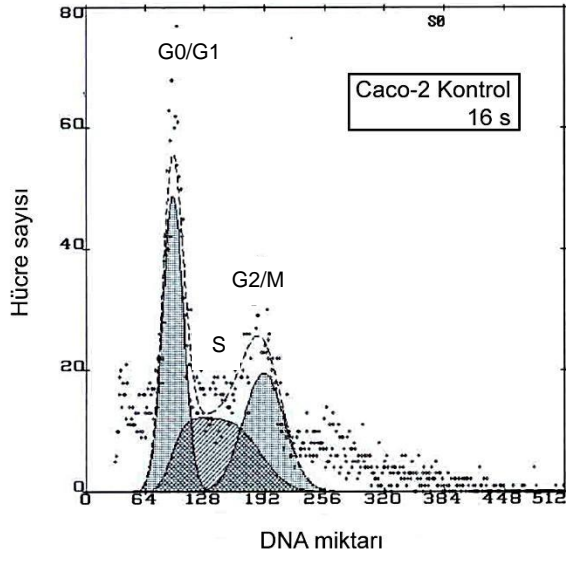
^a: Kontrol grubundan önemli derecede farklıdır ($P\leq 0,05$).



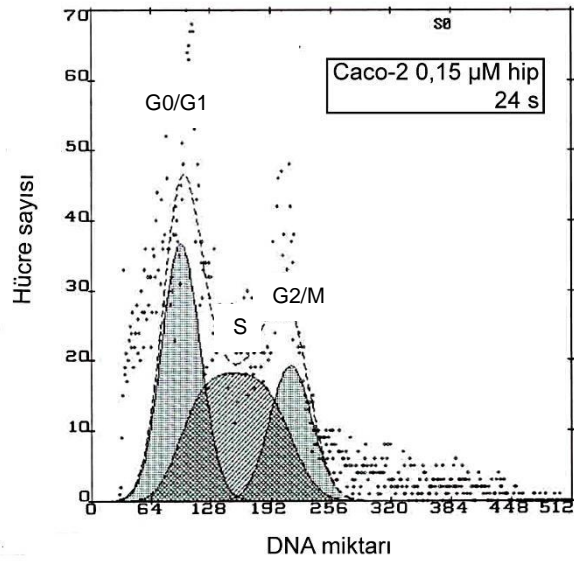
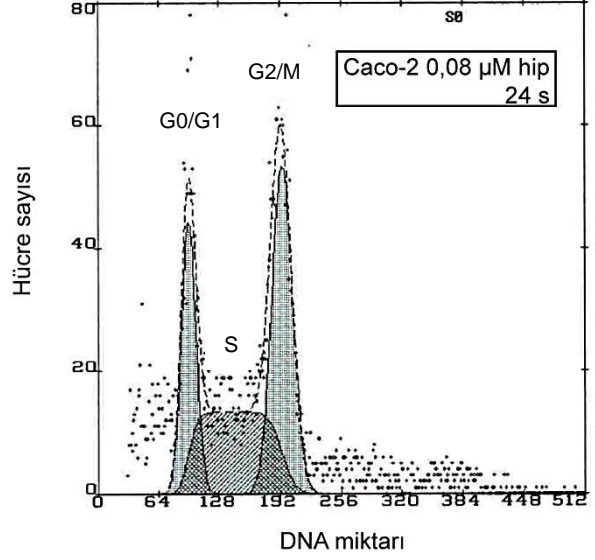
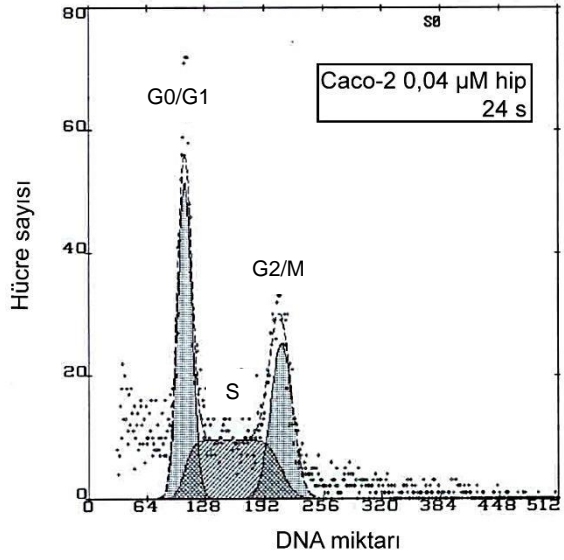
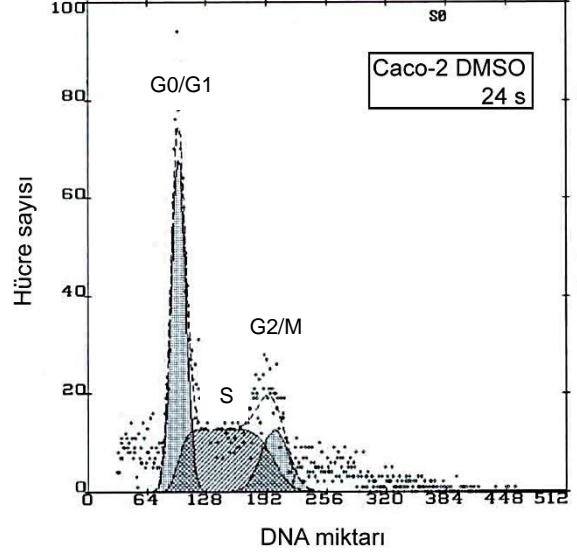
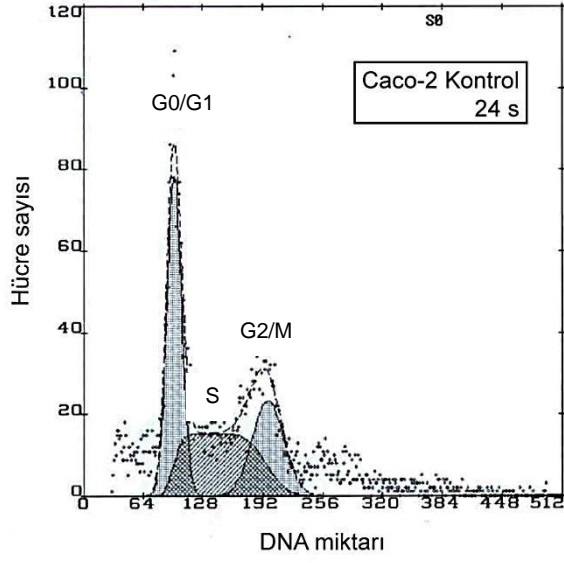
*: Kontrol grubundan önemli derecede farklıdır ($P\leq 0,05$).

Şekil 4.32. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat ve 24 saat sonra hücre döngüsünün G2/M fazında duran hücre yüzdesi.

Hücre döngüsünün her bir fazında bulunan hücre popülasyonlarını gösteren DNA histogramları 16 saat için Şekil 4.33’te, 24 saat için Şekil 4.34’de verilmiştir. Gruplara ait hücre döngüsü sonuçları inkübasyon süreleri açısından karşılaştırıldığında önemli bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 4.33. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat sonra G1, S ve G2/M fazındaki hücre sayısını gösteren DNA histogramları.



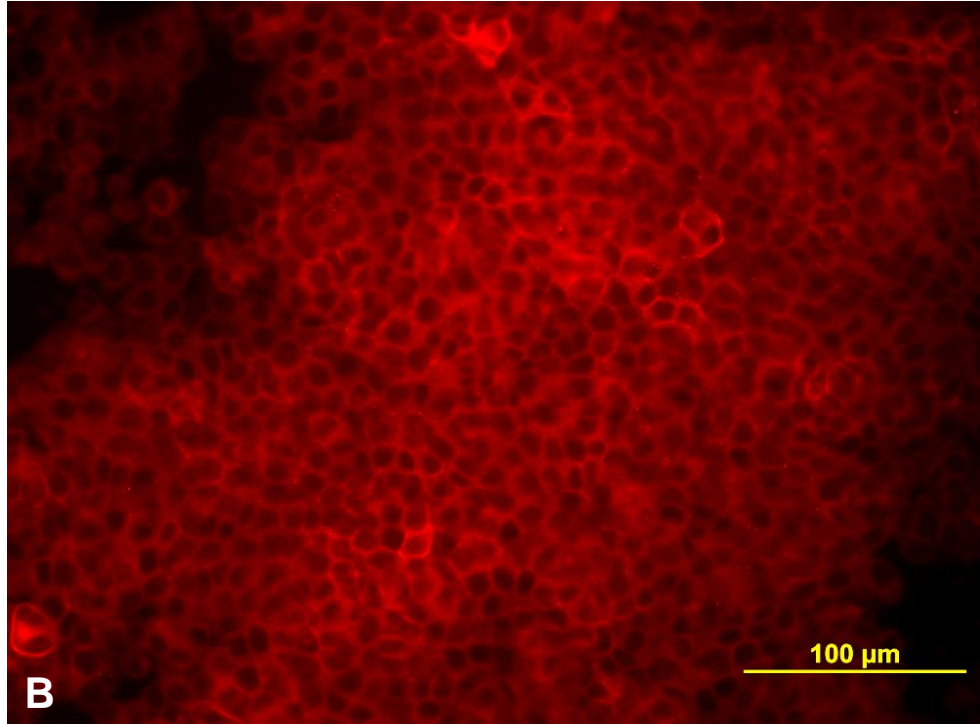
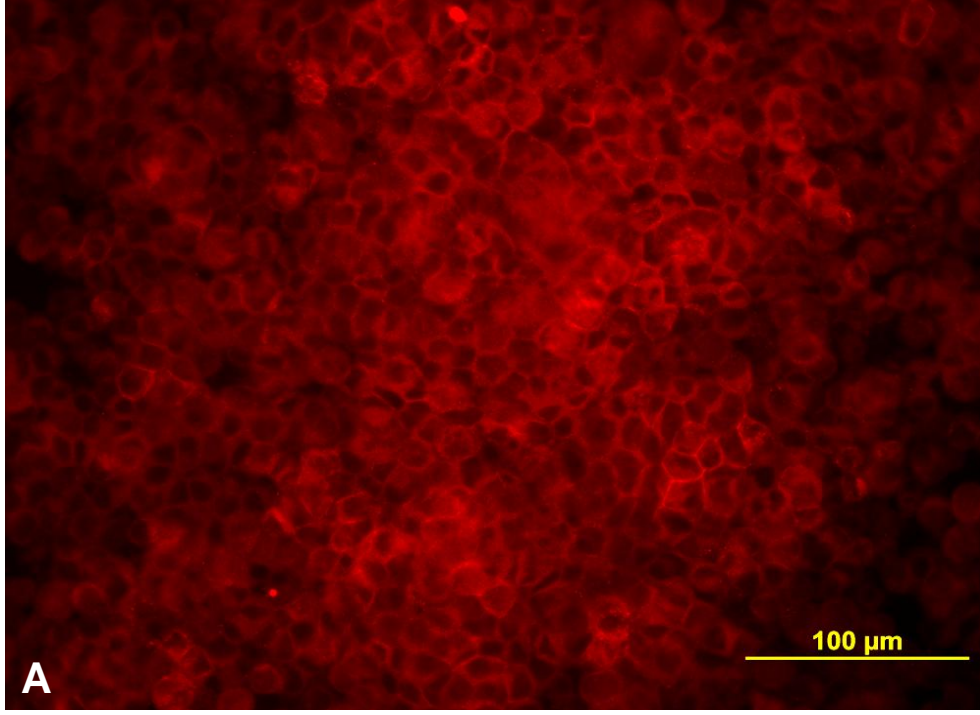
Şekil 4.34. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 24 saat sonra G1, S ve G2/M fazındaki hücre sayısını gösteren DNA histogramları.

4.12. Disaderin ve F-aktinin İmmünfloresan Boyaması

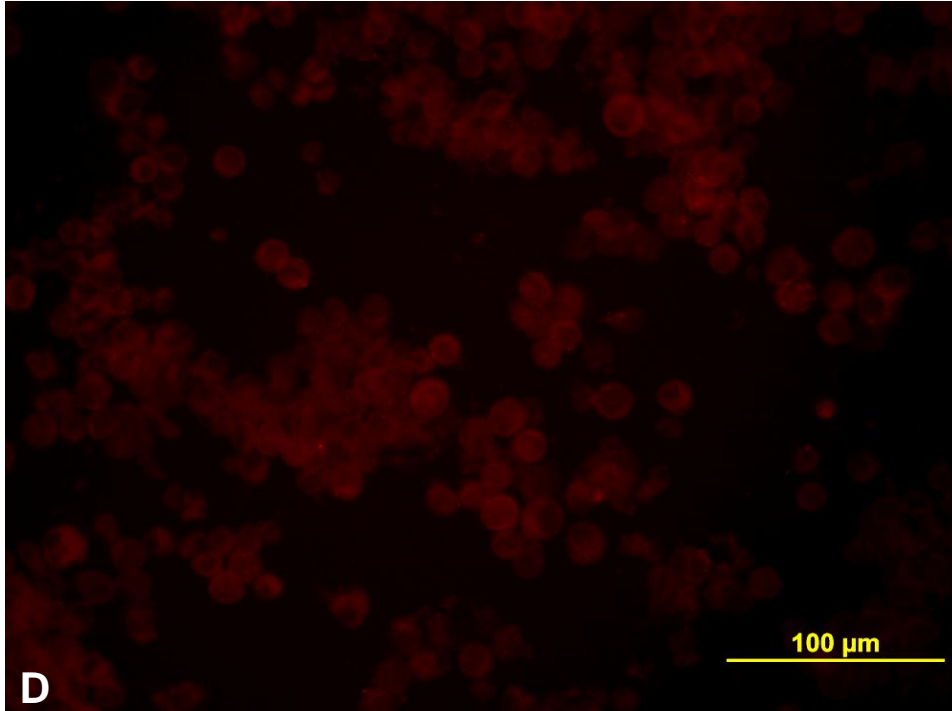
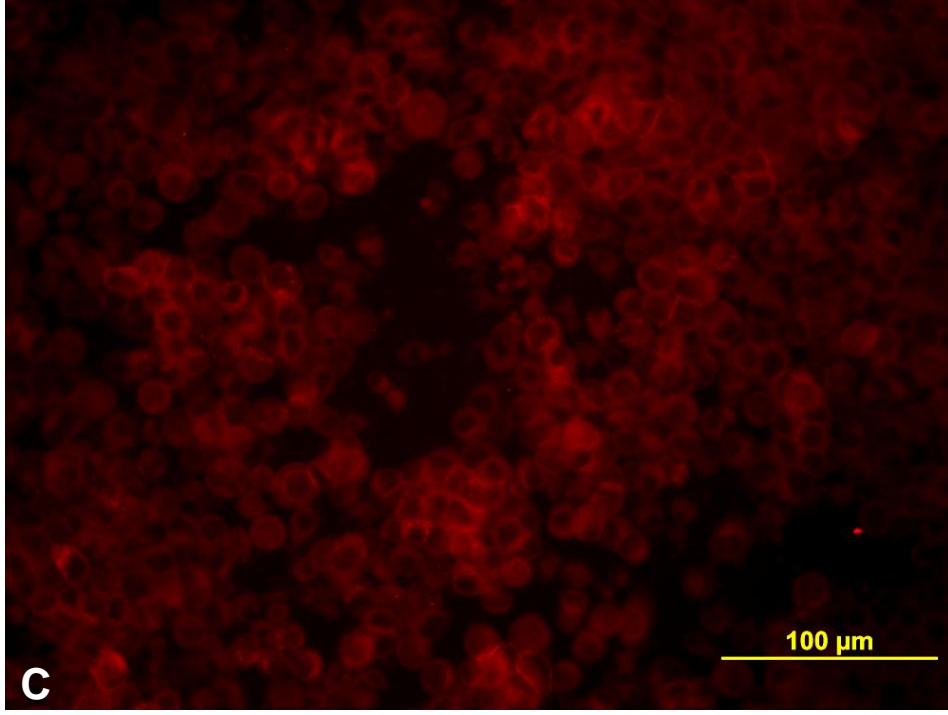
Hiperisin uygulaması ve ışımayı takiben HT-29 hücrelerindeki disaderin ifadesi immünfloresan boyama ile tespit edilmiş ve floresan mikroskopta incelenmiştir. Hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra Şekil 4.35'de kontrol ve 0,04 μM hiperisin gruplarında hücre zarında disaderinin immünfloresan boyanması görülürken, 0,08 μM hiperisin grubunda boyanma azalmış, 0,15 μM hiperisin grubunda boyanma olmamıştır.

Şekil 4.36'da ise aktivasyondan 24 saat sonra kontrol grubunda hücre zarında gözlenen disaderin boyanmasının 0,04 μM hiperisin grubunda azaldığı; 0,08 μM ve 0,15 μM hiperisin gruplarında ise hücre zarının bir bütün olarak boyanmadığı görülmüştür.

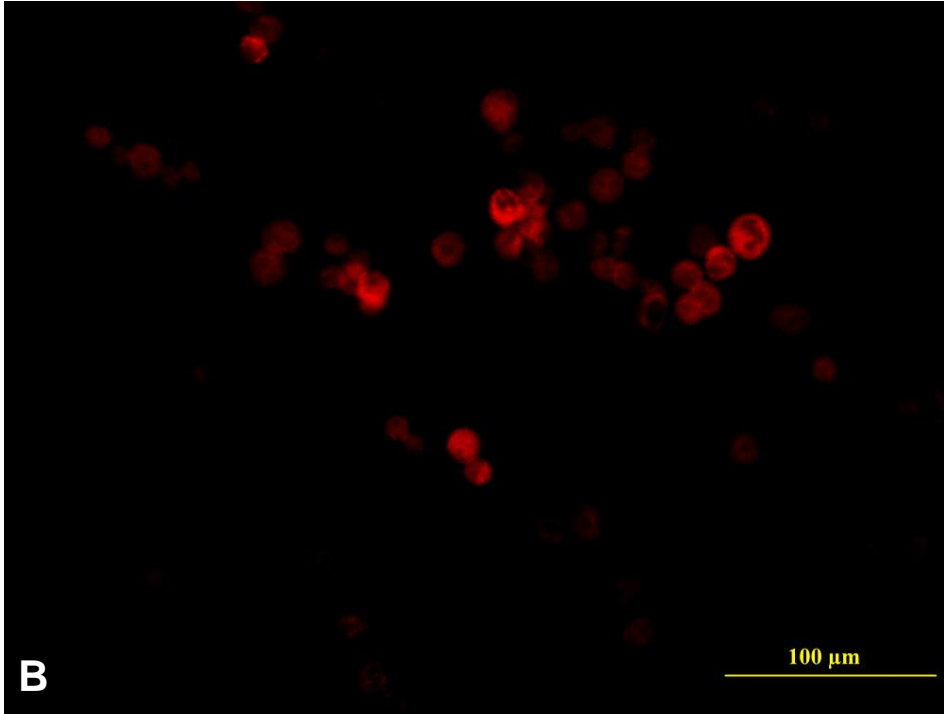
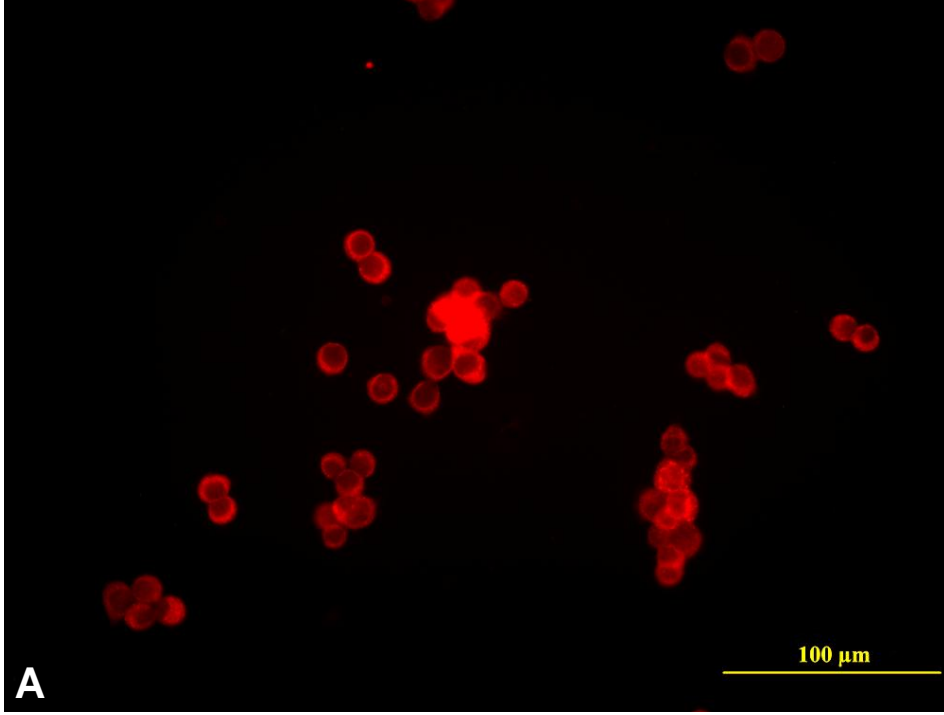
Caco-2 hücrelerinde hiperisinin aktivasyonundan 16 saat (Şekil 4.37) ve 24 saat (Şekil 4.38) sonra disaderin immünfloresan boyaması yapılmış ve inverted mikroskopta incelenmiştir. Her iki inkübasyon süresinin sonunda kontrol grubunda hücre zarında görülen disaderin ifadesinin hiperisin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak azaldığı görülmüştür. 0,08 μM ve 0,15 μM hiperisin gruplarında bazı hücrelerde boyanma görülse de özellikle aktivasyondan 16 saat sonra hücre zarı bir bütün olarak boyanmadığı, zarda bazı bölgelerde yer yer boyanma olduğu görülmüştür.



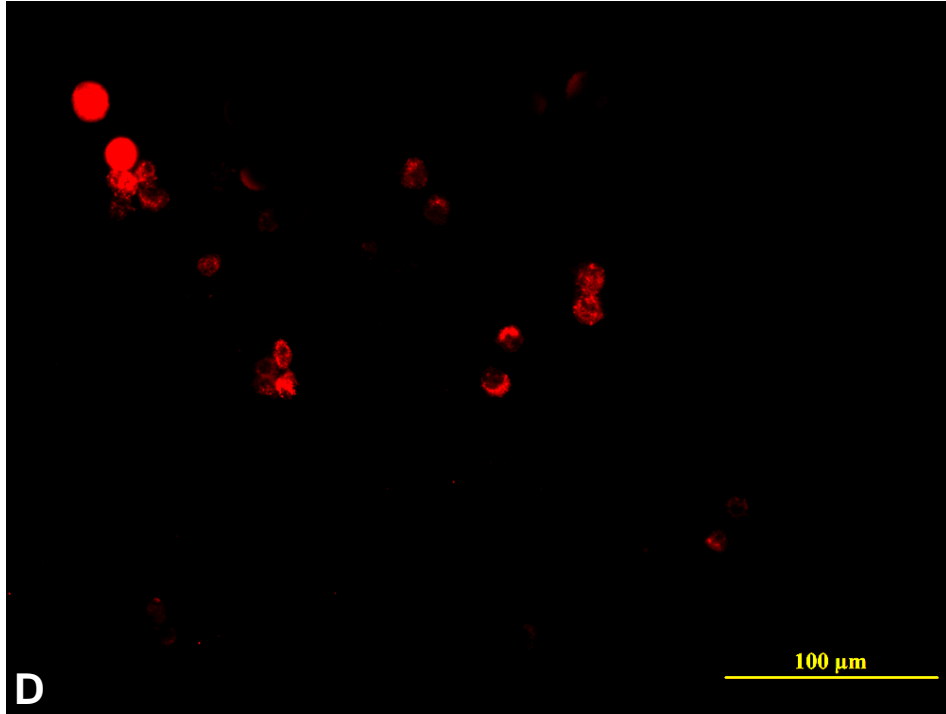
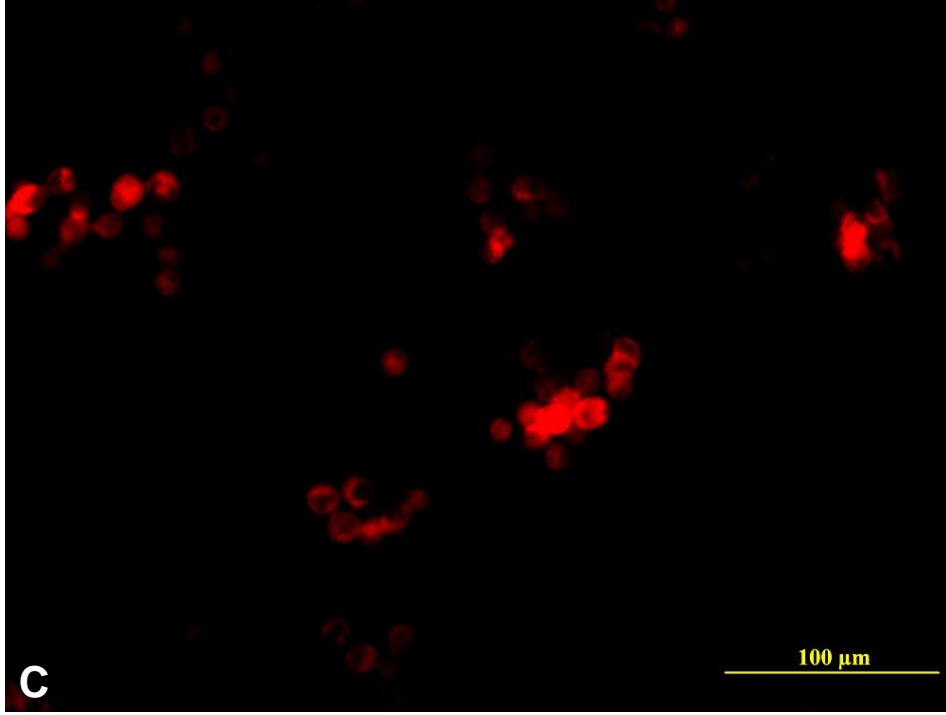
Şekil 4.35. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu.



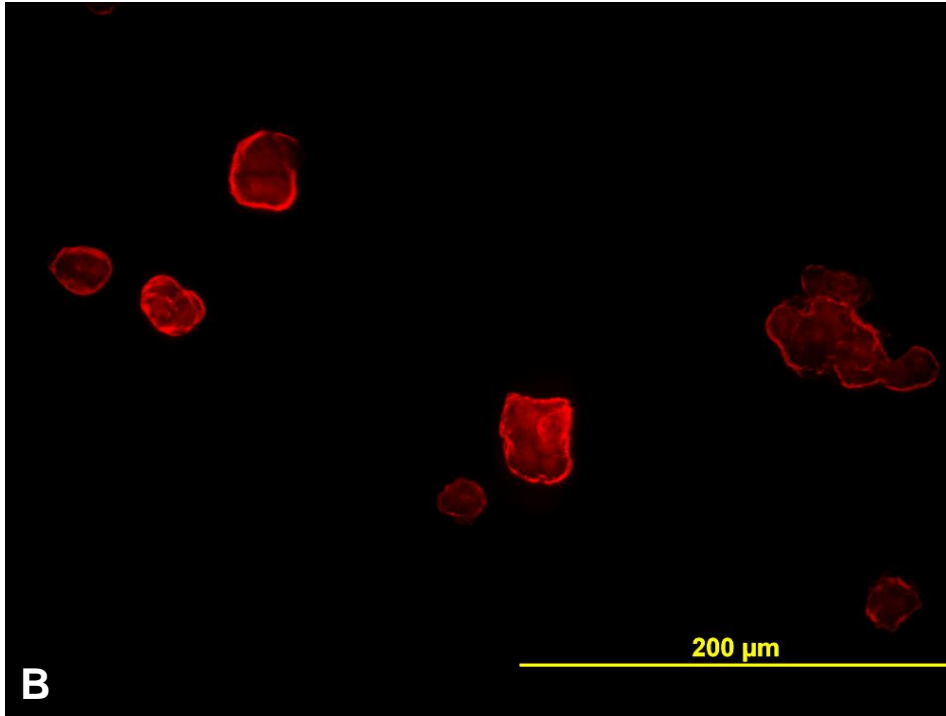
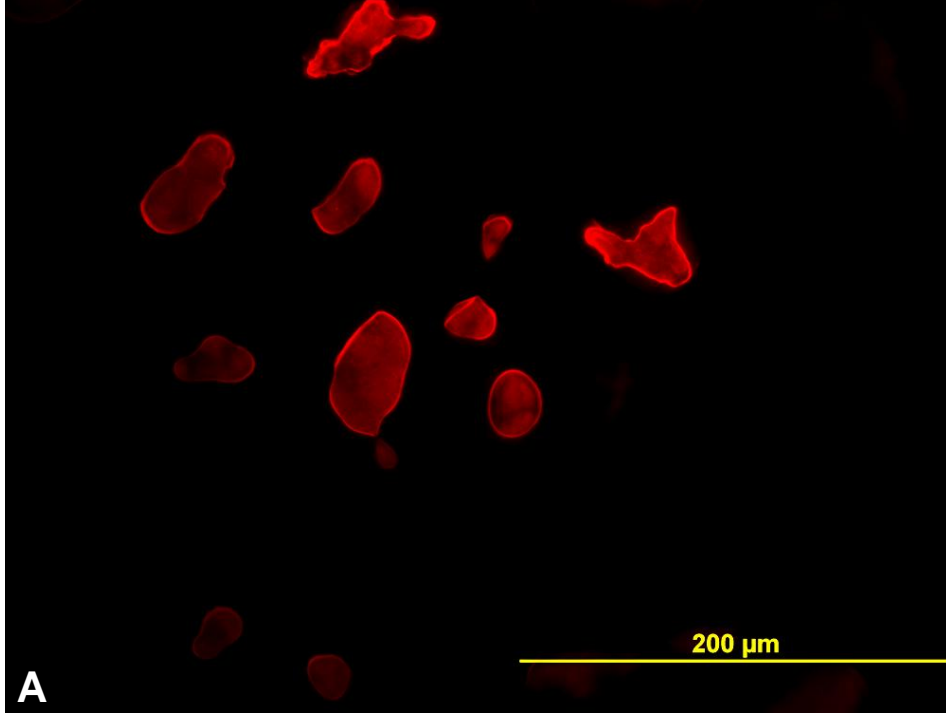
Şekil 4.35. (devam ediyor) HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 µM hiperisin D. 0,15 µM hiperisin grubu.



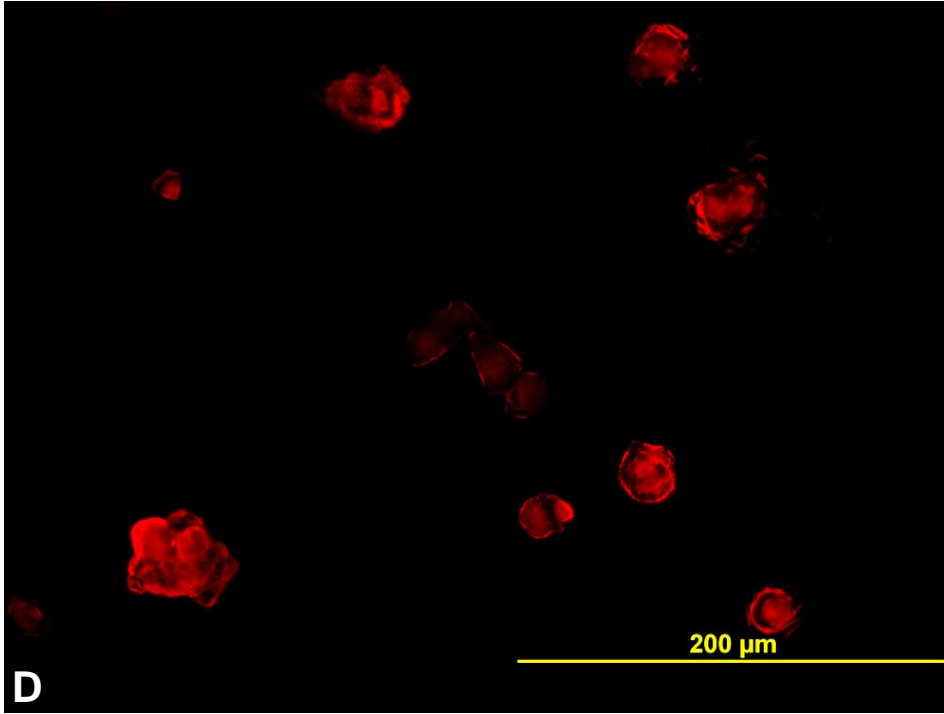
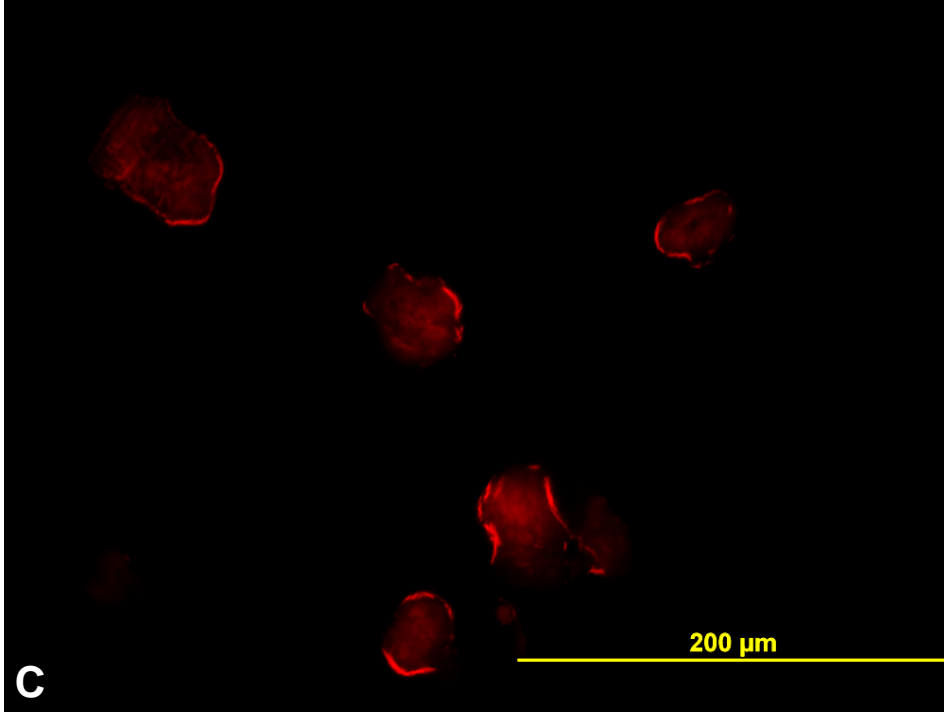
Şekil 4.36. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 μM hiperisin grubu.



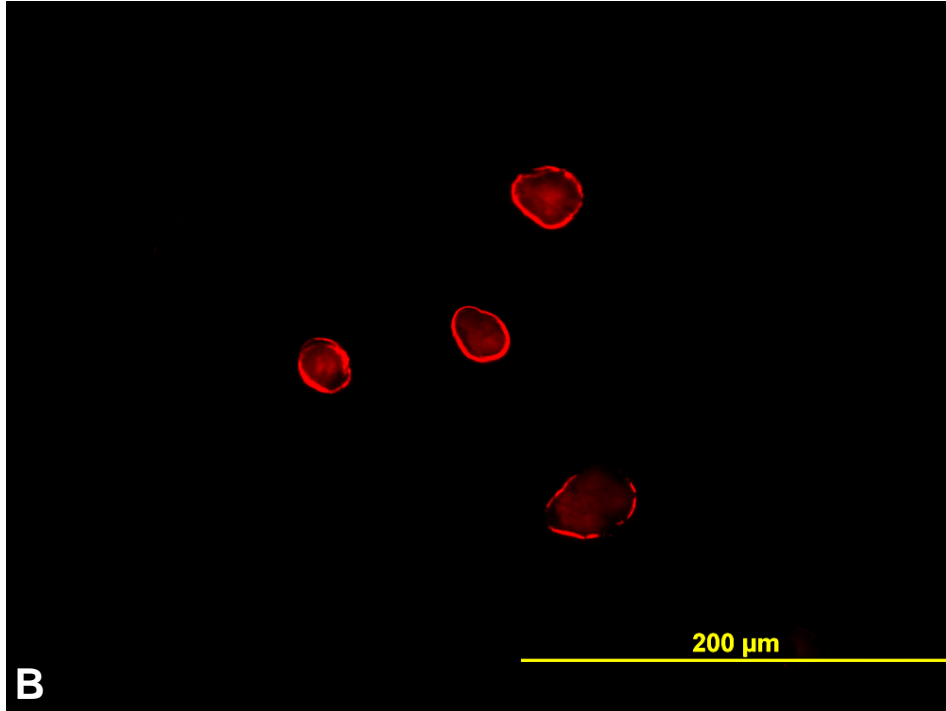
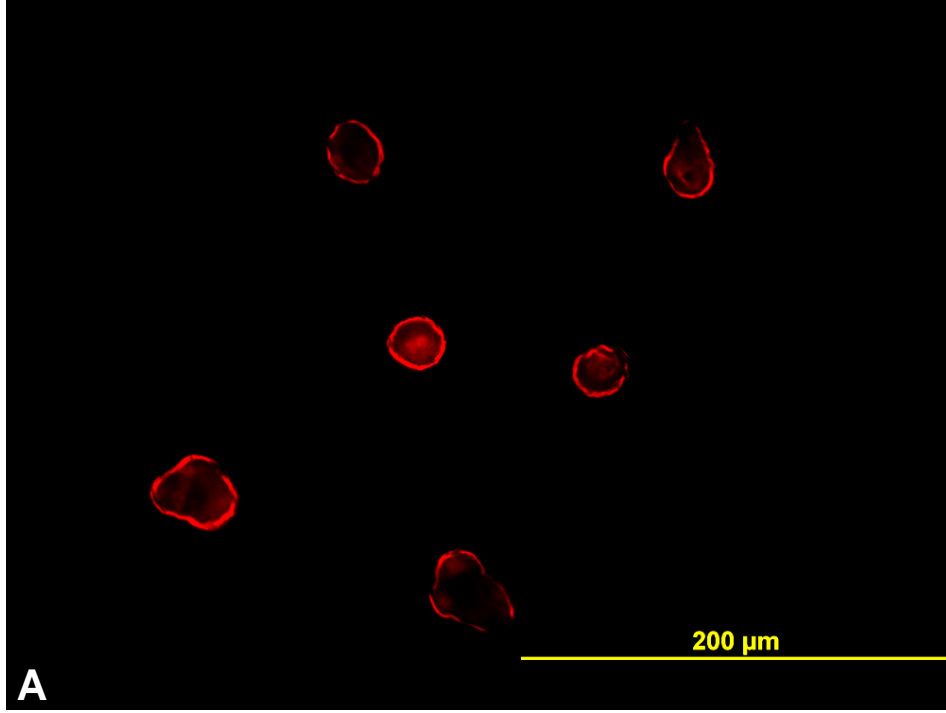
Şekil 4.36. (devam ediyor) HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 μM hiperisin D. 0,15 μM hiperisin grubu.



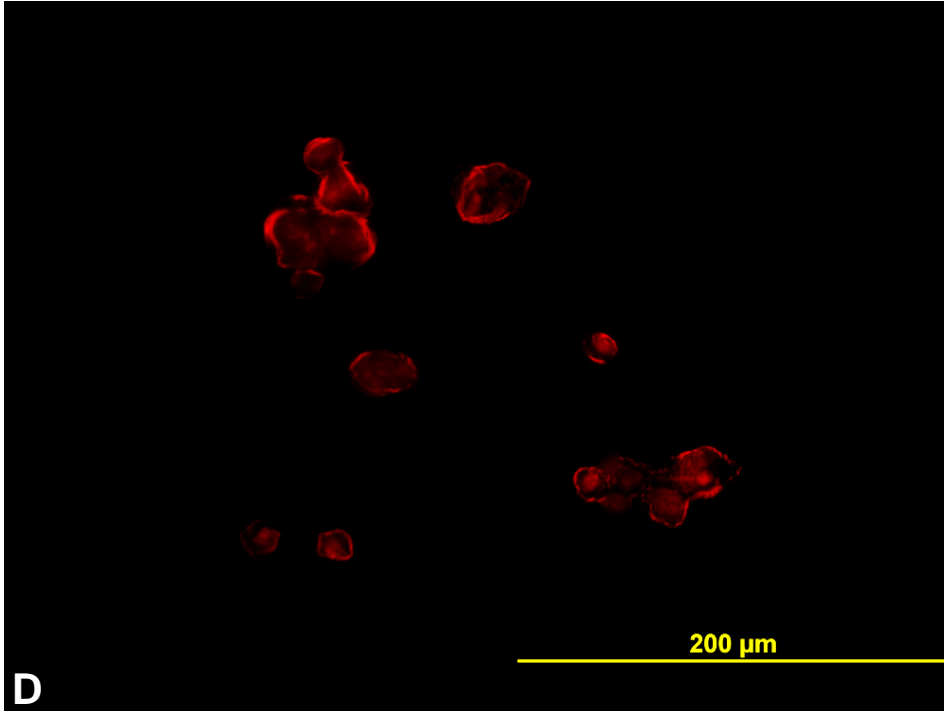
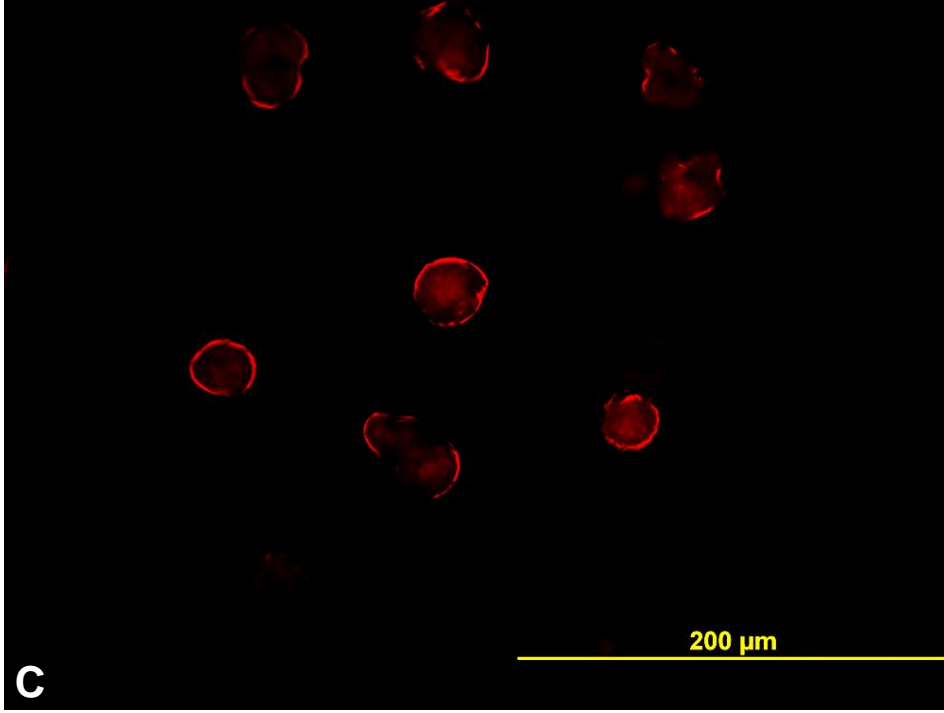
Şekil 4.37. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 μM grubu.



Şekil 4.37. (devam ediyor) Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 µM hiperisin D. 0,15 µM hiperisin grubu.



Şekil 4.38. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu.

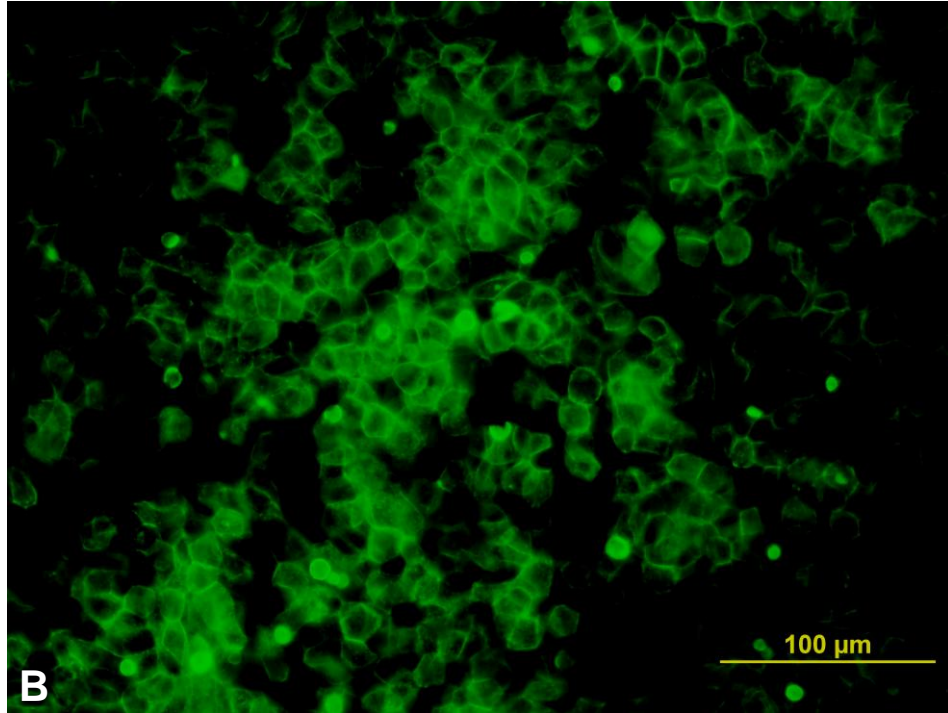
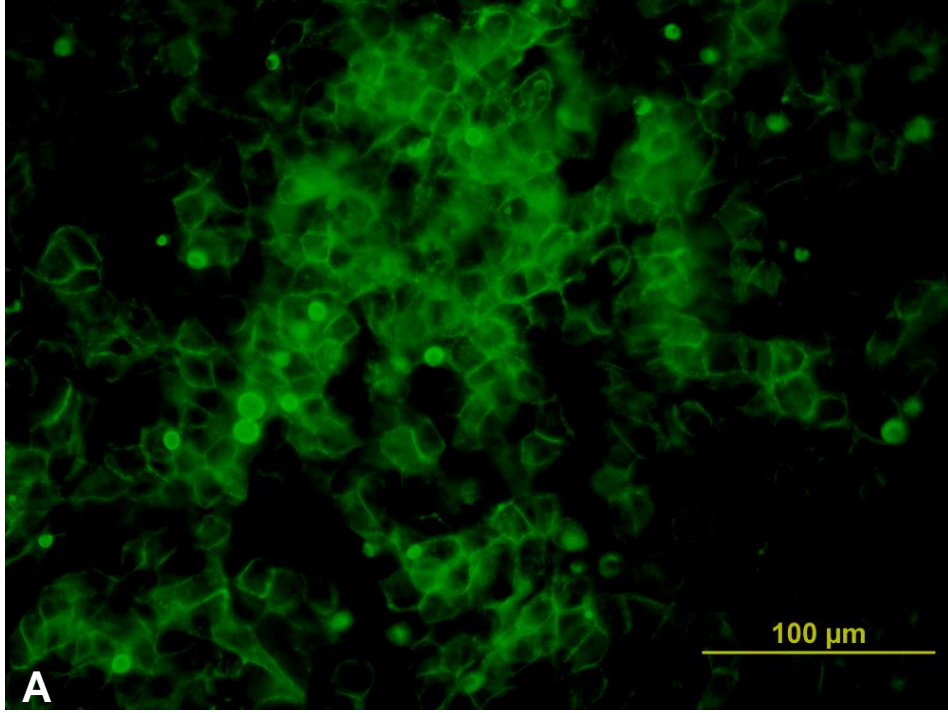


Şekil 4.38. (devam ediyor) Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra disaderinin immünfloresan (kırmızı) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 μM hiperisin D. 0,15 μM hiperisin grubu.

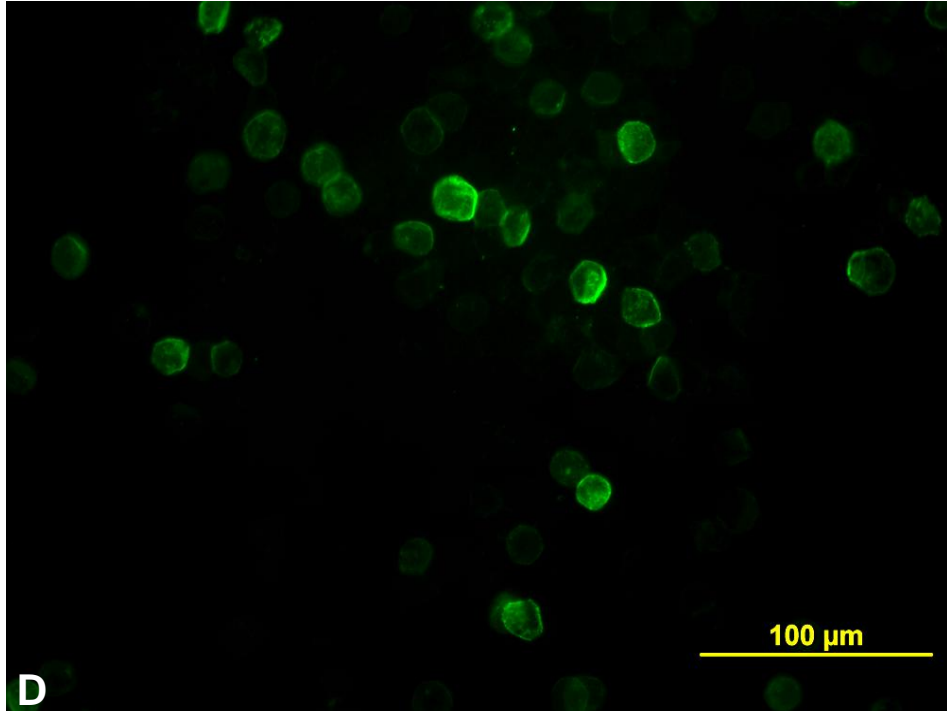
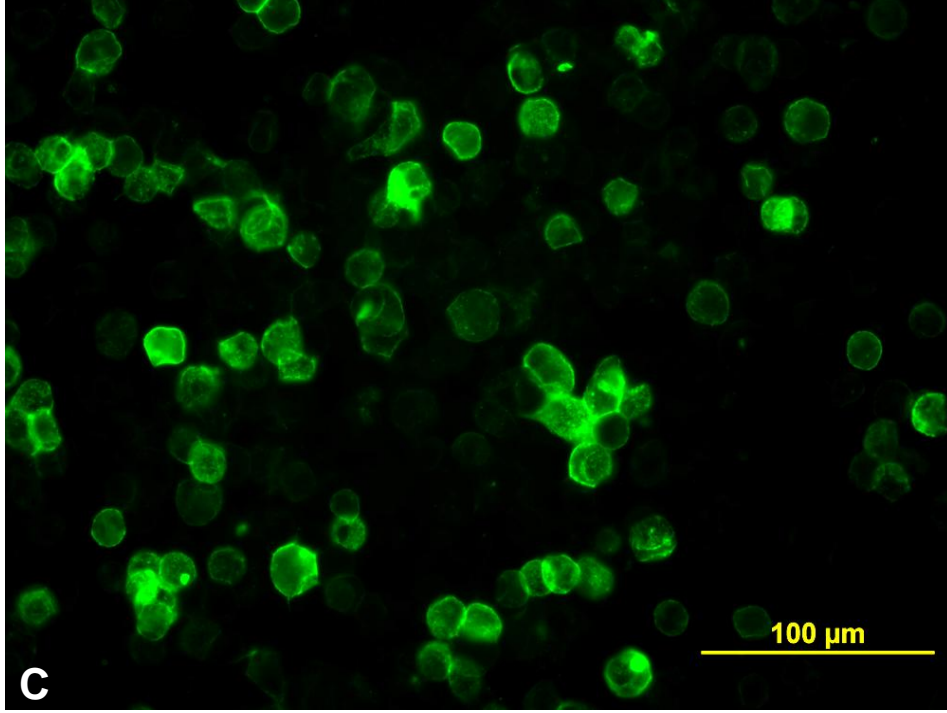
HT-29 hücreleri, F-aktin dağılımı açısından karşılaştırılmak üzere, hiperisin aktivasyonundan 16 saat (Şekil 4.39) ve 24 saat (Şekil 4.40) sonra FITC işaretli phallatoksin (yeşil) ile boyanarak floresan mikroskopta incelenmiştir. Kontrol grubunda hücre zarının altında (kortikal) yoğun aktin filamentleri ağı ve sitoplazmada düzenli yerleşim gösteren aktin stres fibrilleri görülmektedir. Aktivasyondan 16 saat sonra 0,04 μM , 0,08 μM ve 0,15 μM hiperisin uygulama gruplarında kortikal aktin boyanmaları görülürken, stres fibrillerinde azalma olduğu gözlenmiştir.

Hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra kontrol grubuna göre hiperisin uygulama gruplarında azalan stres fibrillerinin yanı sıra sitoplazmada aktin agregatları (topakları) görülmüştür.

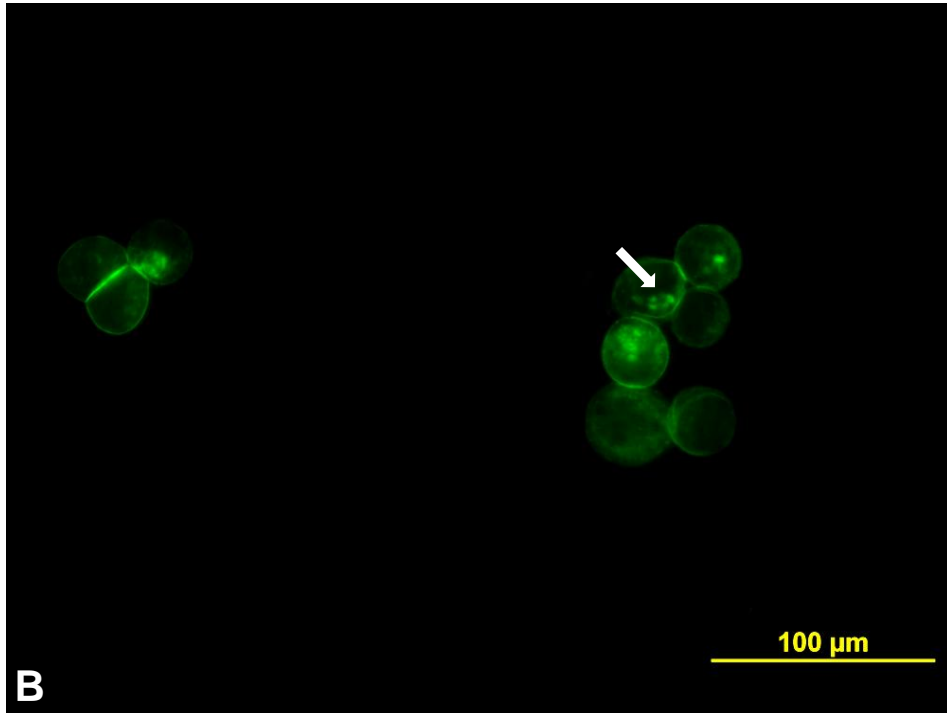
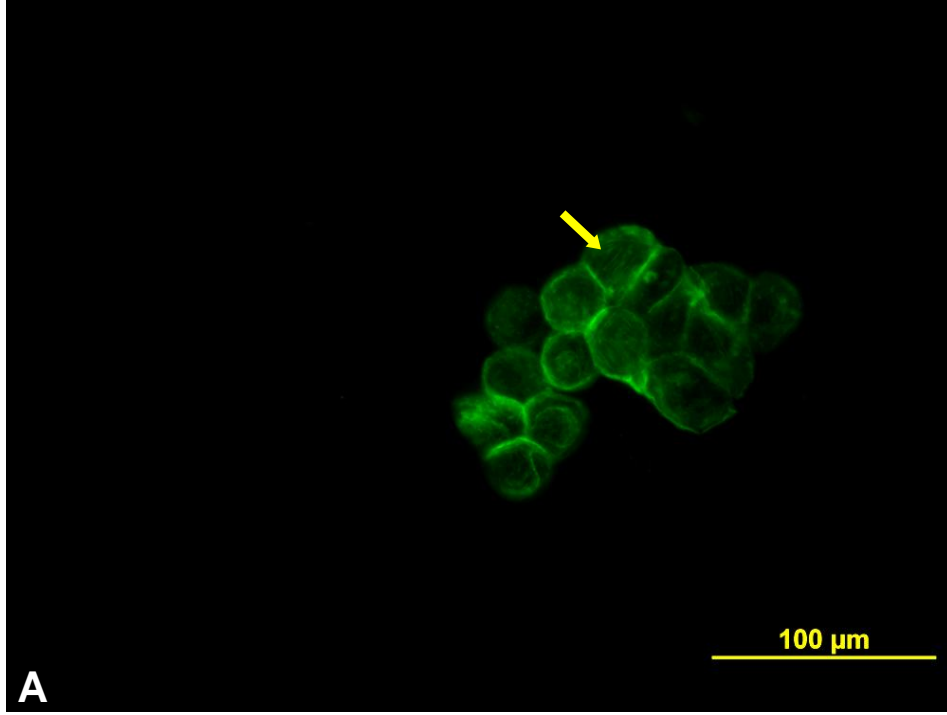
Caco-2 hücrelerinde FITC (yeşil) işaretli phallotoksin ile yapılan F-aktin boyanmaları hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra için Şekil 4.41'de, 24 saat sonra için Şekil 4.42'de verilmiştir. Her iki inkübasyon süresi için de kontrol grubunda hem hücre zarının altında hem de sitoplazmada yoğun aktin filament ağı görülmektedir. Ancak F-aktin boyanmaları, 0,04 μM ve 0,08 μM hiperisin uygulama gruplarında azalmış; 0,15 μM hiperisin uygulama grubunda ise özellikle sitoplazmada hiç boyanma olmamıştır. Ayrıca, aktivasyondan 16 saat sonra özellikle 0,15 μM hiperisin grubunda sitoplazmada aktin agregatlarının olduğu görülmüştür.





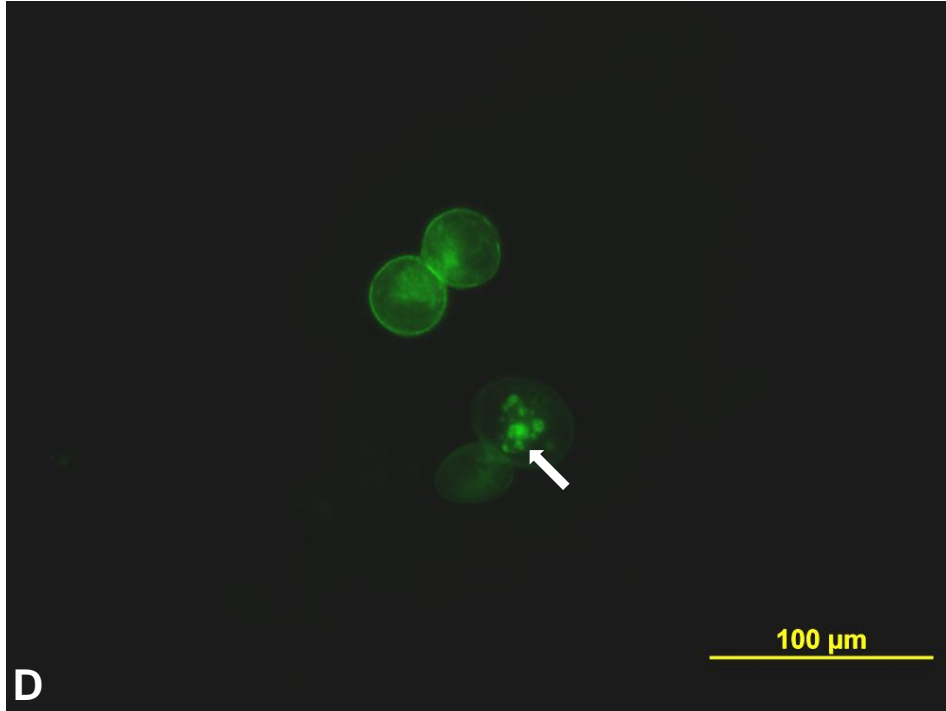
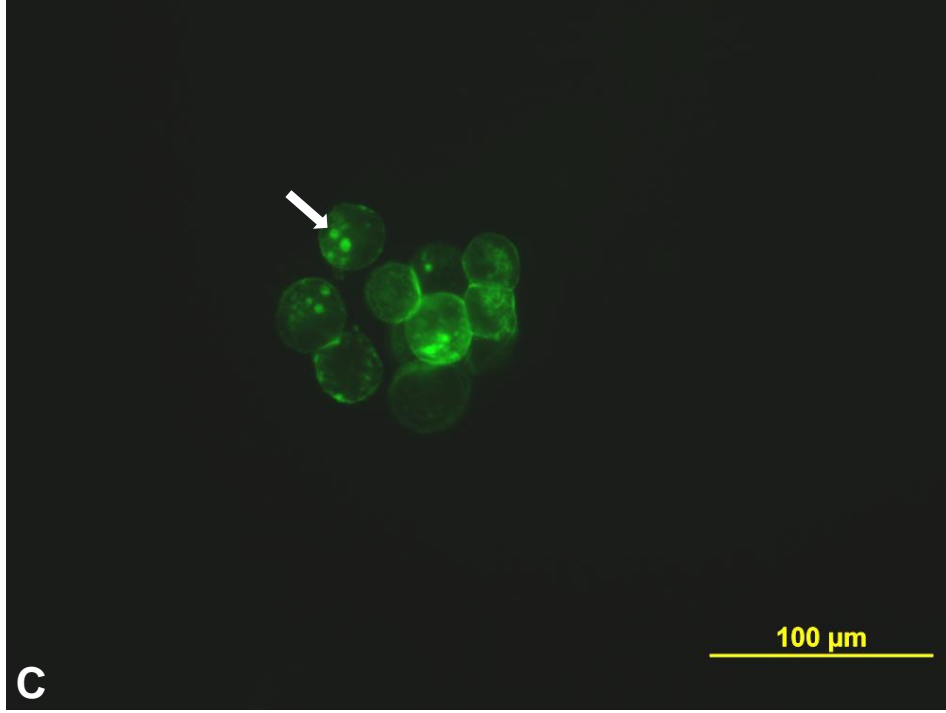
Şekil 4.39. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu.



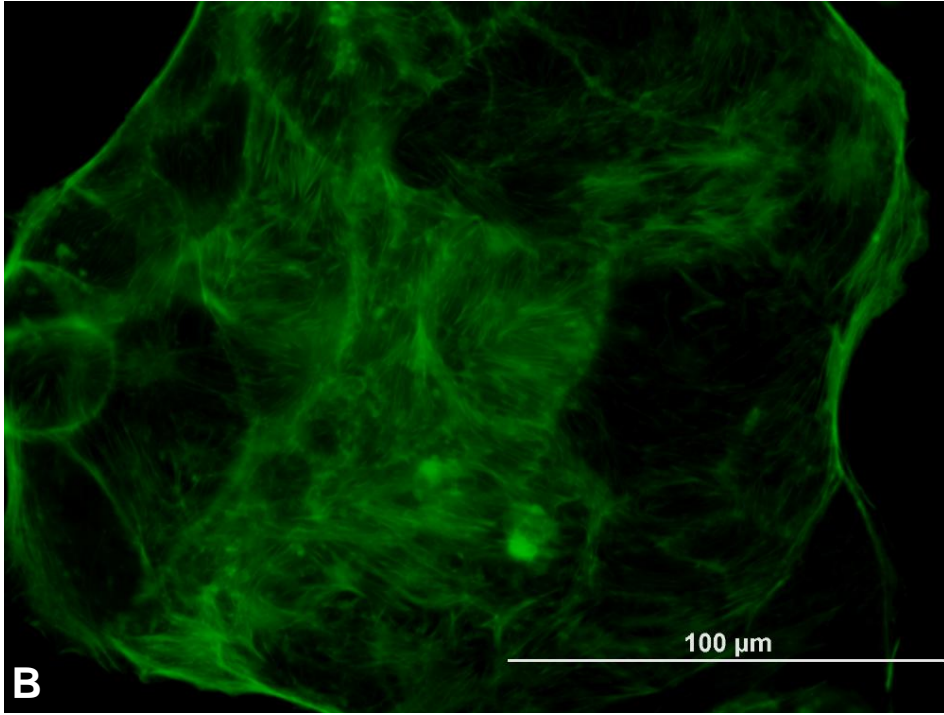
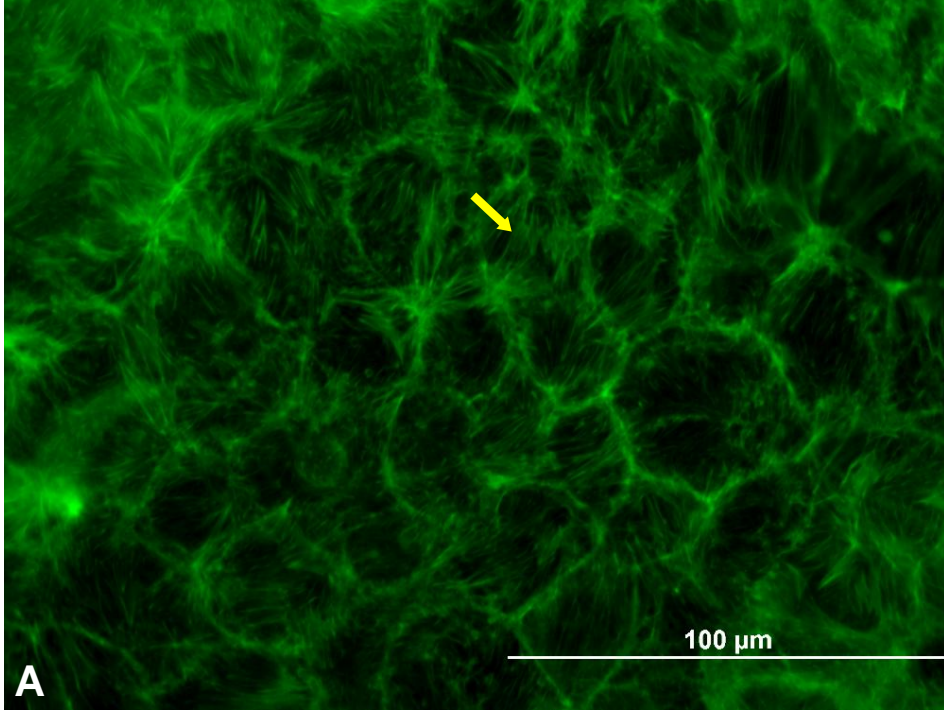
Şekil 4.39. (*devam ediyor*) HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 μM hiperisin D. 0,15 μM hiperisin grubu.



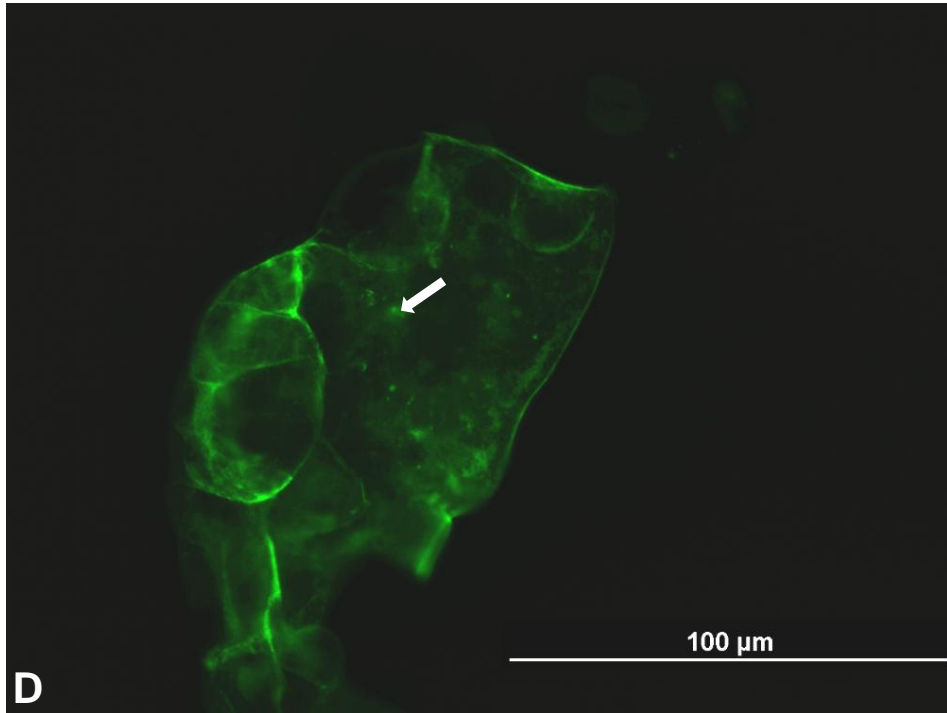
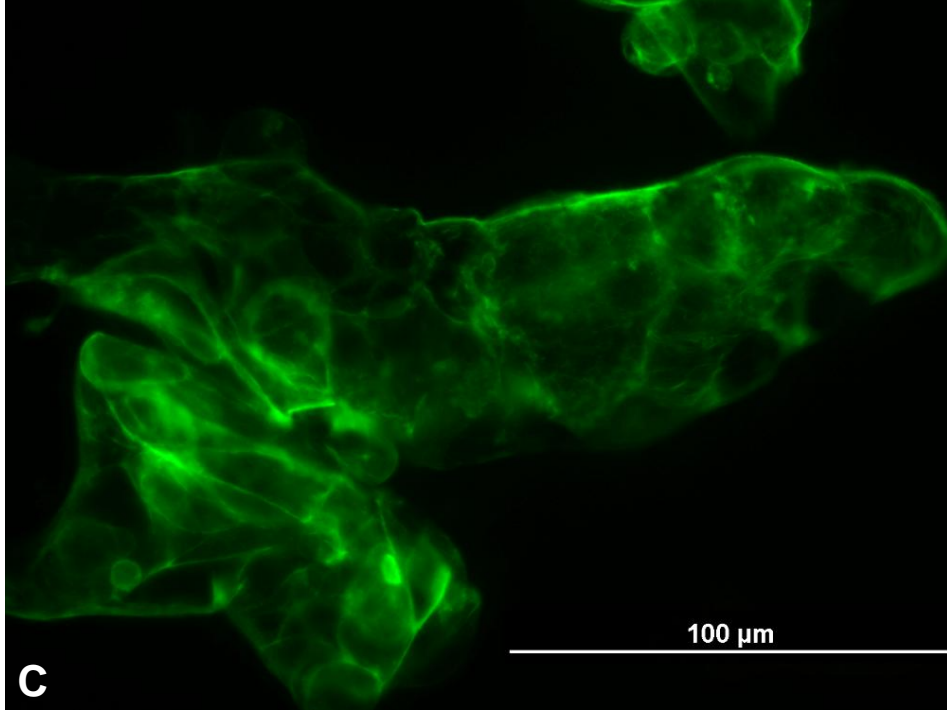
Şekil 4.40. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 μM hiperisin grubu, ( aktin stres fibrilleri,  aktin agregatı).



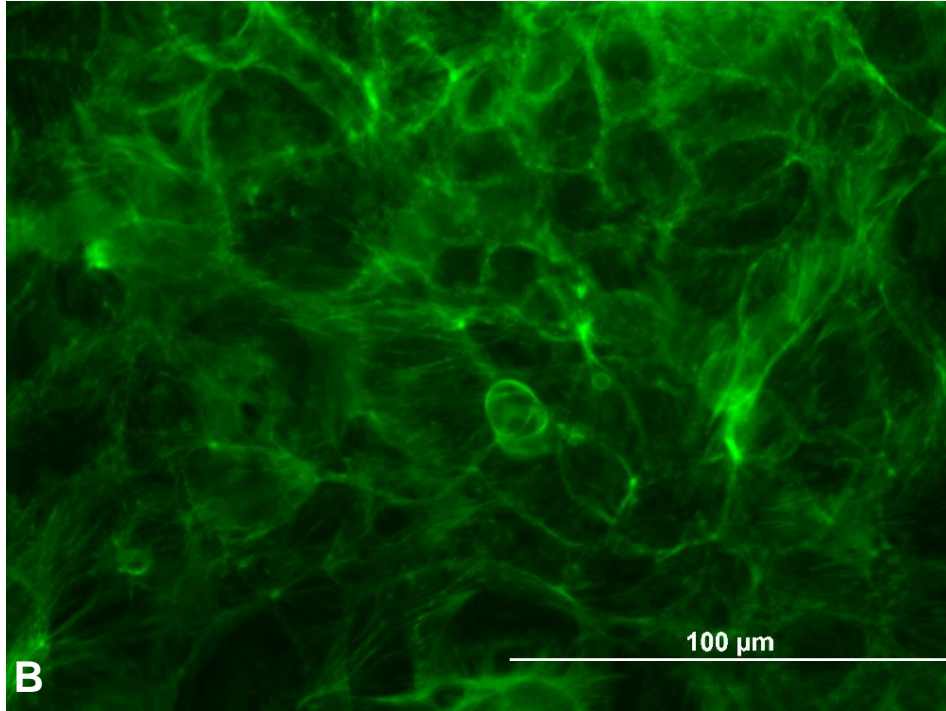
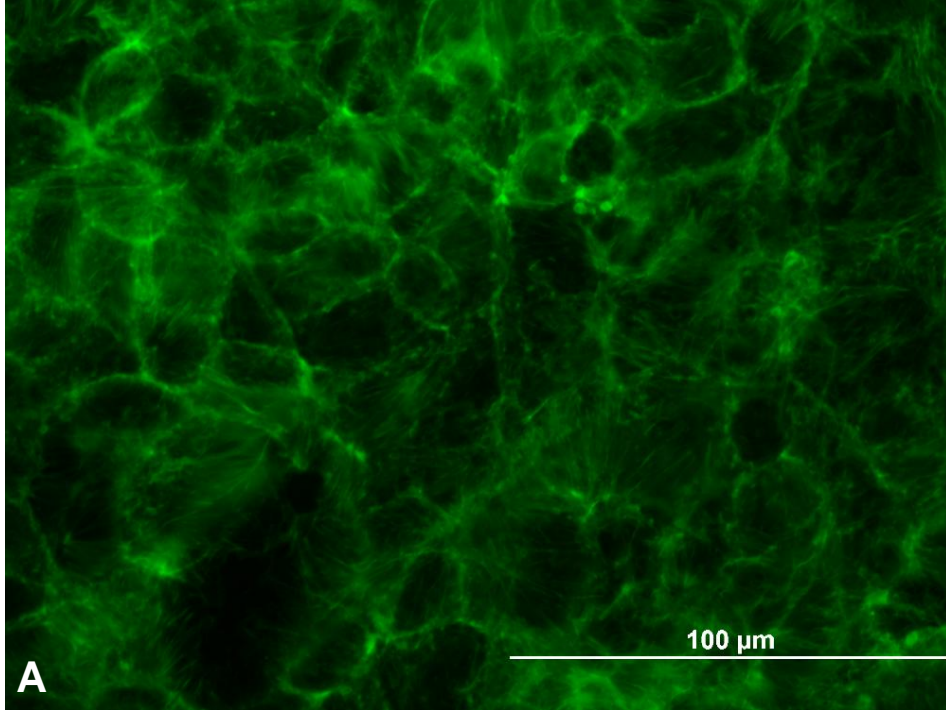
Şekil 4.40. (devam ediyor) HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 μM hiperisin D. 0,15 μM hiperisin grubu, (⇐⇒ aktin agregatı).



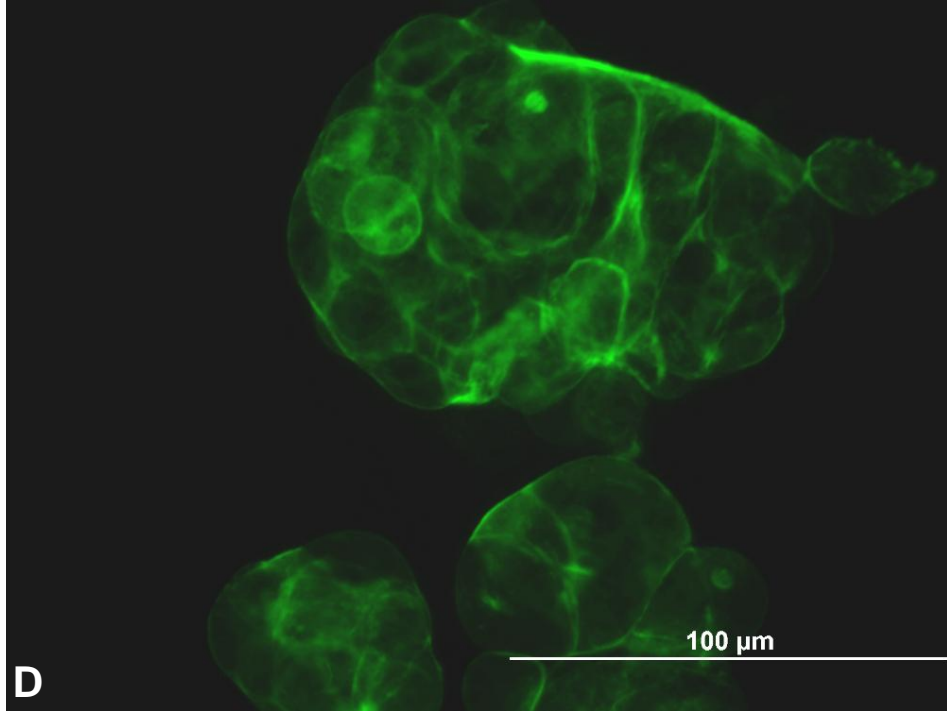
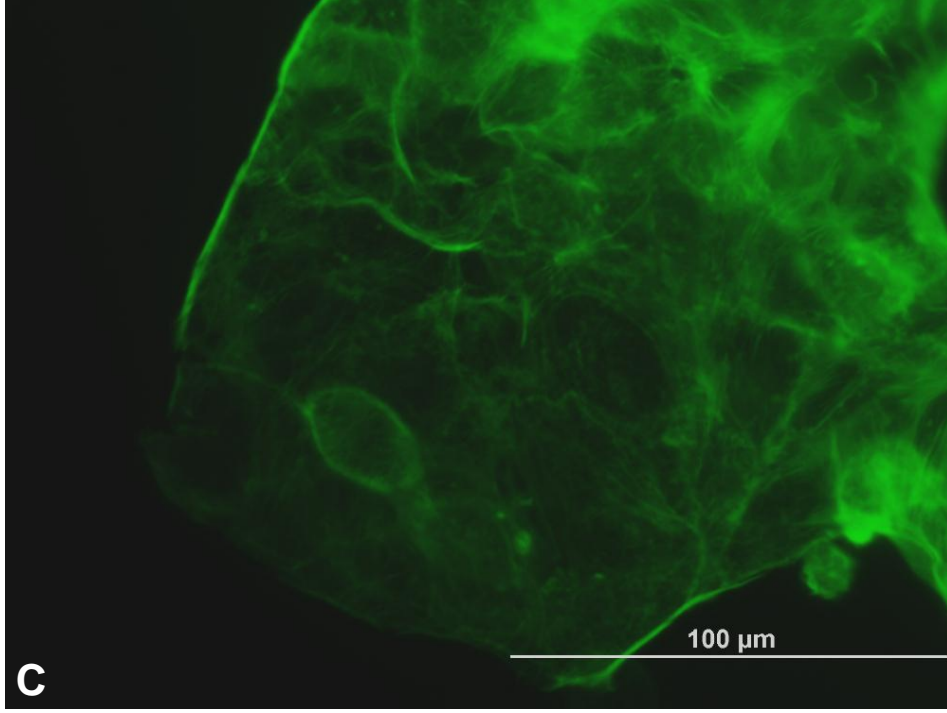
Şekil 4.41. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 µM hiperisin grubu (→ aktin stres fibrilleri).



Şekil 4.41. (devam ediyor) Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 µM hiperisin D. 0,15 µM hiperisin grubu, (\Rightarrow aktin agregatı).



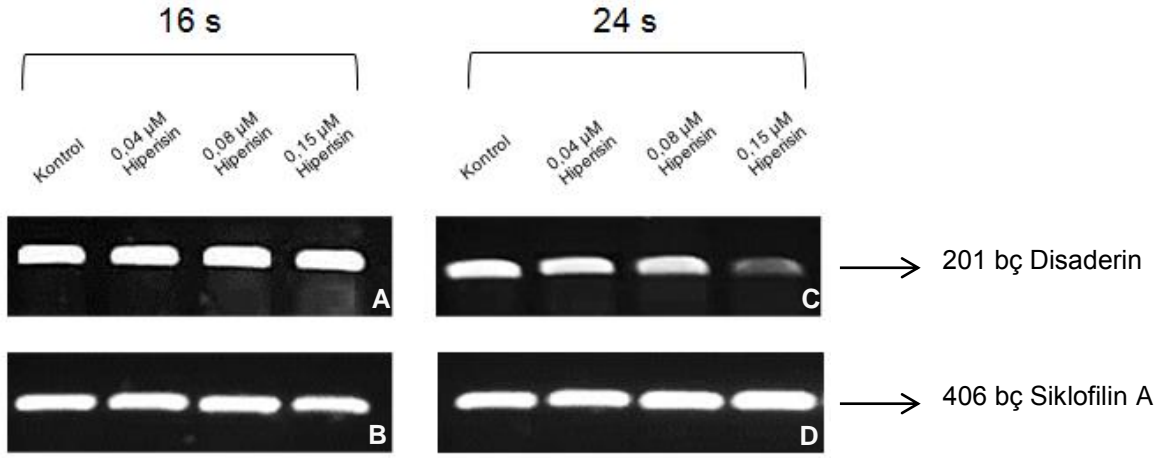
Şekil 4.42. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. A. Kontrol, B. 0,04 μM hiperisin grubu.



Şekil. 4.42. (devam ediyor) Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra F-aktinin immünfloresan (yeşil) boyamasının inverted mikroskop görüntüsü. C. 0,08 µM hiperisin D. 0,15 µM hiperisin grubu.

4.13. Disaderin İfadesinin RT-PZR ile Ölçülmesi

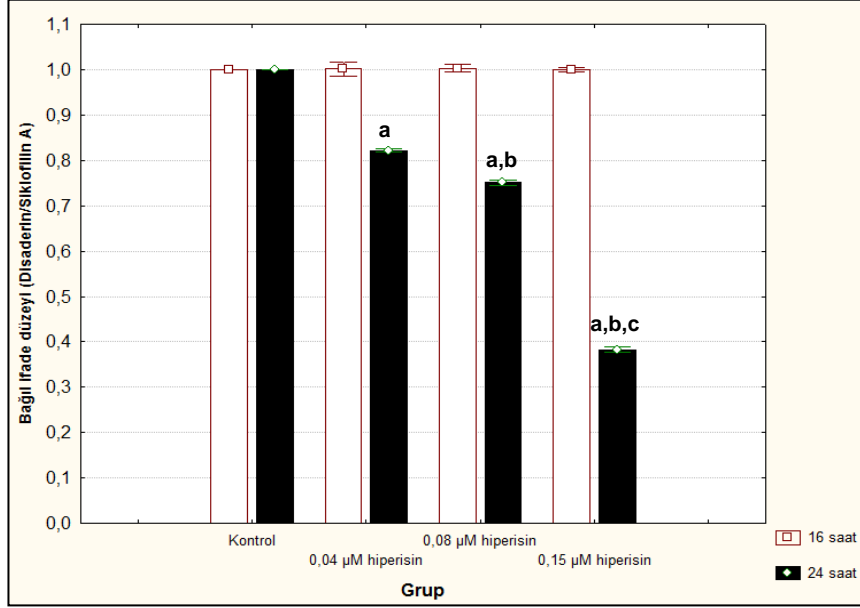
HT-29 hücrelerinden elde edilen cDNA'larda disaderin ve siklofilin A genleri için yapılan RT-PZR sonucunda elde edilen bantları gösteren agaroz jel görüntüleri Şekil 4.43'te, disaderin bağıl ifade düzeylerine göre çizilen grafik ise Şekil 4.44'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre, hiperisin aktivasyonundan 16 ve 24 saat sonra kontrol gen olan siklofilin A ifadesi açısından gruplar arasında fark gözlenmezken, aktivasyondan 24 saat sonra disaderin ifadesi 0,15 μ M hiperisin grubunda önemli ölçüde azalmıştır.



Şekil 4.43. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat sonra A. Disaderin, B. Siklofilin A ve 24 saat sonra C. Disaderin, D. Siklofilin A genlerine ait bantların % 2 agaroz jel görüntüsü.

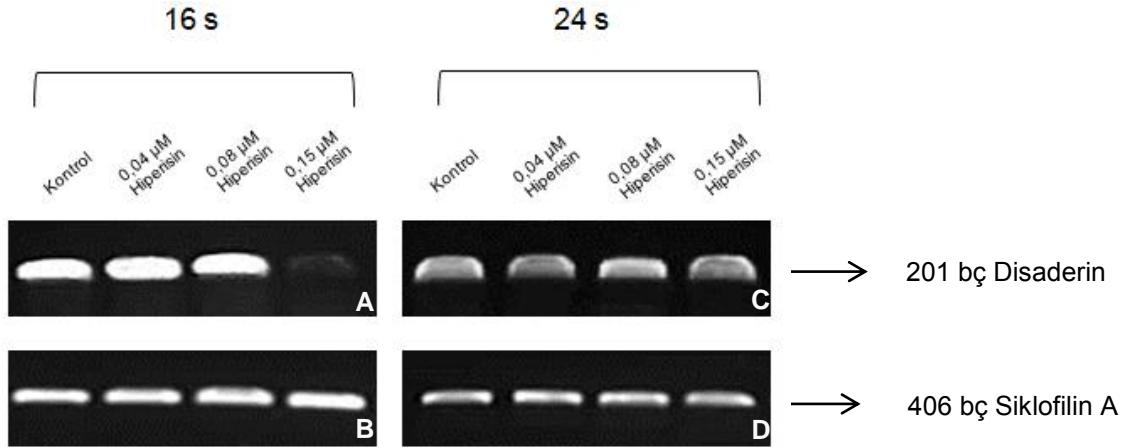
Yapılan üç tekrar sonucu çizilen bağıl disaderin ifadesi grafiğine göre, aktivasyondan 16 saat sonra kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında ifade düzeyleri değişmemiştir. Ancak, aktivasyondan 24 saat sonra hiperisin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak uygulama gruplarında disaderinin bağıl ifadesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede azalma olmuştur ($P=0,0002$). Ayrıca 0,08 μ M ($P= 0,043$) ve 0,15 μ M ($P=0,0002$) hiperisin grubundaki azalma, düşük doz grubuna göre istatistiksel açıdan önemli derecede farklı bulunmuştur.

Caco-2 hücrelerinde disaderin ve siklofilin A genleri için yapılan RT-PZR sonucunda elde edilen bantları gösteren agaroz jel görüntüleri Şekil 4.45'te, disaderin bağıl ifade düzeylerine göre çizilen grafik ise Şekil 4.46'te verilmiştir.



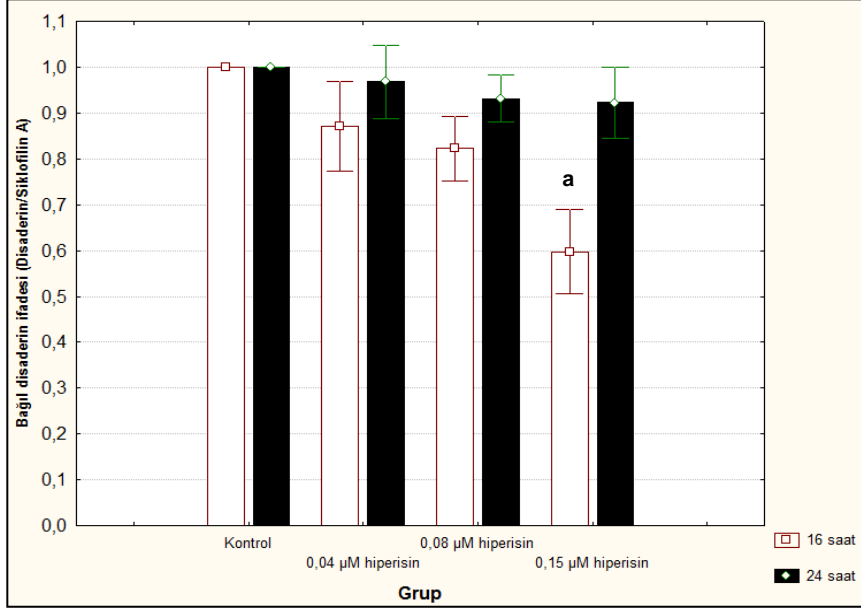
- a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P \leq 0,001$).
b: 0,04 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P \leq 0,05$).
c: 0,08 µM hiperisin grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P \leq 0,05$).

Şekil 4.44. HT-29 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 ve 24 saat sonra disaderin bağıl ifade düzeyleri.



Şekil 4.45. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 saat sonra A. Disaderin, B. Siklofilin A ve 24 saat sonra C. Disaderin, D. Siklofilin A genlerine ait bantların % 2 agaroz jel görüntüsü.

Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 ve 24 saat sonra disaderin bağıl ifadesi siklofilin A'ya oranlanarak hesaplanmıştır. Aktivasyondan 16 saat sonra 0,15 µM hiperisin grubuna ait disaderin bağıl ifadesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede azalma olmuştur ($P=0,03$). Ancak, aktivasyondan 24 saat sonra disaderin bağıl ifadesi kontrol ve uygulama grupları arasında değişmemiştir.



^a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır ($P \leq 0,05$).

Şekil 4.46. Caco-2 hücrelerinde kontrol ve hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 16 ve 24 saat sonra disadlerin bağıl ifade düzeyleri.

5. TARTIŞMA

Tümör tedavisi, kanser hastasını iyileştirmenin yanı sıra hastanın yaşam uzunluğunu ve kalitesini arttırmayı da amaçlamaktadır. Bazı yaygın kanser türlerinden olan göğüs, serviks ve kolon kanserleri, erken teşhis ile ve doğru şekilde tedavi edildiğinde yüksek iyileşme oranına sahiptir. Temel tedavi metotları ameliyat, radyoterapi ve kemoterapidir. Görüntüleme teknolojileri (ultrason, endoskopi, radyografi) ve laboratuvar (patoloji) araştırmaları sayesinde doğru teşhis yapılması, doğru tedavi şeklini belirlemede önemli olmaktadır (Salvador, 2008). Geleneksel kanser tedavi yöntemleri hasta dokuyu ortadan kaldırma ve etrafındaki sağlıklı hücreleri ayırabilme konusunda yetersiz kalmaktadır. Bu yöntemler, özgül olmayan sitotoksik özellikleri sonucunda normal hücre işlevlerinin kaybıyla sonuçlanan ciddi yan etkilere sahiptir. Sonuç olarak, son yıllarda sadece hastalıklı dokuyu hedef alan daha özgül yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara odaklanılmıştır.

Fotodinamik terapi (PDT), görünür ışık ve ışık duyarlı maddenin (IDM) dahil olduğu, ümit veren yeni bir kanser tedavi yöntemidir. PDT'de kullanılan her bir öge kendi başına zararsızken, oksijenle birleştiğinde letal sitotoksik ajanlar üreterek tümör hücrelerini inaktive edebilmektedir. Bu durum, aynı anda IDM, ışık ve oksijene maruz kalan hastalıklı dokuda sitotoksikiteyle sonuçlanan önemli bir seçiciliği sağlamaktadır. PDT'nin ikili seçiciliği, IDM tercihen kanserli doku tarafından alınması ve ışığın sadece istenen bölgeye gönderilmesiyle, IDM'nin sadece hasta dokuda aktive olmasını sağlamasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle PDT'de sağlıklı hücreler zarar görmemektedir (Sharman et al., 1999).

PDT'nin hücre canlılığı üzerindeki etkileri son yıllarda daha detaylı incelenmektedir. Amerika, Asya ve Avrupa'nın birçok ülkesinde PDT'nin kanser tedavisindeki klinik uygulamalarına onay verilmesinden sonra, yeni IDM üretme arayışları hız kazanmıştır. PDT uygulanabilirliğinin kolaylığı, kanser tedavisindeki olumlu sonuçları, yan etkilerinin yok denecek kadar az oluşu ve hasta memnuniyeti ile kemoterapi, radyoterapi ve cerrahiye destek veya alternatif olabilecek bir tedavi yöntemi olduğu düşünülmektedir. Tümör dokusunun düşük yoğunluklu protein reseptör artışı, pH'ın azalması, makrofaj varlığı gibi özellikleri nedeniyle IDM tercihen tümörlü bölgede birirmektedir (Dougherty et al., 1998).

Kolon kanseri Kuzey Amerika ve Avrupa'da en yaygın kötü huylu tümörlerden biridir. Türkiye'de kolorektal kanser erkeklerde beşinci, kadınlarda ise ikinci sırada en sık rastlanan kanserdir (IARC, 2008). Diğer tümörler gibi kolon kanserinin oluşması ve gelişmesi çoklu gen değişikliklerini içeren çok basamaklı bir olaydır. Tümör hücrelerinin malignant özelliği, hücre adezyon moleküllerinin önemli işlev gördüğü adeziv sistemin azalması veya kaybına bağlı olan 3 karakteristik özellik taşımaktadır: kontrolsüz çoğalma, lokal infiltrasyon ve metastaz (Ren and Huo, 2010).

Brink ve arkadaşları (2003), kolorektal kanser gelişmesini genetik değişikliklerin birikimiyle karakterize olan çok basamaklı bir olay olarak tanımlamıştır. Ayrıca adenom oluşumunda APC geninin ve orta dereceli adenomun karsinoma dönüşümünde ise K-ras onkogeninin olaya karıştığı bilinmektedir. Kolon kanseri, erken aşamada epitelde hiperproliferasyon sonucunda adenom oluşumuyla karakterize edilmektedir. Bu durum hücre döngüsünde yanlış düzenlenmeler ve/veya baskılanmış apoptozun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır.

Kanser önleyici ve tedavi edici ilaçların değerlendirilmesinde ilk olarak insan kanser hücre hatlarında ön çalışma yapılmakta, ilaçlar daha sonra hayvan modellerinde test edilmektedir. İnsan kanser hücre hatları, kanser hücrelerinin büyüme kontrolünde kendi kendine yetebilme, büyümeyi engelleyici ajanlara duyarsız olma, kontrol noktalarından kaçabilme (apoptoz), genetik kararsızlık, yayılabilirlik gibi ayırt edici özelliklerini taşımaktadır (Sivagami et al., 2012).

Yapılan bu çalışmada, derece-1 HT-29 ve derece-2 Caco-2 kolon adenokarsinom hücrelerinde hiperisin aracılı PDT'nin etki mekanizması, sitotoksik testi, metabolik aktivasyon testleri, immünfloresan boyamalar ve RNA düzeyinde moleküler yöntemler kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır.

In vitro koşullarda yapılan çalışmalar, geleneksel yöntemlere göre avantaj sağladığından yeni ilaç keşfetmede ve geliştirmede kullanışlı model bir sistem olmaktadır. Ayrıca, aynı koşullar altında çok fazla sayıda aday bileşiğin taranmasına imkan verdiği için sitotoksik veya sitostatik bileşiklerin önleyici ya da tedavi amaçlı kullanımında öneme sahiptir (Sivagami et al., 2012).

Kültür koşullarında üretilen enterositler ilaç absorblama, beslenme, biyokimyasal yolak araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bugün en yaygın kullanılan insan

bağırsak hücre hatları Caco-2, T-48 ve HT-29'dur. Bu üç hücre hattı da kolon kökenlidir. Caco-2 hücreleri kendiliğinden farklılaşabilen, tipik bağırsak villus yapısında, sıkı bağlantılara, bağırsak emilim yeteneğine ve bağırsağa özgü enzim ifadesine sahip derece-2 kanser hücreleridir (Mitchell and Ball, 2004). Ayrıca insan ince bağırsak epitelinin birçok özelliğini taşımaktadır (Hilgendorf et al., 2000). Caco-2 hücre hattında p53 proteinini kodlayan gene ait bir transkripsiyon faktörü TP53 (truncated p53) mutasyonu nedeniyle p53 protein ifadesi bulunmamaktadır (Ying and Bodmer, 2005). Caco-2 hücrelerinde çalışılan pasaj sayısı, hücre morfolojisi ve işlevselliği açısından önemli olduğundan yaptığımız bu çalışmada aynı pasaj aralığındaki (P10-P20) hücreler kullanılmıştır. Bu hücrelere ait üreme eğrisi çıkartılmış, populasyon ikilenme zamanı 30 saat olarak hesaplanmıştır. Bu zaman göz önünde bulundurularak çalışma sırasında hücrelerin pasajı yapılmıştır.

Derece-1 kolon adenokarsinom olan HT-29 hücreleri, epiteliyal morfolojiye ve adheren büyüme tipine sahip hücreleridir. HT-29 hücreleri besin alımı, çoklu ilaç direnci, lipid metabolizması çalışmalarında kullanılmaktadır (Mitchell and Ball, 2004). HT-29 hücreleri, kolon adenokarsinomu da içeren birçok kanser türünde bir onkogen olan p53 açısından mutanttır. HT-29 hücreleri, *in vivo* sistemi başarılı bir şekilde yansıttığı için *in vitro* koşullarda insan kolon kanser modeli olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Rodrigues et al., 1990). Çalışmamızda P5-P15 pasaj aralığındaki HT-29 hücreleri kullanılmış, bu hücrelerin ikilenme zamanının Caco-2 hücrelerine göre daha kısa olduğu (25 saat) görülmüştür. Bu durum iki hücre hattının farklı iki derece kolon kanseri olmasından, farklılaşma yeteneklerinden ve çoğalma potansiyelinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

APC ve p53 açısından mutant olan HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde, yabancı tip K-ras bulunmaktadır. K-ras onkogeni, kolon kanserlerinde adenomdan karsinoma dönüşümde önemlidir. Bu genin ürünü olan protein hücre zarında yerleşim göstererek mitotik sinyallerin iletilmesinde, apoptozun inhibisyonunda rol oynamaktadır (Lawson et al., 2000). Siklooksijenaz-2 (COX-2) anti-apoptotik etkisi, yayılabilirliği (invazyon) arttırması ve anjiogenezi başlatması nedeniyle kolorektal kanserin gelişmesinde önemli bir yere sahiptir. Yapılan çalışmalar COX-2 inhibitörlerinin kolon kanserini önlemede başarılı olabileceğini göstermiştir (Lev-Ari et al., 2005). Çalışmamızda kullanılan HT-29 hücreleri yüksek seviyede COX-2 ifadesine sahipken, Caco-2 hücreleri düşük seviyede COX-2 ifadesine sahiptir. Çalışmamızda hiperisin

aktivasyonundan özellikle 16 saat sonra hiperisin uygulama gruplarında apoptotik hücre yüzdesinin Caco-2 hücrelerinde HT-29 hücrelerine göre daha fazla olmasının Caco-2 hücrelerindeki düşük COX-2 ifadesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Aktivasyondan 24 saat sonra Caco-2 hücrelerinde hiperisinin sitotoksik etkisi azalmış ve apoptoza direnç kazanan hücreler sayıca artmaya başlamıştır. HT-29 hücrelerinde hiperisin uygulama gruplarında aktivasyondan 24 saat sonra apoptoz oranı Caco-2 hücrelerine göre daha fazladır.

Clusiaceae (Hypericeae=Guttiferae) familyasına ait olan *Hypericum perforatum* L. sarı kantaron, binbirdelik otu, yara otu, kan otu, kuzu kıran, kılıç otu ve püren gibi çeşitli isimlerle bilinmektedir. Dünyada 350-400 kadar türle temsil edilen *Hypericum* cinsinin ülkemizde 84 türü vardır. *Hypericum perforatum* L. ülkemizde Marmara, Karadeniz, Ege, Orta ve Doğu Anadolu, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yayılış göstermektedir (Kaçar ve Azkan, 2004). Hiperisin, *H. perforatum*'dan ekstrakte edilen doğal olarak oluşan bir IDM'dir. Fizikokimyasal özellikleri geliştirilmiş, görüntüleme ve PDT'de kullanılabilen birçok sentetik hiperisin türevi sentezlenmiştir. Klinik çalışmalar, hiperisinin mesane ve oral kanserlerin tanısı ve tedavisinde kullanım potansiyeli olduğunu, ayrıca IDM'nin floresan veri analiziyle hastalığın patolojik skorlamasında da kullanılabileceğini göstermiştir (Kah et al., 2008).

Hiperisinin ışığa ile aktivasyonundan sonra sitotoksik etkisini gösteren farklı *in vitro* çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda insan göbek kordonu endotelial hücreleri, insan glioma kanser hücreleri, hepatik hepatoblastoma hücreleri, insan meme karsinom hücreleri, rhabdomiyosarkoma hücrelerinde hiperisinin fototoksitesinin gösterildiği birçok çalışma bulunmaktadır (Karioti and Bilia, 2010). Farklı hiperisin konsantrasyonları ve PDT koşulları için HT-29 hücrelerinde PDT çalışmaları mevcutken, Caco-2 hücrelerinde bu konuda çalışma bulunmamaktadır.

Hiperisinin hücreden içeri taşınabilmesi için serum proteinleri, deterjanlar gibi çözücüler ya da lipozomlar gereklidir. İnsan serum albumini ya da diğer serum proteinleri hiperisin agregasyonunu engellemekte ve hücre zarından geçişini sağlamaktadır. Hiperisin, fetal sığır serumu içeren besiyerinde çözüldüğünde, hiperisin/serum protein kompleksi önce hücre zarıyla temas etmektedir. Sonra, hiperisin zarın lipid matriksinde çözünerek sitosole geçmekte, difüzyon ve vezikül

geçışı ile organellere girmektedir. Bu difüzyonda hiperisinin amfifilik (hem hidrofobik hem hidrofilik özellikleri taşıyan) oluşu önem kazanmaktadır. Ayrıca, hiperisinin kolaylaştırılmış difüzyon ile zardan ısı şok proteini (HSP-70) gibi amfifilik proteinler aracılığıyla organellere taşındığı düşünülmektedir. Diğer bir yol ise hiperisin/serum protein kompleksinin zardan pinositoz ile sitoplazmaya geçip organel zarlarıyla birleşerek Golgi/ER/çekirdek zar sistemine ya da lizozom zarına yerleşmesidir (Uzdensky et al., 2001).

Kolon, serviks ve glioblastoma hücrelerinde yapılan çalışmada hiperisinin ışırma sonrasında sitotoksik olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni, aşırı artan kalsiyum iyonlarının neden olduğu nekrotik ya da apoptotik hücre ölümü ya da protein kinaz C inhibisyonuyla apoptoz indüklenmesi olarak açıklanmıştır (Uzdensky et al., 2001). Caco-2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada pinositoz engellendiğinde de hiperisinin hücre içine alınması, bu olayda hem difüzyon hem de endositozun rol oynadığını göstermiştir (Sattler et al., 1997).

Hiperisin aracılı ölüm mekanizmaları birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Hiperisinin, mitokondriyal zarın H⁺ geçirgenliğini arttırdığı, fotooksidasyon nedeniyle süksinat oksidasyonu ile meydana gelen transmembran potansiyeli azalttığı, tiobarbiturik asit reaktif madde (TBARS) oluşumuyla mitokondriyal zarda ¹O₂ aracılı lipit peroksidasyonuna neden olduğu insan retinal pigment epitel hücrelerinde gösterilmiştir (Wielgus et al., 2007). Bir başka çalışmada insan prostat kanser hücrelerinde hiperisin aktivasyonu ile mitokondriyal akonitaz enzim aktivitesini azalttığı bulunmuştur. Akonitaz inaktivasyonu çok toksik olan hidroksil radikalleri oluşumuna neden olmakta ve ikincil olarak trikarboksilik asit (TCA) döngüsünü etkilemektedir (Theodossiou et al 2009). Çalışmamızda mitokondriyal canlılığı esas alan bir metabolik aktivasyon testi olan MTT sonuçlarına göre, HT-29 hücrelerinde inkübasyon süresiyle ve hiperisin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak sitotoksosite artmıştır. Caco-2 hücrelerinde, HT-29 hücrelerine benzer şekilde hiperisin konsantrasyonu arttıkça sitotoksosite artmış, ancak hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra azalan hücre canlılığı aktivasyondan 24 saat sonra artmaya başlamıştır. Hücredeki metabolik aktivitenin belirlendiği MTT analizi sonuçları ve canlılık sayımının yapıldığı tripan mavisiyle boyama sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmuştur. DNA'da özellikle fosfat gruplarına bağlanan Giemsa boyası ile yapılan morfolojik incelemeler MTT testi sonuçları ile uyumlu bir şekilde test edilen iki

kolonadenokarsinom hücre hattının PDT'ye verdiği cevabın farklılığını göstermiştir. HT-29 hücrelerinde konsantrasyonu ve inkübasyon süresi arttıkça çekirdek yoğunlaşması, çekirdek fragmentasyonu ve hücre zarı hasarı artmaktadır. Caco-2 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat sonra görülen çekirdek yoğunlaşması ve fragmentasyonu ile zar hasarı 24 saat sonra azalırken, hücre canlılığı artmaktadır.

Sitotoksisite derecelendirilmesine göre, en yüksek hiperisin konsantrasyonu (0,15 μM) HT-29 hücreleri için orta derecede toksik, Caco-2 hücreleri için az toksik bulunmuştur. Diğer hiperisin konsantrasyonlarında (0,04 ve 0,08 μM) ise her iki hücre için az toksik bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, hiperisinin 0,04, 0,08 ve 0,15 μM konsantrasyonları ve 4 J/cm^2 ışık uygulamasıyla yapılan PDT için HT-29 hücreleri, Caco-2 hücrelerine göre daha iyi cevap vermiş ve PDT'ye daha hassas bulunmuştur. Bu durum, derece-1 olan HT-29 kolon kanserlerde hiperisin tedavisinin daha etkili olabileceğine işaret etmektedir. Sačková ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada, çalışmamıza benzer şekilde, farklı iki hücrenin aynı PDT koşullarında farklı cevaplar verdiği görülmüştür. HT-29 ve U937 hücreleriyle yapılan çalışmada en yüksek hiperisin konsantrasyonunun (1 μM), 4.4 J/cm^2 ışık uygulamasından sonra her iki hücre için de sitotoksik bulunurken, daha düşük konsantrasyonlarda canlılık yüzdesi hücreler arasında farklılık göstermiştir.

Hiperisin aracılı ölümü açıklamada ışıkla duyarlaştırılan hücrelerin ER Ca^{2+} depolarını yeniden doldurma yeteneğini kaybetmesi de gösterilmektedir. Bunun nedeni ROS'un ER Ca^{2+} pompasına atakta bulunmasıdır. Normal koşullarda ER'un görevi olan yeni sentezlenen proteinlerin değişimi sürecinde yaşanan aksaklıklar, ER stresine ve katlanmayan protein cevabına (KPC) neden olmaktadır. Hiperisinin mesane kanseri hücrelerinde KPC'ye neden olduğu, ER stresi geri dönüşümsüz olduğunda KPC'nin mitokondriyal kaspaz yolağı aracılığıyla apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Theodossiou et al., 2009).

Lizozomal hasarın hiperisinin çok yönlü toksisitesinde birincil yol olmadığı düşünülmektedir. PDT'nin etkisiyle ya da sitosolik inhibitörler nedeniyle lizozomal enzimler inaktive olmakta ve hücreler kısmi lizozomal hasarla yaşamaya devam edebilmektedir (Theodossiou et al 2009).

Hiperisin aracılı PDT ile indüklenen hücre ölümünde ROS oluşumu en önemli aşamadır. ROS hem mitokondriyal zar geçirgenliğini arttırarak ve kaspaz aktivasyonunu sağlayarak apoptozun indüklenmesine, hem de doğrudan DNA, protein ve lipidlere atak yaparak nekrotik ölüme neden olabilmektedir (Fleury et al., 2002). Hücre ölüm tipinin belirlenmesinde PDT koşulları, kullanılan IDM konsantrasyonu kadar kullanılan hücre tipi de önemlidir (Agostinis et al., 2002). PDT sonrasında oluşan oksidatif hasarın şiddeti hücrelerin apoptotik ya da nekrotik ölümünü belirlemektedir. Hücrelerin verdiği antioksidan cevap hasarı tamir etmeye ya da engellemeye yeterse hücreler yaşamaya devam etmektedir. Hücrede hasar az olduğunda tamir mekanizmalarını devreye sokar, ancak tamir kapasitesi aşıldığında apoptoz meydana gelirken, hasar fazla olduğunda doğrudan zar hasarı ve nekroz meydana gelmektedir (Girotti, 2001).

Apoptozun düzenlenmesindeki aksaklıklar, kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir yere sahiptir. Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçıp çoğalmaya devam etmesi ayırt edici bir özelliktir ve kanser tedavisinin ana hedefidir. İç ya da dış yolakları hedef alarak apoptozu başlatan yeni moleküllerin geliştirilmesi tümör hücre çoğalmasının altında yatan mekanizmaları anlamak ve etkili tedavi için önemlidir (Ashkenazi, 2002; Hanahan and Weinberg, 2000).

Kanserlerin çoğunda p53 yolağı inaktif durumdadır. Yapılan birçok çalışma, p53 mutasyonu olan kolorektal kanserlerin daha agresif, metastazik ve teşhisinin zor olduğunu göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar p53'ün üye olduğu protein ailesine p63 ve p73 genlerinin de üye olduğunu göstermiştir. Caco-2 hücrelerinde p53 geni mutant olsa da işlevsel p63 ve p73 genleri korunmaktadır (Ray et al., 2011). Bu bilgiye dayanarak çalışmamızda hiperisinin Caco-2 hücrelerinde apoptozu indüklemesinin p63 ve p73 genlerinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Apoptoz, biyokimyasal olarak oligonükleozomal DNA fragmentasyonu ile ve morfolojik olarak apoptotik cisimlerin oluşumuyla karakterize olan bir olaydır. Sağlıklı hücrelerin DNA hasarına verdiği cevap, p53 ve p21 artışıyla hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak ya tamir mekanizmasını ya da apoptozu başlatmaktır. Bcl-2 proteini apoptozu inhibe ederek hücre canlılığını korumaya çalışmaktadır. Lösemi hücrelerinde fazla ifade olan Bcl-2 apoptozu engellemekte, TP53 mutasyonu ile birlikte anti-kanser ilaçların etkisini azaltmaktadır (Peters et al., 2000). Benzer

şekilde, aşırı ifade olan anti-apoptotik Bcl-2, sitokrom-c salınımını ve kaspaz-3 aktivasyonunu baskılayarak, hiperisin aracılı PDT ile meydana gelen apoptoza karşı direnç gelişimine ve nekroza neden olmaktadır. Benzer şekilde çalışmamızda, her iki inkübasyon süresi için de nekrotik hücre yüzdesi Caco-2 hücrelerinde HT-29 hücrelerine göre daha fazladır. Bu durum, Caco-2 hücrelerinin daha fazla Bcl-2 ifadesine sahip olması nedeniyle apoptoza karşı direnç kazanan hücrelerin nekrotik ölüme gitmesiyle açıklanabilir.

Mikeš ve arkadaşları (2007), yaptıkları çalışmada Bcl-2 ifadesi bulunmayan HT-29 hücrelerinde hiperisin aracılı PDT sonrası bir diğer anti-apoptotik protein olan Bcl-X_L ifadesinin arttığını göstermişlerdir. Agostinis ve arkadaşları (2002), hiperisin aracılı ölümlerin anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin seviyesinden ve p53 gen durumundan bağımsız da olabileceğini, ancak Bcl-2'nin aşırı ifade olmasının apoptozun başlamasında gecikmeye neden olabilirken, nekroz olayını etkilemeyeceğini göstermişlerdir.

Sıçan/fare T hücre hibridoma hücreleri (PC60) ve insan lenfoblastoid CD4 T hücrelerinde (JK), hiperisinin neden olduğu stres sonucu JNK1/p38 MAPK sinyal iletim yolunun aktive olduğu ve bunun apoptoza karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir (Agostinis et al., 2002).

PDT çeşitli seviyelerde nekrotik hücre ölümünü de indükleyebilmektedir. IDM hücre zarına yerleşirse zar bütünlüğünün bozulmasıyla ya da lizozom zarındaki hasar sonucu lizozomal proteazların etkisiyle nekroz meydana gelmektedir. Ayrıca hücre içi Ca²⁺ birikiminde artış ve mitokondriyal iç zar potansiyelinin kaybı da nekroza katkıda bulunmaktadır. Hücrelerin PDT ile indüklenen nekroza karşı direnci değiştirilebilmektedir. ROS yakalayıcılar hücreleri PDT'den koruyabilmekte, SOD aktivitesi inhibe edildiğinde, PDT'ye duyarlılık artmaktadır (Zong and Thompson, 2006).

Yapılan bir çalışmada hiperisin aracılı PDT sonrasında nazofaringeal kanser hücrelerinde lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit seviyesinin arttığı bulunmuştur. MDA konsantrasyonunun artışı hücre canlılığındaki azalma ve nekrotik ölümlerle ilişkilendirilmiştir (Du, 2005).

Çalışmamızda hiperisin ve ışımayı takiben görülen hücre ölümünün, kanser tedavisinde tercih edilen bir strateji olan apoptozla mı yoksa diğer ölüm şekilleriyle mi olduğu araştırılmıştır. Akridin oranj hem canlı hem de ölü hücreleri boyayan vital bir boyadır. Propidyum iyodür ise sadece zar bütünlüğünü kaybeden hücreleri boyamaktadır. Bozulmamış hücre zarı olan ve yeşil boyananlar canlı hücreler; kromatin yoğunlaşması nedeniyle çekirdekte yeşil noktaya sahip olanlar erken apoptotik hücreler; propidyum iyodürü alan ancak yoğunlaşmış çekirdeğe sahip turuncu boyananlar geç apoptotik hücreler ve turuncu boyanan çekirdek bütünlüğü bozulmayanlar nekrotik hücrelerdir. HT-29 hücrelerinde apoptotik hücre yüzdesi hiperisin aktivasyonundan 16 ve 24 saat sonra 0,08 μ M hiperisin grubunda en fazlayken, 0,15 μ M hiperisin grubunda nekrotik hücre yüzdesi en fazladır. Caco-2 hücrelerinde ise sadece aktivasyondan 16 saat sonra benzer sonuçlar görülmüş, 24 saat sonra 0,08 μ M ve 0,15 μ M hiperisin gruplarında apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri azalmıştır. Ayrıca bir diğer DNA boyası olan DAPI boyamaları sonuçları AO/PI boyama sonuçlarına uyumlu şekilde düşük hiperisin konsantrasyonlarında (0,04 ve 0,08 μ M) kromatin fragmentasyonu, çekirdek şişmesi, sitoplazmik kabartılar gibi sitolojik değişiklikler bu gruptaki hücre ölümünün nekrozdan çok apoptotik olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, özellikle hücre kültürü ortamında karşılaşılan bir başka ölüm şekli olan sekonder nekroz da görülmüştür. Apoptotik cisimler ve hücre zarı hasarının bir arada görüldüğü sekonder nekroz yüzdesindeki artış HT-29 hücrelerinde her iki inkübasyon süresi için hiperisin konsantrasyonunun artışıyla doğru orantılı olarak artarken, aktivasyondan 24 saat sonra, 16 saate göre azalma olmuştur. Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 saat sonra 0,08 μ M hiperisin grubunda, 24 saat sonra ise 0,15 μ M hiperisin grubunda sekonder nekroz yüzdesi en fazladır. Mikeš ve arkadaşları (2007) HT-29 ve HeLa (İnsan servikal adenokarsinom) hücrelerinde 60- 200 nM hiperisin ve 4.4, 6, 10 J/cm² ışımadan 24 ve 48 saat sonra hücre ölüm yüzdelerini hesaplamıştır. Sonuçlara göre apoptotik, sekonder nekrotik ve nekrotik hücre ölümleri, 48 saat sonra daha da artmış ve nekrotik ölüm en fazla bulunmuştur. 150 nM hiperisin konsantrasyonunda ve 3 ışıma şiddetinde nekrotik hücre ölümü yüzdesinin daha fazla, apoptotik ölüm ve sekonder nekrotik ölüm yüzdelerinin daha az bulunmuş olması bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Hiperisinin fototoksisitesinin hücre tipiyle yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Hiperisin aktivasyonu sonrasında HeLa hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi kontrol gruba göre 7 kat artarken, aynı koşullarda HT-29 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin düştüğü görülmüştür (Mikeš et al., 2007). Bu, HT-29 hücrelerinde hiperisinle indüklenen apoptoza kaspaz bağımsız mekanizmanın katkısını göstermektedir. Kaspaz bağımsız mekanizmada apoptoz indükleyici faktörün rolü Sačková ve arkadaşları (2007) tarafından HT-29 hücrelerinde gösterilmiştir.

Nazofaringeal karsinom hücrelerinde (NK-1) yapılan çalışmada 0,5–3 μM hiperisin ve 0,2 J/cm^2 ışına sonrasında p38 MAPK ve JNK'ların aktive olduğu ve COX-2'nin arttığı gösterilmiştir. P38 MAPK inhibitörleri eklendiğinde hiperisin aracılı PDT ile indüklenen hücre ölümünde artış olduğu da bulunmuştur. p38 MAPK aktivasyonunun bazı hücrelerde apoptozu indüklediği, bazı tip hücrelerde ise engellediği düşünülmektedir (Chan et al., 2009).

Hiperisin ışına olmadığına floresan özellik göstermezken, uygun dalga boyundaki ışıkla aktive edildiğinde hücre içindeki hiperisin floresan özellik göstermektedir. Hiperisinin bağıl hücresel birikimi akış sitometride floresan yoğunluğu ölçülerek değerlendirilebilir (Yamazaki et al., 1993). Çalışmamızda hiperisinin hücre içine alımını göstermek için akış sitometride hiperisinin floresan ışına yoğunluğu ölçülmüştür. Hem HT-29 hem de Caco-2 hücrelerinde hücre dışı hiperisin konsantrasyonu arttıkça, hiperisinin hücresel alımındaki artış, kırmızı floresan ışınımın yüzdesindeki artışla gösterilmiştir. Caco-2 hücrelerinde hiperisinle ilgili yapılan bir çalışmada, 80-200 μM hiperisin ve protohiperisinin özel ışına koşullarında transepitelyal geçişi özel bir sistemle ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre, bazolateral kısımda ölçüm sonuçları çok düşük bulunmuş, uygulamadan 3 saat sonra hiperisin ve protohiperisinin hücre içinde ve zarlarda % 4-8 oranında biriktiği gösterilmiştir (Kamuhabwa et al., 1999).

Son yıllarda kanser konusunda yapılan moleküler çalışmalarda, kanser hücrelerinin büyüme ve apoptotik fenotipleri üzerine onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin etkisi dışında, hücresel enerji metabolizmasını ve metabolik enzimleri doğrudan etkileyen genlerin önemi vurgulanmaktadır. Klasik biyokimyasal yollara olan ilginin yeniden artması ve yeni bulunan sinyal iletim yolları birleştirilerek kanser hücrelerindeki metabolik değişikliklere yeni moleküler bakış açıları getirilmesi mümkündür (Dang

and Semenza, 1999). Tümörlü dokuda artan pH ve hipoksik koşullar tümörün yayılmasında önemli olduğu kadar PDT için de önemlidir. Bu da tedavi stratejilerini belirlemede kanser hücrelerindeki metabolik adaptasyonları önlemenin önemini göstermektedir.

Normal hücreler oksijeni, etkin ATP üretimi için oksidadif fosforilasyonda kullanmaktadır. Oksijen azaldığında piruvat TCA döngüsü ile metabolize edilmek yerine NAD sağlamak üzere laktata dönüştürülmektedir. Tümörlü dokuda kan damarından >100-200 µm uzağında hipoksi meydana gelmektedir. Tümör hücreleri güçlü hipoksik koşullara uyum göstermiştir. Bu nedenle, tümör hücreleri oksijen varlığında dahi ATP üretimi için daha az etkin glikolitik yol olan anaerobik glikolizi tercih etmektedir. Hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktörü (HIF-1), oksijenin azalmasıyla artan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1'in artışıyla tüm glikolitik enzimler artmaktadır. Ayrıca, kanser hücreleri laktik asit ve diğer asitlerin üretimi nedeniyle normal hücrelere göre daha asidik bir çevrede bulunmaktadır (Dang and Semenza, 1999). Bu asidik çevre hiperisinin tercihen kanser hücreleri tarafından alınmasını sağlamada önemlidir.

Tümör hücrelerinin daha fazla glukoz tükettiği, glukoz taşıyıcısı olan GLUT1 (glucose transporter-1)'in, tip 2 hekzokinazın (HK2) arttığı ve bunların tümörün ilerleyişinde önemli olduğu bilinmektedir. Ayrıca, mutant p53 aleli, HK2'nin transkripsiyonunu düzenlemekte ve tümör metabolizmasını da etkilemektedir. Onkogenik bir transkripsiyon faktörü olan Myc kanserde artmakta, bu da glikoliz, LDH aktivitesi ve laktat üretiminde artışa neden olmaktadır (Dang and Semenza, 1999). Çalışmamızda kolon adenokarsinom olan HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde hiperisin uygulaması öncesinde ve sonrasında metabolik aktivitede meydana gelen değişiklikleri incelemek üzere glukoz tüketimi, laktat üretimi ve LDH aktivitesi ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre, hiperisin uygulama gruplarında kontrol gruba göre HT-29 hücrelerinde özellikle aktivasyondan 24 saat sonra, Caco-2 hücrelerinde ise 16 saat sonra glukoz tüketimi azalmıştır. Hiperisin uygulama gruplarındaki bu azalma hücre sayısındaki azalma ile doğru orantılıdır. p53 mutant olan bu iki hücre hattında hiperisin uygulamasıyla GLUT-1, HK2 enzim aktivitesi veya Myc proteininde meydana gelen bir değişiklikle glukoz metabolizmasının etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir.

Kiesslich ve arkadaşları (2005), *in vitro* koşullarda PDT ile indüklenen glukoz azalmasının, glikolitik ATP üretimini inhibe ederek hücrel enerji kaynağını etkilediğini göstermişlerdir. Glikolitik ATP, apoptoz sırasında mitokondriyal bozulmaları kompanse etmekte ve apoptoz sırasında ATP gerektiren olaylara destek olmaktadır. Işıkla duyarlaştırılan hücrelerde glukozun azalması apoptozun azalmasına ve aynı koşullarda görülmesi gereken apoptoz yerine nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca, PDT esnasında bozulan karbonhidrat metabolizması hücrenin antioksidan mekanizmasını da etkilemektedir. Glikolitik yoldaki sorunlar, yeni glutatyon üretimini azaltmakta, bunun sonucunda da ROS'un etkisi artmaktadır (Kiesslich et al., 2005).

Hücre kültürü koşullarında hücrelerden salınan sitoplazmik bir enzim olan LDH aktivitesi, canlı olmayan hücre sayısındaki artışla artmakta ve glukoz tüketimindeki azalmaya paralellik göstermektedir. Legrand ve arkadaşları (1992), kültür ortamında farklı hibridoma hücrelerinden LDH salımı artışı ve tripan mavisini ile boyanarak sayılan ölü hücre yüzdesi artışının orantılı olduğunu saptamıştır. Çalışmamızda önceki kaynaklara uyumlu olarak, HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde hiperisin uygulama gruplarında görülen glukoz tüketimindeki azalma, tripan mavisiniyle sayılan ölü hücre yüzdesindeki artış ve LDH aktivitesindeki artış birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Malign hastalıklarda LDH seviyesinin arttığı bilinmektedir. Kanser hastalarında LDH artışı klinik tanıda kullanılmazken, tedavi sonrasında tümör büyüklüğünün izlenmesinde kullanılabilir (Burtis and Ashwood, 2005). Çalışmamızın sonuçlarına göre her iki kolon kanseri hücresinde hiperisin konsantrasyonu ile LDH salımındaki artış doğru orantılı olduğundan, hiperisin aktivasyonuna bağlı olarak meydana gelen hücre zarı hasarının izlenmesinde LDH aktivitesinin kullanılabilirliğini düşünmekteyiz.

Benzer bir çalışma Johnson ve arkadaşları (1998) tarafından EMT6 fare meme kanseri hücrelerinde yapılmıştır. 0,5 μM ve 1 μM hiperisin uygulaması ve 1,5 J/cm^2 ışımadan sonra konsantrasyon artışına bağlı olarak LDH salımında artış görülmüştür.

Memeli hücre kültüründe, hücre içi piruvat konsantrasyonunu da içeren birçok faktör laktat üretimini etkilemektedir. Piruvat, hem LDH hem de piruvat dehidrogenazın (PDH) substratıdır ve salınan karbon kaynağının glikoliz ile oksidasyonu sonrasında laktat olarak mı çıkacağını, yoksa TCA döngüsüne girip daha da metabolize mi edileceğini belirlemektedir (Zhou et al., 2011). Kanser hücrelerinde LDH'in arttığı,

PDH'ın azaldığı bilinmektedir. Kanser hücreleri tarafından fazla alınan glukoz fazla miktarda laktat üretimiyle sonuçlanmaktadır. LDH enzimi piruvatın laktata indirgenmesini sağlamaktadır (Feron, 2009). Çalışmamızda HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde tüm hiperisin uygulama gruplarında glukoz tüketimindeki azalmaya paralel olarak laktat üretimi azalmıştır.

Verim faktörü, bir organizmanın besin ihtiyaçlarını ve ürünlerini nicel olarak belirleyebilme imkanı vermektedir. Verim, belirli bir tepkimeye katılan madde başına oluşan ürün miktarını göstermektedir. Kültür koşullarında farklı zamanlarda üretim ve tüketim miktarları ölçülüp, bu ölçümlerin farkı alındığında geçen tüm zaman için bu kültürün ortalama veriminin değerlendirilmesi mümkün olmaktadır (Doran, 1995). Yaptığımız çalışmada HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 16 ve 24 saat sonra laktat üretiminin glukoz tüketimine oranı hesaplanmış, hem kontrol hem de hiperisin uygulama grupları için sistemin dengede olduğu görülmüştür.

Hücre döngüsü kontrol noktaları DNA replikasyonunun ve bölünmenin doğru bir şekilde olmasını sağlamaktadır. Kontrol noktaları hücre döngüsünün ilerlemesini ya da DNA hasarına cevap olarak döngüyü durdurarak DNA tamiri için zaman kazanılmasını sağlamaktadır. Hücre döngüsü DNA hasar kontrol noktası, G1'in geç aşamasındadır ve S fazına girişi engellemektedir. G2'nin sonlarındaki kontrol noktası ise mitozaya girişi engellemektedir. Bu kontrol sistemi, bir protein kinaz ailesi olan ve siklinler tarafından kontrol edilen siklin bağımlı kinazlarla (cdk) sağlanmaktadır. Bazı ajanlar G2/M fazında durma kontrol noktasının inaktive olmasına, bazı ajanlar ise bu kontrol noktasında durmanın artmasına neden olmaktadır. G2/M fazında durmayı inaktive eden ajanlar, DNA hasarı meydana getiren ajanların sitotoksitesini arttırmaktadır. Bu fazda durmayı arttıran ajanlar siklinlerin azalmasına ve cdk'ların inhibisyonuna neden olmaktadır (DiPaola, 2002).

Yeni bir ilaç geliştirirken, hücre döngüsü fazlarının ilerleyişini düzenleyen kontrol noktalarını hedef alan ajanlar önemli olmaktadır. Bu kontrol noktaları, hücre bölünmesinin hızını ve bölünmenin doğru bir şekilde ilerlemesini düzenlemektedir. Örneğin G1 fazında durma kontrol noktasındaki bir sorun kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırabilmektedir. G2/M fazında durma kontrol noktasındaki sorun, hasarlı hücrenin apoptoza girmesine neden olmaktadır (DiPaola, 2002).

PDT'nin etkinliği ve hiperisinle indüklenen hücre döngüsünün farklı kontrol noktalarında inhibe olması ya da durması, hücre tipine ve PDT koşullarına (IDM, ışık dozu vs.) bağlıdır. Sačková ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada 0,001µM - 1 µM aralığındaki konsantrasyonlarda hiperisin uygulamış (16 saat) ve 4,4 J/cm² ışık ile hiperisini aktive etmişlerdir. Akış sitometride yaptıkları analizlere göre hücre döngüsü, adheren olan HT-29 hücrelerinde tercihen G2/M fazında, süspanse lösemi hücreleri olan U937 hücrelerinde ise S fazında durmuştur. Ayrıca bu çalışma ile MTT cevabının, hücre döngüsünde fazlardaki durmalar ve/veya apoptozla bağlantılı olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 24 saat, Caco-2 hücrelerinde ise 16 saat sonra 0,08 µM hiperisin grubunda hücre döngüsünün G2/M fazında duran hücre yüzdesi artmıştır. Bu sonuçlar, 0,08 µM hiperisin grubunda artan apoptotik hücre sayısı ile uyumlu bulunmuştur. HT-29 hücreleriyle ilgili önceki çalışma sonuçlarına uyumlu şekilde çoğalan hücrelerin hiperisine en çok duyarlı olduğu faz, hücre döngüsünün G2/M fazı olmuştur. Caco-2 hücrelerinde yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda Caco-2 hücrelerinde hiperisinle indüklenen sitotoksiste G2/M fazındaki hücre yüzdesi artmıştır. Bunun nedeninin hiperisinin bu fazdaki hücrelerde DNA hasarını ve kromozom değişikliklerini indüklemesi olduğu düşünölmektedir.

Yapılan çalışmalar, hücre döngüsündeki farklılıklar, döngüde işlev gören proteinlerin (siklin A, siklin E, cdk-2, pRb) seviyesinde hiperisin uygulaması sonrasında meydana gelen değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Kleban et al., 2008). HeLa hücrelerinde hiperisin ile yapılan çalışmada, subletal PDT dozlarında anormal mitotik iđ ipçiklerinin gözlenmesi ve hiperisinin tubulinin olduğu bölgelerde birikmesi, hasar gören mikrotüböl ağının hücre döngüsünün G2/M fazında durmasına neden olduğunu göstermiştir. Düşük konsantrasyonda hiperisin aracılı PDT'de cdk1/siklin B1 kompleksi aktivasyonu sonucunda Bcl-2 fosforile olmakta ve mikrotüböl hasarı gözlenmektedir. Bcl-2 fosforillenmesi G2/M fazında duran hücrelerinde gecikmiş apoptoz için bir sinyaldir. Konsantrasyon arttırıldıkça hücreler G2/M fazında birikmeden apoptotik hücre ölümüne gitmiştir. Bcl-2 fosforilasyonu ve G2/M fazındaki duran hücrelerdeki birikme birbiriyle ilişkili bulunmuştur. Mitotik durağanlığa geöen bu hücreler hiperisin ile indüklenen hasarla başa çıkamayıp sonunda apoptozla ölmektedir. Uzayan mitotik durağanlığın, hücre döngüsünde bozulan hücreleri elimine etmek için bir koruma mekanizması olarak apoptotik süreci düzenlediği öne

sürülmüştür. Ayrıca düşük konsantrasyon hiperisin aracılı PDT ile indüklenen JNK1 aktivasyonu da G2/M fazındaki hücre birikimiyle ve Bcl-2 fosforilasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Vantieghem et al., 2002).

Lu ve arkadaşlarının (1994) yaptığı çalışmada HT-29 hücrelerinde sitoplazmada Bcl-2 ifadesinin olmadığı, ancak mitoz sırasında özellikle profaz ve metafaz esnasında bölünen çekirdeklerde ifade olduğu rapor edilmiştir. Bcl-2'nin antiapoptotik özelliğinden başka hücre döngüsünün ilerleyişinde hücrelerin fazlar arasında durmasını sağladığı ya da ilerlemesini engellediği bilinmektedir (Huang and O'Reilly, 1997). Caco-2 hücrelerinin *in vitro* koşullarda kültür ortamını tamamen kapladıktan sonraki süreçte farklılaşmasıyla Bcl-2 ifadesinde artış olduğu bilinmektedir (Gauthier et al., 2001).

Kontrol noktasında hasarlı DNA varsa, hasar tamir edilene kadar döngüyü G1 ya da G2 fazında durduran p53 proteindir. DNA'da hasar fazlaysa p53 apoptozu başlatan gen ifadelerini aktive etmektedir. Orta seviyedeki DNA hasarı p53'ü, p53 ise p21'i aktive etmektedir. p21, cdk-siklin komplekslerine bağlanır ve siklin kinaz inhibitörü olarak işlev görerek hücre döngüsünün G1 ve G2 fazında durmasına neden olmaktadır (Lodish et al., 2000).

Çalışmamızda hiperisin uygulaması sonrasında hasara uğrayan HT-29 ve Caco-2 hücreleri, G2 kontrol noktasında durup, hasarlı hücrelerin mitozla girmesi engellenmiş olabilir. p53 mutant olan HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde G1 fazında durma beklenmemektedir. G2/M fazındaki durmanın ve apoptotik hücre ölümünün fazla, nekrotik ölümün ise daha az olduğu 0,08 µM hiperisin uygulama grubunun *in vitro* koşullarda hiperisin aracılı PDT'de HT-29 ve Caco-2 kolon adenokarsinom hücreleri üzerinde daha başarılı sonuç verdiği, bu sonuçların kanser tedavi çalışmalarına ışık tutacağı düşünülmektedir. Ayrıca HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde görülen G2/M fazındaki duraklama aynı koşullarda yapılan apoptoz sonuçları ile de uyum göstermektedir. Aynı koşullarda apoptoz giden hücrelerde artış olurken, nekroza giden hücrelerdeki azalma dikkat çekicidir. Bu sonuçlar önceki çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur.

Hücrelerarası adezyon kaybı, malignant hücrelerin ilk olduğu yerden kaçıp, hücre dışı matriksi parçalayarak ilerlemesine ve metastazına neden olmaktadır. Bu

nedenle adezyon moleküllerinin varlığı, ifadesinin artması ya da azalması kanserin tanı ve tedavisinde önemli bir yere sahiptir (Pazos and Nader, 2007). FXYD5, FXYD ailesinin bir üyesi olup disaderin ya da anti-adezyon molekülü olarak da adlandırılmaktadır. Bu proteinin, sodyum-potasyum pompasıyla etkileşime girerek pompanın işlevini düzenlediği, hücre adezyonunda, hareketliliğinde ve aktin organizasyonunda etkili olduğu bilinmektedir. FXYD5'in hücre-hücre etkileşiminde ve hücre adezyonundaki rolü uzun bir hücre dışı kısma sahip olması ile desteklenmekte ve çok fazla glikozillendiği düşünülmektedir. Normal bir rodent dokusunda moleküler ağırlığına göre 20 kDa'a yakın bir polipeptit elde edilirken, tümörde ve tümör kökenli insan hücre hatlarında 50-55 kDa büyüğünde protein elde edilmiştir. Bunun sebebi hücre dışı kısmın aşırı glikozillenmesi olarak rapor edilmiştir (Lubarski et al., 2011).

Na-K ATPaz sıkı bağlantıların işlevini, iyon ve küçük moleküllerin geçişini düzenlemekte, hücre haberleşmesi, çoğalması ve farklılaşmasında rol oynamaktadır (Park et al., 2011). FXYD5 Na-K ATPaz ile etkileşime girmekte ve hücre iskeleti organizasyonunu değiştirerek parasellüler (sıkı bağlantı bölgelerinden geçiş) geçirgenliği etkilemektedir.

Kaplan (2005), sodyum-potasyum pompası alt birimlerinin kanser hücre hareketini düzenlediğini, birçok epitel hücrelerinde hücre hareketinin baskılanmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca bu pompanın alt birimlerinin fosfatidilinositol-3-kinaz yoluyla proteinlerle etkileşime girdiği, bunun sonucunda hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine ve lamellipod oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir.

Na-K ATPaz, iyon pompası görevi dışında sinyal iletici olarak da görev yapmaktadır. Disaderin, kanser metastazına iyon hareketlerini değiştirerek, protein kinaz C ve ERK 1/2 sinyal yollarını etkileyerek katkıda bulunmaktadır (Mohammadi et al., 2001).

Hücrelerin *in vivo* koşullarda metastasik potansiyelini gösteren fenotipik özelliklerinden biri, kültürü yapılan hücrelerde *in vitro* koşullarda gözlenen hareketliliktir. İnsan karaciğer kanser hücre hatlarında yapılan çalışmada, *in vitro* koşullarda hücrelerin hareketlilik seviyesinin, *in vivo* koşullardaki metastaz yeteneğiyle doğru orantılı olduğu; ayrıca disaderini aşırı ifade eden kanser hücrelerinde metastazın arttığı görülmüştür (Shimamura et al., 2004). Birçok tümörde

disaderinin fazla ifade olduğu, bu ifadenin yüksek metastazla orantılı olduğu gösterilmiştir (Lubarski et al., 2011).

Disaderinin translasyon sonrası modifikasyonlarının önemli olduğu bilinmektedir. Normal bir fare böbrek hücresindeki disaderin çok az karbonhidrat taşımaktadır. Ancak, kanser hücrelerinde disaderinin yüksek oranda glikozillendiği tespit edilmiştir. O-bağlantılı glikozillenmenin disaderinin ifade olabilmesi, E-kaderinin baskılanması ve hücre adezyonunun bozulması için gerekli olduğu bilinmektedir (Nam et al., 2007).

Yaptığımız çalışmada derece-1 kolon adenokarsinom olan HT-29 hücrelerinde disaderin IF boyaması sonuçları ve RT-PZR ile yapılan disaderin bağıl ifade oranları birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Kontrol gruba göre hiperisin uygulanan gruplarda aktivasyondan 16 saat sonra disaderin ifadesi değişmezken, 24 saat sonra hiperisin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak disaderin ifadesi azalmıştır. Bu sonuçlar hem RNA seviyesinde hem de hücresel düzeyde disaderin ifadesinin hiperisin uygulamasından etkilendiğini göstermektedir. Bu durum hiperisinin kalsiyum metabolizması üzerindeki etkisine bağlı olarak hücrelerarası adezyonu sağlayan proteinlerdeki ve sodyum potasyum pompasının işlevindeki bozulmaya ya da iyon geçirgenliğindeki değişikliklere bağlanabilir. Benzer sonuçlar kolon adenokarsinom derece-2 olan Caco-2 hücreleri için de görülmüştür. PDT sonrası hiperisin konsantrasyonuna bağlı olarak uygulama gruplarındaki hücre zarındaki disaderin IF boyaması azalmıştır, ancak farklı olarak bağıl disaderin ifadesindeki azalma özellikle aktivasyondan 16 saat sonra olmuştur. Aktivasyondan 24 saat sonra disaderin ifadesi açısından gruplar arasında bir farklılık görülmemiştir.

Batistatou ve arkadaşları (2006), kolorektal karsinoma sahip hastaların dokularında disaderin ve E-kaderinin immünohistokimyasal boyamasını yapmıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre, primer tümörde disaderin ifadesi E-kaderin ifadesiyle bağlantılı bulunmazken, lenf nodu metastazında ters orantılı bulunmuştur. Liang ve arkadaşları (2009) gastrointestinal stromal tümör dokusunda disaderini immünohistokimyasal boyamışlar ve RT-PZR'sini yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre disaderin ifadesindeki artış E-kaderin ifadesinin kaybına neden olmakta, bu da tümörün güçlenmesine ve metastaz yapmasına imkan vermektedir. Ayrıca gastrointestinal

stromal tümörün ilerleyişini tespit etmek için disaderin ifadesine bakılmasının umut verici olduğunu rapor etmişlerdir.

İnsan hematopoietik kök hücrelerinde disaderinle hemen hemen aynı, cDNA dizisi izole edilmiş ve disaderinin kök hücre özellikleriyle ilişkili olabileceği fikri öne sürülmüştür. Disaderin pozitif hücre populasyonlarının kök hücre transkripsiyon faktörlerini yüksek düzeyde ifade ettiği, disaderin geni aktarılan hücrelerin hücre proliferasyon hızının 2 katına çıktığı ve yüksek anti-apoptotik özellik gösterdikleri bulunmuştur. Benzer şekilde çalışmamızda hiperisin konsantrasyonunun artışına bağlı olarak HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 24 saat, Caco-2 hücrelerinde 16 saat sonra görülen disaderin ifadesindeki azalma, konsantrasyon artışına bağlı olarak görülen apoptozdaki artışla uyum göstermektedir. Normal işlevi sitotoksik bileşikleri ve ilaçları hücreden dışarı atmak olan ABC taşıyıcılarından (ATP Binding Cassette Transporter) biri olan ABCB1'in protein seviyesinin disaderin aktarılan hücrelerde arttığı bildirilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin apoptoz direncinin de arttığı görülmüştür (Park et al., 2011).

Kanser hücresi invazyon ve metastaz esnasında dokuda kendiliğinden hareket ettiğinden, tümör tedavisinde kanser hücre göçünün kontrol edilmesi önemlidir. Hücre göçü fibroblast ve epitel hücresi gibi neoplastik olmayan hücrelerde ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Hem neoplastik olmayan hem de kanser hücrelerinde ortak olan moleküler mekanizmalar ortaya çıkartılmıştır. Hücre göçü, birçok sinyal molekülü ile düzenlenen çok yönlü bir olaydır. Aktin iskeleti ve onun düzenleyici proteinleri çoğu hücrede göç için gerekli olmaktadır (Coates et al., 1992).

Aktin, monomerik globüler aktin olarak bulunup filamentöz aktini oluşturmak üzere polimerize olan, hücre iskeletinin temel elementidir. Aktin bağlayıcı proteinler globüler ve F-aktin ile etkileşime girerek mikrofilamentöz hücre iskeletinin yapısını düzenlemektedir (Coates et al., 1992). Epitel hücrelerinde güçlü hücre-hücre bağlantıları ve hücre zarının altında yoğun subkortikal aktin iskeleti bulunmaktadır. Ayrıca zardaki E-kaderinlerin yarısı serbestken, diğer yarısı aktin iskeletine bağlanmıştır. Bu bağlantı E-kaderinin sitoplazmik bölgesinin β -katenine, bunun da α -katenine bağlanmasıyla olmaktadır (Schreider et al., 2002).

Hücrenin herhangi bir bölgesinde ve herhangi bir zamanda F-aktin miktarındaki değişiklik aktin polimerizasyonu ve F-aktin depolimerizasyonu arasındaki dengeyi göstermektedir. Bu değişiklikler, hücre iskeletinde yeniden düzenlenme ve bazı hücrelerde polarizasyon ile birlikte gerçekleşmektedir. F-aktin içeriğinde seri olarak meydana gelen artış ve azalmalar, hücredeki F-aktin dağılımını yaygın şekilden odaksal hale çevirebilmektedir (Coates et al., 1992). Çalışmamızda, hiperisin uygulamasının aktin hücre iskeleti organizasyonunda yeniden düzenlenme meydana getirip getirmediğini tespit etmek üzere HT-29 hücreleri ve Caco-2 hücreleri Alexa Fluor 488 işaretli phalloidin ile boyanarak F-aktin dağılımı görüntülenmiştir. HT-29 hücrelerinde hiperisin aktivasyonundan 24 saat sonra, Caco-2 hücrelerinde ise aktivasyondan 16 saat sonra 0,08 ve 0,15 μM hiperisin gruplarında F-aktin organizasyonundaki değişiklikler sonucu F-aktin agregatları görülmüştür.

Hücre göçü sırasında aktin hücre iskeleti dinamik olarak yeniden düzenlenmektedir ve bu düzenlenme göç için gerekli gücü sağlamaktadır. Bu olayın inhibe olması, hücre hareketini azalttığından, aktinin yeniden düzenlenmesindeki moleküler mekanizmaların aydınlatılması kanser tedavisi için önemli olmaktadır (Yamazaki et al., 2005).

Hücre hareketi 4 sıralı olayın döngüsü sonucu olmaktadır: zarın başlatıcı uca doğru çıkıntı yapması, çıkıntı yapan bölgenin zemine tutunması, hücre gövdesinin buraya kaydırılması ve arka ucun bu bölgeye çekilmesidir. Aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesi bu olaylara dahil olmakta ve bu olay Rho ailesi GTPaz'ları tarafından düzenlenmektedir. Kanser hücreleri, farklılaşma durumuna göre farklı hücre göçü mekanizmaları göstermektedir. Hücre-hücre bağlantısına sahip epiteliyal tümörlerde hücreler beraber tabaka olarak hareket etmektedir (toplu göç). Farklılaşma azaldığında kaderinin işlevi baskılanmakta, her bir hücre kendi başına hareket etmektedir (bireysel göç). Bireysel göçün artışı, tümör progresyonu için iyi bir gösterge olmaktadır. Aktin iskeletinin yeniden düzenlenmesi, kanser hücrelerinin göçü için merkezi bir rol oynamaktadır. Aktin polimerizasyonunun (F-aktin) inhibe olması, birçok hücre göçü tipinin baskılanmasına neden olmaktadır. Kanser hücrelerinde Rho ailesi GTPaz sinyalizasyonu aktive olmakta ve kanser tedavisi için iyi bir adaydır (Yamazaki et al., 2005). Rho ailesi üyelerinin, aktin temelli stres fibrilleri, lamellipodyum, filopodia gibi yapılara katkıda bulunduğu bilinmektedir (Nobes and Hall, 1995). Çalışmamızda hiperisin aktivasyonu sonrasında hem HT-29

hem de Caco-2 hücrelerinde yüksek hiperisin konsantrasyonlarında sitoplazmada bulunan stres fibrillerinin etkilendiği görülmüştür. Bu durum hiperisinin yüksek konsantrasyonlarının Rho ailesi üyelerini etkilemesinden kaynaklanıyor olabilir. Ancak çalışmamızda hiperisinin hücre zarı altında bulunan kortikal aktin filamentleri üzerine etkisinin daha az olduğu görülmüştür.

Kanser hücrelerinin hareketini, invazyonunu hedef alan ilaçlar kanserle savaşta önemli bir yere sahiptir. Bunlardan biri aktin iskeletini hedef alan ilaçlardır. Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi çoğunlukla hücre-hücre iletişimi ve hareket kaybı ile sonuçlanmaktadır. Yapılan çalışmalar mikrofilamentlerde ve ara filamentlerdeki hasarların tümör hücrelerinin metastazik yeteneğini etkilediğini göstermektedir. HSP90 tümör hücrelerinde F-aktinle etkileşime girmekte ve aktin iskeletini sabitlemektedir (Chaturvedi and Sreedhar, 2010). Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak, çalışmamızda her iki hücre hattı için yüksek konsantrasyonda hiperisin uygulamasının HSP90 ifadesini etkileyerek aktin organizasyonunu bozmuş olabileceği ileri sürülebilir. Aktin filamentindeki hasar, integrin yapısını, fokal bağlantı gelişimini ve sinyal iletimini bozuyor olabilir. HSP90 inhibisyonu hem aktin iskeletinin geri dönüşümsüz hasarına hem de PDT'ye direncin azalmasına neden olacağından, kanserin PDT ile tedavisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Korb ve arkadaşları (2004) tarafından HT-29 hücrelerinde yapılan çalışmada, aktini bozan ajanlar kullanıldığında daha adheren tümör hücre sayısında artış olduğu ve *in vivo* da karaciğer metastazında değişiklikler olduğu görülmüştür. Ayrıca aktin fibrillerinin ve mikrotübül bütünlüğünün metastazik tümör hücre adezyonunu etkilediği rapor edilmiştir.

Tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanan Ig süper ailesinin bir üyesi olan kolorektal kanserde olmayan gen (DCC), HT-29 hücrelerine aktarıldığında fokal bağlantı bölgelerinde integrin seviyesindeki azalma aktin stres fibrillerindeki azalmayla birlikte görülmüştür. Bu durum kanser hücre göçü ve yayılmadaki azalmayla ilişkilendirilmiştir (Martin et al., 2006).

Stres proteinleri, çekirdek transkripsiyon faktörleri, matriks metalloproteinazları (MMP), adezyon molekülleri ve sitokinleri içeren birçok molekül, oluşan ROS ile

düzenlenmektedir (Gomer et al. 1996; Kick et al., 1995). Gen ifadeleri, hücrel savunma sistemini devreye sokabilir ya da hücrelerde hasarı başlatabilmektedir. HSP aracılığıyla ve ER stresi sonucunda indüklenen glukoz ile düzenlenen proteinler, PDT'den sonra hücrenin kurtulma cevabında işlev gören proteinlerdir (Klotz et al., 2001). Hücreler arası adezyon molekülü 1(ICAM-1), interlökinler (IL-1, -6) ve MMP-1 ışığa ile aktive olan inflamasyon ve doku hasarına katılan proteinlerdir. PDT, bağışıklık sistemini düzenleyen sitokinlerin ve metastazda önemli olan MMP'lerin gen ifadelerini değiştirme potansiyeline sahip olduğundan, tümörün uzun vadeli kontrolünde yararlı olmaktadır (Ryter and Tyrrell, 1998).

Vantieghem ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan çalışmada, hiperisin aracılı PDT sonrasında oluşan ROS, mikrotübül ağındaki hasarla ilişkili bulunmuş ve bunu anormal kromozomal ayrılma ve mitotik engel izlemiştir.

Mesane kanseri lezyonlarında hücrelerarası adezyonun olmaması, hiperisinin hücreler tarafından seçici olarak alınmasında önemli olduğu Agostinis ve arkadaşları (2002) tarafından vurgulanmıştır. Farede oluşturulan mesane kanseri modelinde 5 mg/kg hiperisin ve ışımadan 24 saat sonra damar sistemindeki ve hücrelerdeki hasar kaderin 5, kollajen alfa 1, kollajen 3, integrin alfa 5 ve integrin beta 3 azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Bhuvaneswari et al., 2008). İntegrin yapısındaki değişikliğin, hem hücre dışı matriks proteinlerine, hem de hücre içinde aktine bağlanma yeteneğinde kayıplara neden olabileceği düşünülmektedir (Pazos and Nader, 2007). Çalışmamızda HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde hiperisin uygulaması sonrasında aktin organizasyonundaki bozulmalar, hiperisinin integrin yapısında meydana getirdiği değişikliklerle ilişkili olabilir.

Pankreas kanser hücre hattında yapılan çalışmada disaderin ifadesinde değişiklik olması, *in vitro* koşullarda hücre morfolojisini, aktin organizasyonunu, fokal bağlantı oluşumunu ve hücre hareketini ve *in vivo* koşullarda metastazik potansiyeli etkilemiştir (Nam et al., 2007). Çalışmamızda hiperisin uygulaması sonrasında özellikle 0,08 ve 0,15 µM hiperisin gruplarında görülen disaderin ifadesindeki azalma, aktin stres fibrillerindeki azalmaya paralel bulunmuştur. Bu bulgu, Nam ve arkadaşları (2007) tarafından önerilen, disaderin ifadesindeki değişikliğin E-kaderin bağımlı ya da bağımsız şekilde aktin organizasyonunu etkilemesi görüşünü desteklemektedir.

Mikrofilament ağının yeniden düzenlenmesi, apoptozun erken aşamasında aktin depolimerizasyonu ile birlikte apoptotik cisim oluşumunda önemlidir (Grzanka et al., 2003). Bu konudaki bilgilere uygun bir şekilde çalışmamızda 0,08 μ M ve 0,15 μ M hiperisin gruplarında artan apoptotik cisim oluşumu ve apoptoz, bu gruplarda görülen aktin fibrillerinde azalma ve aktin agregatlarındaki artışla paralellik göstermiştir.

Yapılan mevcut çalışma ile derece-1 HT-29 ve derece-2 Caco-2 kolon adenokarsinom hücrelerinin hiperisin aracılı PDT'ye farklı cevaplar verdiği görülmüştür. Çalışmamızda, fototoksitate MTT mitokondriyal aktivasyon testiyle, canlı, ölü, yüzen, tutunan hücre yüzdesi tripan mavisiyle boyanıp sayılarak; hücredeki ölüm tipi AO/PI boyaması, Giemsa ve DAPI boyaması ile; hücrelerdeki metabolik aktivasyon değişiklikleri biyokimyasal testlerle spektrofotometrik olarak; hücre döngüsündeki değişiklikler akış sitometri analiziyle; hücre iskeleti (F-aktin) ve anti-adezyon proteini (disaderin) IF boyamayla ışık mikroskopunda ve RNA düzeyinde RT-PZR'si yapılarak incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, iki hücre hattının hiperisinin farklı konsantrasyonlarına ve inkübasyon süresine verdiği cevapta farklılıklar olduğu görülmüştür. Bu farklılığın iki hücredeki metabolik yollar, genetik mutasyonlar ve metastazik potansiyeldeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. HT-29 ve Caco-2 hücreleri, her ne kadar p53, APC, açısından mutant ve E-kaderin ifadesinin azalmış olması gibi ortak özelliklere sahip olsa da, farklı özellikler de taşımaktadır. Örneğin HT-29 hücreleri daha az metastazik tip ve daha iyi farklılaşmış hücrelerken, Caco-2 hücreleri daha agresif ve daha az farklılaşmış hücrelerdir. Ayrıca Caco-2 hücrelerinde ifade olan Bcl-2'nin, HT-29 hücrelerinde bulunmadığı, yalnızca çekirdek zarında bulunduğu bilinmektedir. Bu farklılıklar hiperisin aracılı PDT'ye verilen cevapta, hücre ölüm tipinin ve zamanının belirlenmesinde, direnç gelişiminde ya da tamir mekanizmalarının devreye girmesinde farklılıklara neden olmuş olabilir.

Yapılan bu tez çalışmasından elde ettiğimiz bulgulara göre, PDT'de tercih edilen ölüm şekli olan apoptozun her iki hücre için de 0,08 μ M hiperisin konsantrasyonunda en yüksek olduğu görülmüştür. HT-29 hücrelerinde aktivasyondan hem 16 saat hem de 24 saat sonra apoptotik hücre yüzdesi artmıştır. Ancak, Caco-2 hücrelerinde aktivasyondan 16 saat sonra apoptotik hücre yüzdesinin daha fazla olması, PDT'de tercih edilmesi gereken inkübasyon süresi seçimi için önemli bir bulgudur. Ayrıca

apoptotik ölüme uyumlu şekilde hiperisin uygulamasıyla hücre döngüsünün G2/M fazında durmasının, HT-29 hücrelerinde aktivasyondan 24 saat, Caco-2 hücrelerinde 16 saat sonra olması, konsantrasyon ve inkübasyon süresi seçimi açısından önemli bir sonuçtur. Caco-2 hücreleri tarafından hiperisinin hücre içine alındığını gösteren yayınlar dışında bu konuda başka bir çalışmaya rastlanmadığından, bu tez çalışması Caco-2 hücrelerinde hiperisin aracılı PDT'nin sitotoksik etkisini ve bu hücrelerde hiperisinin hücre bölünmesini HT-29 hücrelerine benzer şekilde G2/M fazında durduğunu gösteren ilk çalışmadır.

Hiperisinin etki mekanizmasını aydınlatmak üzere çalışmamızda hiperisin aracılı PDT sonrasında anti-adezyon molekülü olan disaderin, IF boyama ve RT-PZR'si yapılarak incelenmiştir. Hiperisin konsantrasyonunun artmasıyla disaderin ifadesindeki azalma aynı zamanda hücre iskeleti elemanı olan F-aktin boyamalarıyla da paralellik göstermiştir. Bu sonuçlara göre hiperisinin, disaderin proteinini etkileyerek kolon kanseri hücrelerinde sodyum-potasyum pompası işlevinde değişikliklere neden olduğunu ve sinyal iletim yollarını içeren birçok mekanizmayı değiştirdiğini düşünmekteyiz. Ayrıca hiperisin uygulamasıyla disaderin bağımlı ya da bağımsız şekilde hücre içi aktin filamentleri organizasyonu etkilendiğinden, hiperisinin kanser hücre hareketini ve göçünü azaltan mekanizmaları devreye soktuğu ileri sürülebilir. Bu nedenle kanserin hiperisin aracılı PDT tedavisinde disaderin ve F-aktinin hedef molekülleri olabileceğini düşünmekteyiz. Hiperisin aracılı PDT'nin HT-29 ve Caco-2 hücrelerinde disaderin ve F-aktin üzerinde etkilerini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, hiperisinin kolon kanseri hücrelerinde disaderin ve F-aktin üzerine etkilerinin gösterildiği ilk çalışma olması açısından da önemlidir.

Hiperisinin etki mekanizmasındaki farklılıklar göz önüne alınarak, hiperisinin kolon kanseri tedavisi amacıyla kullanımında *in vitro* koşullardan elde edilen bu sonuçların tedavi sürecine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Yaptığımız bu çalışmayla, farklı metastazik potansiyele sahip hücrelerde hiperisin konsantrasyonunun, inkübasyon süresinin ve diğer PDT koşullarının önemi ortaya konmuştur. Mekanizmasının tam olarak aydınlatılmaması sebebiyle tedavi amacıyla kullanımına henüz izin verilmeyen hiperisinin, kullanımda olan diğer IDM'den daha az konsantrasyonlarda daha etkili olduğu göz önüne alınarak PDT için gelecekte tercih edilen bir IDM olacağı düşünülmektedir. Yapılan bu çalışma hiperisinin etki mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlamaktadır.

Hiperisinin kolon kanseri hücrelerinde etki mekanizmasının tam olarak anlaşılması ve sitotoksik etkisini daha da güçlendirmek için ileride daha ayrıntılı çalışmalar yapılmalıdır. Örneğin hücre döngüsünün belirli fazlarda durmasını sağlayan proteinler; aktin filamentinin polimerizasyonundaki sorunlara neden olan düzenleyici genler ve hücre adezyon molekülleri ile olan etkileşimler araştırılabilir. PDT’de birçok yeni strateji kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin IDM’ler nanopartiküller ya da lipozomlar içinde hedef bölgelere daha başarılı bir şekilde ulaştırılabilir; iki fotonlu PDT ile dokuda daha derin bölgeye ulaşma sağlanabilir. Moleküler işaretleyiciler kullanılarak kanserle ilişkili olan bir enzimin substratı IDM’ye ve IDM’nin etkisini inhibe eden moleküle bağlanarak dokuya verildiğinde, sadece kanser hücrelerinde fotoaktivasyon olmaktadır.

PDT’nin kolon kanseri tedavisinde cerrahi operasyona ve kemoterapiye destek olarak kanserin uzun süreli kontrolüne yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Ancak kolon kanseriyle yapılan deneysel çalışmalar henüz yeterli düzeye ulaşmadığından klinikte PDT ile tedaviye henüz başlanmamıştır. Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla kullanılan ışık şiddetinin, hiperisin konsantrasyonunun, inkübasyon süresinin ve diğer PDT koşullarının optimizasyonu ile hiperisinin kolon kanseri tedavisinde önemli bir yere sahip olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca hiperisin aracılı PDT’nin derece-1 ve derece-2 kolon kanseri hücresi üzerindeki etkisinin farklı olduğu, HT-29 hücrelerinin aktivasyondan 24 saat, Caco-2 hücrelerinin ise 16 saat sonra PDT’ye daha başarılı yanıt verdiği ileri sürülebilir. Bu tez çalışmasının kolon kanserinin hiperisin aracılı PDT’sinde mekanizmadaki bilimsel boşluğun giderilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. and Reed, M., 2001, The history of photodetection and photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 74, 656-669.
- Agostinis, P.A., Vantieghema, A., Merlevede, W.A. and De Witte, P.A.M., 2002, Hypericin in cancer treatment: more light on the way, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 34, 221–241.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K.A., Foster, T.H., Girotti, A.W., Gollnick, S.O., et al., 2011, Photodynamic therapy of cancer: an update, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 61, 250–281.
- Ali, S.M., Chee, S.K., Yuen, G.Y. and Olivo, M., 2002, Hypocrellins and hypericin induced apoptosis in human tumor cells: A possible role of hydrogen peroxide, *International Journal of Molecular Medicine*. 9, 461–72.
- American Cancer Society, 1997, Cancer facts and figures. Available on line at: <http://www.cancer.org/>. Last accessed date: September 2011.
- American Cancer Society, 2011, Colorectal Cancer Facts & Figures is a publication of the American Cancer Society, Atlanta, Georgia. pp.1-32.
- American Society Of Clinical Oncology, 2005, PLWC Slide Deck Series: Understanding Colorectal Cancer.
- Aoki, S., Shimamura, T., Shibata, T., Nakanishi, Y., Moriya, Y., Sato, Y., Kitajima, M., Sakamoto, M. and Hirohashi, S., 2003, Prognostic significance of dysadherin expression in advanced colorectal carcinoma, *British Journal of Cancer*. 88, 726–732.
- Ashkenazi, A., 2002, Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2, 420-430.
- Ashkenazi, A., 2008, Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists, *Nature Reviews Drug Discovery*. 7, 1001-1012.
- Barile, M.F., 1979, Mycoplasma-tissue celi interactions in: *The Mycoplasmas*, Vol. 2. Tully JC, VVhitcomb, eds. New York, Academic Press. pp. 425-474.
- Batistatou, A., Charalabopoulos, A.K., Scopa, C.D., Nakanishi, Y., Kappas, A., Hirohashi, S., Agnantis, N.J. and Charalabopoulos, K., 2006, Expression patterns of dysadherin and E-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma, *Virchows Archive*. 448, 763–767.
- Berg, K., Moan, J., Bommer, J.C. and Winkelman, J.W., 1990, Cellular inhibition of microtubule assembly by photoactivated sulphonated meso-tetraphenylporphines, *International Journal of Radiation Biology*. 58, 475-487.

- Berghe, T.V., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W. and Vandenabeele, P., 2010, Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features, *Cell Death and Differentiation*. 17, 922–930.
- Bhuvaneshwari, R., Gan, Y.Y., Lucky, S.S., Chin, W.W.L., Ali, S.M., Soo, K.C. and Olivo, M., 2008, Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy, *Molecular Cancer*. 7, 56.
- Bignold, L.P., 2006, *Cancer: Cell structures, carcinogens and genomic instability*, Birkhauser, Switzerland, e-ISBN: 3-7643-7378-4, pp.25-45.
- Bild, A.H., Yao, G., Chang, J.T., Wang, Q., Potti, A., Chasse, D., Joshi, M.B., Harpole, D., Lancaster, J.M., Berchuck, A., Olson Jr.J.A., Marks, J.R., Dressman, H.K., West, M. and Nevins, J.R., 2006, Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies, *Nature*. 439, 353–357.
- Bodmer, W.F., 2006, Cancer genetics: colorectal cancer as a model, *Journal of Human Genetics*. 51,391–396.
- Brink, M., De Goeij, A.F.P.M., Weijnenberg, M.P., Roemen, G.M.J.M., Lentjes, M.H.F.M., Pachen, M.M.M., Smits, K.M., De Bruïne, A.P., Goldbohm, R.A. and Van Den Brandt, P.A., 2003, K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in the Netherlands cohort study, *Carcinogenesis*. 24 (4), 703-710.
- Brockmann, H., Haschad, M.N., Maier, K. and Pohl, F., 1939, Hypericin the photodynamically active pigment from *Hypericum perforatum*, *Naturwissenschaften*. 32, 550.
- Buda, A. and Pignatelli, M., 2004, Cytoskeletal network in colon cancer: From genes to clinical application, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36, 759–765.
- Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., 2005, *Klinik Kimyada Temel İlkeler*, Palme Yayıncılık. ISBN 975-8982133, syf. 360-364.
- Busuttil, G., 2011, Adenoma-carcinoma sequence colorectal pathology masterclass department of surgery mater dei hospital. <http://www.malttime.com/lecrures/Busuttil%20%20AdenomaCarcinoma%20Sequence.pdf>. Last accessed date: September 2011.
- Buytaert, E., Callewaert, G., Hendrickx, N., Scorrano, L., Hartmann, D., Missiaen, L., Vandenheede, J. R., Heirman, I., Grooten, J., and Agostinis, P., 2006, Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy, *The FASEB Journal*. 20, 756–8.
- Buytaert, E., Dewaele, M., and Agostinis, P., 2007, Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1776, 86–107.

- Büter, B., Orlacchio, C., Soldati A. and Berger. K., 1998, Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of hypericum perforatum, *Planta Medica*. 64, 431-437.
- Casciato, D.A. and Lowitz, B.B., 2000, *Manual of Clinical Oncology*, 4th edition Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, ISBN-13:978-0-7817-6884-9. pp. 2-19.
- Cecchini, C., Cresci, A., Coman, M.M., Ricciutelli, M., Sagratini, G., Vittori, S., Lucarini, D. and Maggi, F., 2007, Antimicrobial activity of seven Hypericum entities from central Italy, *Planta Medica*. 73, 564–566.
- Celli, J.P., Spring, B.Q., Rizvi, I., Evans, C.L., Samkoe, K.S., Verma, S., Pogue, B.W. and Hasan, T., 2010, Imaging and photodynamic therapy: Mechanisms, monitoring and optimization, *Chemical Reviews*. 12;110 (5), 2795-838.
- Chaloupka, R., Obsil, T., Plasek, J. and Sureau, F., 1999, The effect of hypericin and hypocrellin-A on lipid membranes and membrane potential of 3T3 fibroblasts, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1418, 39–47.
- Chan, P. S., Koon, H.K., Wu, Z.G., Wong, R.N.S., Lung, M.L., Chang, C.K. and Mak, N.K., 2009, Role of p38 MAPKs in Hypericin photodynamic therapy induced apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 85, 1207–1217.
- Chaturvedi, V. and Sreedhar, A.S., 2010, Hsp90 inhibition induces destabilization of actin cytoskeleton in tumor cells: Functional significance of Hsp90 interaction with F-actin, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. pp.715-722.
- Coates, T.D., Watts, R.G., Hartman, R. and Howard, T.H., 1992, Distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils, *The Journal of Cell Biology*. 117 (4), 765-774.
- Cott, J.M., 1997, In vitro receptor binding and enzyme inhibition by Hypericum perforatum extract, *Pharmacopsychiatry*. 30 (2), 108-12.
- Dahl, J.E., Mary, J., Frangou-Polyzois, M.J. and Polyzois, G.L., 2006, In vitro biocompatibility of denture relining materials, *Gerodontology*. 23, 17–22.
- Dahle, J., Steen, H.B. and Moan, J., 1999, The mode of cell death induced photodynamic treatment depends on cell density, *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 70, 363-367.
- Dang, C.V. and Semenza, G.L., 1999, Oncogenic alterations of metabolism, *Trends in Biochemical Sciences*. 24, 68-72.
- Deberardinis, R. J., Sayed, N., Ditsworth, D. and Thompson, C.B., 2008, Brick by brick: Metabolism and tumor cell growth, *Current Opinion in Genetics and Development*. 18, 54–61.
- Degar, S., Prince, A.M., Pascual, D., Lavie, G., Levin, B., and Mazur, Y., 1992, Inactivation of the human immunodeficiency virus by hypericin: Evidence for

photochemical alterations of p24 and a block in uncoating, *AIDS Researches and Human Retroviruses*. 8 (11), 1929-36.

DiPaola, R.S., 2002, To arrest or not to G2-M cell cycle arrest, *Clinical Cancer Research*. 8, 3311-3314.

Diwu, Z. and Lown, J.W., 1993, Photosensitization with anticancer agents 17. EPR studies of photodynamic action of hypericin: Formation of semiquinone radical and activated oxygen species on illumination, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 14, 209–15.

Dollinger, M. and Rosenbaum, E., 1997, *Everyone's guide to cancer therapy: How can cancer diagnosed, treated and managed day to day*. Toronto, Ontario, Canada, Somerville House Books Limited. ISBN: 0836236173, pp.430.

Dolmans, D.E.J.G.J., Fukumura, D. and Jain, R.K., 2003, Photodynamic therapy for cancer, *Nature Reviews Cancer*. 3, 380-387.

Doran, P.M., 1995, *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, San Diego, CA 92101, ISBN 0-12-220855-2, pp.275-276.

Dougherty, T.J., 1986, Photosensitization of malignant tumors, *Seminars in Surgical Oncology*. 2, 24-27.

Dougherty, T.J., Gomer, C.J. and Henderson, B.W., 1998, Photodynamic Therapy, *Journal of the National Cancer Institute*. 90 (12), 889-905.

Du, H., 2005, Hypericin mediated photodynamic therapy in nasopharyngeal cancer, PhD thesis, National University of Singapore.

Duo, H., Olivo, M., Mahendran, R. and Bay, B.H., 2004, Modulation of matrix metalloproteinase-1 in nasopharyngeal cancer cells by photoactivation of hypericin, *International Journal of Oncology*. 24, 657–662.

Edwards, B.K., Ward, E., Kohler, B.A., Ehemann, C., Zaubler, A.G., Anderson, R., Jemal, A., Schymura, M.J., Lansdorp-Vogelaar, I., Seeff, L.C., Van Ballegooijen, M., Goede, S.L. and Ries, L.A.G., 2010, Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, Featuring Colorectal Cancer Trends and Impact of Interventions to Reduce Future Rates, *Cancer*. 116 (3), 544–573.

Efstathiou, J.A. and Pignatelli, M., 1998, Modulation of epithelial cell adhesion in gastrointestinal homeostasis, *American Journal of Pathology*. 153, 341–347.

Eser, S., Olcayto, E., Karakılınç, H., Karaoğlanoğlu, O., Yakut, C., Ozalan, S., Üçüncü, N., Anbarcıoğlu, Z., Ergün, A., Akın, Ü., Yazıcı, M., Özdemir, R., Özgül, N. ve Tuncer, M., 2012, Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı, Nüfus Tabanlı Kansere Kayıt Merkezleri Veri Havuzu: Sekiz İl, 2004-2006 Değerlendirmesi. www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON. Son ulaşımla tarihi: Nisan 2012.

- European Pharmacopoeia, 2008, St. John's wort, In: European Pharmacopoeia (6thed.). Strasbourg, France: Council of Europe, pp.2958-2959.
- Fadeel, B. and Orrenius, S., 2005, Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease, *Journal of Internal Medicine*. 258, 479-517.
- Fadeel, B., Zhivotovsky B. and Orrenius, S., 1999, All along the watchtower: On the regulation of apoptosis regulators, *FASEB Journal*. 13, 1647–1657.
- Falk, H. and Schoppel, G., 1991, A synthesis of emodin anthrone, *Chemical Monthly*. 122, 739–44.
- Farkas, N.D., Langley, C., Rousseau, A.L., Yadav, D.B., Davids, H. and de Koning, C.B., 2011, 6-Substituted imidazo [1,2-a] pyridines: Synthesis and biological activity against colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2 *European Journal of Medicinal Chemistry*. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.07.036
- Fehr, M.J., Carpenter, S.L., Wannemuehler, Y. and Petrich, J.W., 1995, Roles of oxygen and photoinduced acidification in the light-dependent antiviral activity of hypocrellin A, *Biochemistry*. 34 (48), 15845-15848.
- Feron, O., 2009, Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells, *Radiotherapy and Oncology* 92, 329–333.
- Fingar, V.H., 1996, Vascular effects of photodynamic therapy, *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*. 14, 323-328.
- Fleury, C., Mignotte, B. and Vayssiere, J.L., 2002, Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling, *Biochimie*. 84,131-141.
- Fojo, T. and Bate, S., 2003, Strategies for reversing drug resistance, *Oncogene*. 22, 7512–7523.
- Foote, C.S., 1991, Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 54, 659.
- Fotakis, G. and Timbrell, J.A., 2006, In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*. 160, 171–177.
- Freshney, I., 2005, *Culture of animal cells: A manual of basic technique*, Fifth edition. pp, 350-351.
- Fu, X. and Kamps, M.P., 1997, E2a-Pbx1 induces aberrant expression of tissue-specific and developmentally regulated genes when expressed in NIH 3T3 fibroblasts, *Molecular Cell Biology*. 17, 1503–1512.
- Fulda, S., Meyer, E., Friesen, C., Susin, S.A., Kroemer, G. and Debatin, K.M., 2001, Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis, *Oncogene*. 20, 1063–1075.

- Galanou, M.C., Theodossiou, T.A., Tsiourvas, D., Sideratou, Z. and Paleos, C.M., 2008, Interactive transport, subcellular relocation and enhanced phototoxicity of hypericin encapsulated in guanidinylated liposomes via molecular recognition, *Photochemistry and Photobiology*. 84, 1073–83.
- Gardel, M.L., Shin J.H., MacKintosh, F.C., Mahadevan, L., Matsudaira, P. and Weitz, D.A., 2004, Elastic Behavior of Cross-Linked and Bundled Actin Networks, *Science*. 304 (5675), 1301-1305.
- Gatenby, R.A. and Gillies, R.J., 2004, Why do cancers have high aerobic glycolysis *Nature reviews, Cancer*. 4, 891-899.
- Gauthier, R., Harnois, C., Drolet, J.F., REED, J.C., Vezina, A. and Vachon, P.H., 2001, Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 280, C1540-C1554.
- Geering, K., 2006, FXYP proteins: New regulators of Na-K-ATPase, *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 290 (2), F241-250.
- Gilmore, T.D., 2006, Introduction to NF- κ B: Players, pathways, perspectives, *Oncogene*. 25 (51), 6680–6684.
- Girotti, A.W., 2001, Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 63,103-113.
- Gomer, C.J., Ferrario, A., Hayashi, N., Rucker, N., Szirth, B.C. and Murphree, A.L., 1988, Molecular, cellular, and tissue responses following photodynamic therapy, *Lasers in Surgery and Medicine*. 8 (5), 450-463.
- Gomer, C.J., Ryter, S.W., Ferrario, A., Rucker, N., Wong, S. and Fisher, A.M., 1996, Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins, *Cancer Research*. 56, 2355-2360.
- Grzanka, A., Grzanka, D., Orlikowska, M., 2003, Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines, *Biochemical pharmacology*. 66 (8),1611-1617.
- Häder, D.P. and Jori, G., 2003, Photodynamic Therapy, *Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences Volume:2, Chapter 1*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. ISBN 0-85404-306-3.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*. 100, 57-70.
- He, J., Agarwal, M.L., Larkin, H.E., Friedman, L.R., Xue, L.Y. and Oleinick, N.L. 1996, The induction of partial resistance to photodynamic therapy by the protooncogene BCL-2, *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 64, 845-852.
- Hendrickx, N., Volanti, C., Moens, U., Seternes, O.M., de Witte, P., Vandenheede, J.R., Piette, J. and Agostinis, P., 2003, Up-regulation of cyclooxygenase-2

and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells, *Journal of Biological Chemistry*. 278, 52231–52239.

Hendrickx, N., Dewaele, M., Buytaert, E., Marsboom, G., Janssens, S., van Boven, M., Vandenheede, J.R., de Witte, P. and Agostinis, P., 2005, Targeted inhibition of p38 α MAPK suppresses tumor-associated endothelial cell migration in response to hypericin-based photodynamic therapy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 337, 928–935.

Higuchi, A., Yamada, H., Yamada, E., Jo, N. and Matsumura, M., 2008, Hypericin inhibits pathological retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy, *Molecular Vision*. 14, 249–254.

Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regardh, C.G., Lipka, E., Amidon, G.L. and Langguth, P., 2000, Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 89, 63-75.

Hirohashi, S. and Kanai, Y., 2003, Cell adhesion system and human cancer morphogenesis, *Cancer Science*. 94, 575–581.

Ho, Y.F., Wu, M.H., Cheng, B.H., Chen, Y.W. and Shih, M.C., 2009, Lipid-mediated preferential localization of Hypericin in lipid membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788 (6), 1287–95.

Hoiroyde, C.P., Axelrod, R.S., Skutches, C.L., Haff, A.C., Paul, P. and Reichard, G.A., 1979, Lactate metabolism in patients with metastatic colorectal cancer, *Cancer Research*. 39, 4900-4904.

Hotulainen, P. and Lappalainen, P., 2006, Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells, *Journal of Cell Biology*. 173 (3), 383-94.

Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W., Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Eisner, M.P., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J., Cronin, K.A., Edwards, B.K., (eds), 2010, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/. Last accessed date: December 2011.

<http://cellix.imba.oeaw.ac.at/actin-cytoskeleton/>

<http://www2.sbg.ac.at/pr/News/news.shtml?kategorie=detail&id=12084>

Huang, D.C.S. and O'Reilly, L.A., 1997, Andreas Strasser and Suzanne Cory¹ The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry, *The EMBO Journal*. 16, 4628-4638.

Hulpiau, P. and Van Roy, F., 2009, Molecular evolution of the cadherin superfamily, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 41 (2), 349–69.

- IARC (International Agency For Research On Cancer), 2008, World Health Organisation, Cancer Fact sheet, Section of Cancer Information. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/colorectal.asp>. Last accessed date: April 2012.
- Ino, Y., Gotoh, M., Sakamoto, M., Tsukagoshi, K. and Hirohashi, S., 2002, Dysadherin a cancer associated cell membrane glycoprotein, down regulates E-cadherin and promotes metastasis, *Medical Science*. 99 (1), 365-370.
- Jendzelovský, R., Mike, J., Koval, K., Sou ek, K., Procházková, J., Kello, M., Saková, V., Hofmanová, J., Kozubík, A. and Fedoroko, P., 2009, Drug efflux transporters, MRP1 and BCRP, affect the outcome of hypericin-mediated photodynamic therapy in HT-29 adenocarcinoma cells, *Photochemical and Photobiological Sciences*. 8, 1716-1723.
- Jin, Z. and El-Deiry, W.S., 2005, Overview of cell death signaling pathways, *Cancer Biology and Therapy*. 4, 139-163.
- Johnson, S.A. and Pardini, R.S., 1998, Antioxidant enzyme response to hypericin in EMT6 mouse mammary carcinoma cells, *Free Radical Biology and Medicine*. 24 (5), 817-26.
- Johnson, S.A., Dalton, A.E. and Pardini, R.S., 1998 Time-Course of Hypericin Phototoxicity and Effect on Mitochondrial Energies in EMT6 Mouse Mammary Carcinoma Cells, *Free Radical Biology and Medicine*. 25 (2), 144–152.
- Kaçar, O. ve Azkan, N., 2004, Sarı Kantaron'da (*Hypericum Perforatum L.*) Hiperisin ve üst drog herba verimi ile bazı morfolojik ve agronomik özellikler arasındaki ilişkiler, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 18 (2), 109-122.
- Kah, J.C., Lau, W.K., Tan, P.H., Sheppard, C.J. and Olivo, M., 2008, Endoscopic image analysis of photosensitizer fluorescence as a promising noninvasive approach for pathological grading of bladder cancer in situ, *Journal of Biomedical Optics*. 13 (5), 054022.
- Kamuhabwa, A.R., Augustijns, P. and de Witte, P.A., 1999, In vitro transport and uptake of protohypericin and hypericin in the Caco-2 model, *International Journal of Pharmaceutics*. 188, 81–86.
- Kaplan, J.H., 2005, A moving new role for the sodium pump in epithelial cells and carcinomas, *Science Signaling The Signal Transduction Knowledge Enviroment*. 289, pp.31.
- Karaarslan, A. ve Özsan, M., 1998, Hücre kültürlerinde mikoplazma kontaminasyonu, *Ankara Üniversitesi Tıp Faültesi Mecmuası*. 51 (3), 169-172.
- Karioti, A. and Bilia, A.R., 2010, Hypericins as potential leads for new therapeutics, *International Journal of Molecular Sciences*. 11, 562-594.
- Kascakova, S., Nadova, Z., Mateasik, A., Mikeš, J., Huntosova, V., Refregiers, M., Sureau, F., Maurizot, J.C., Miskovsky, P. and Jancura, D., 2008, High level of

low-density lipoprotein receptors enhance hypericin uptake by U-87 MG cells in the presence of LDL, *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 84, 120–7.

- Kawashima, N. and Nakajima, N., 2011, Effect of photoactive pigment on photodynamic therapy for cancer cells, *Progress in Organic Coatings*. 72, 34-39.
- Kesici, D. ve Yıldırım, M., 2000, Fotodinamik tedavi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 7 (4), 37-45.
- Kick, G., Messer, G., Goetz, A., Plewig, G. and Kind, P., 1995, Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF-kappa B DNA binding, *Cancer Research*. 55, 2373-2379.
- Kiesslich, T., Plaetzer, K., Oberdanner, C.B., Berlanda, J., Obermair, F.J. and Krammer, B., 2005, Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction, *FEBS Letters*. 579, 185–190.
- Kleban, J., Mikeš, J., Horváth, V., Sačková, V., Hofmanová, J., Kozubík, A. and Fedoročko, P., 2008, Mechanisms involved in the cell cycle and apoptosis of HT-29 cells pre-treated with MK-886 prior to photodynamic therapy with hypericin, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 93, 108-118.
- Klotz, L.O., Holbrook, N.J. and Sies, H., 2001, UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events, *Current Problems in Dermatology*. 29, 95-113.
- Kocisova, E., Chinsky, L., Miskovsky, P., 1999, Sequence specific interaction of the photoactive drug hypericin depends on the structural arrangement and the stability of the structure containing its specific 5AG3 target: a resonance Raman spectroscopy study, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 17, 51–59.
- Kootstra, A., Florack, D.E.A., Gilissen, L.J.W., Bouwmeester, H.J., Booij, R. and Bino, R.J., 2001, *Plants for food and health*, Plant Research International BV Year Book, Wageningen, Netherlands.
- Korb, T., Schlüter, K., Enns, A., Spiegel, H.U., Senninger, N., Nicolson, G.L and Haiera, J., 2004, Integrity of actin fibers and microtubules influences metastatic tumor cell adhesion, *Experimental Cell Research*. 299, 236– 247.
- Korbelik, M., Naraparaju, V.R. and Yamamoto, N., 1997, Macrophage-directed immunotherapy as adjuvant to photodynamic therapy of cancer, *British Journal of Cancer*. 75, 202-207.
- Kraft, K., 2009, Complementary alternative medicine in the context of prevention of disease and maintenance of health, *Preventive Medicine*. 49, 88–92.
- Krammer, B. and Verwanger, T., 2012, Molecular Response to Hypericin-Induced Photodamage, *Current Medicinal Chemistry*. 19 (6), 793-798.

- Kreis, T. and Vale, R., 1999, Cytoskeletal and motor proteins, Oxford University Press, Oxford. ISBN-10: 0198599560, ISBN-13: 978-0198599562. pp, 11-15.
- Kubin, A., Wierrani, F., Burner, U., Alth, G. and Grünberger, W., 2005, Hypericin the facts about a controversial agent, *Current Pharmaceutical Design*. 11, 233-253.
- Kudo, S., Lambert, R., Allen, J.I., Fujii, H., Fujii, T., et al., 2008, Nonpolypoid neoplastic lesions of the colorectal mucosa, *Gastrointestinal Endoscopy*. 68 (4), 3-47.
- Lawson, K.R., Ignatenko, N.A., Piazza, G.A., Cui, H. and Gerner, E.W., 2000, Influence of K-ras Activation on the Survival Responses of Caco-2 Cells to the Chemopreventive Agents Sulindac and Difluoromethylornithine, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 9, 1155-1162.
- Legrand, C., Bour, J.M., Jacob, C., Capiamont, J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., Duval, D. and Hache, J., 1992, Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker, *Journal of Biotechnology*. 25, 231-243.
- Legrand, P.S., Schoonbroodta, S., Matroulea, J.Y. and Piette, J., 1998, NF- κ B: an important transcription factor in photobiology, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 45 (1), 1998, 1-8.
- Lev-Ari, S., Strier, L., Kazanov, D., Shapiro, L.M., Sobol, H.D., Pinchuk, I., Marian, B., Lichtenberg, D. and Arber, N., 2005, Celecoxib and Curcumin Synergistically Inhibit the Growth of Colorectal Cancer Cells, *Clinical Cancer Research*. 11 (18), 6738-6744.
- Levine, B. and Kroemer, G., 2008, Autophagy in the pathogenesis of disease, *Cell*. 132, 27-42.
- Liang, J.F., Zheng, H.X., Xiao, H., Li, N., Cheng, C.X. and Wang, H.K., 2009, Dysadherin expression in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) *Pathology-Research and Practice*. 205, 445-450.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X., 1996, Induction of apoptotic program in cell free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c, *Cell*. 86 (1), 147-57.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., et al., 2000, *Molecular Cell Biology*. Checkpoints in Cell-Cycle Regulation. 4th edition, New York, ISBN-10: 0-7167-3136-3. Chapter 13.7.
- Lu, Q.L., Hanby, A.M., Hajibagheri, M.A.N., Gschmeissner, S.E., Lu, P.J., Papadimitriou, J.T., Krajewski, S., Reed, J.C. and Wright, N.A., 1994, Bcl-2 protein localizes to the chromosomes of mitotic nuclei and is correlated with the cell cycle in cultured epithelial cell lines, *Journal of Cell Science*. 107, 363-371.

- Lubarski, I., Pihakaski-Maunsbach, K., Karlish, S.J., Maunsbach, A.B. and Garty, H., 2005, Interaction with the Na,K-ATPase and tissue distribution of FXD5 (related to ion channel), *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (45), 37717-24.
- Lubarski, I., Asher, C. and Garty, H., 2011, FXD5 (dysadherin) regulates the paracellular permeability in cultured kidney collecting duct cells, *American Journal of Physiology- Renal Physiology*. 301, F1270-F1280.
- Mancini, M., Machamer, C.E., Roy, S., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L.A. and Rosen, A., 2000, Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis, *Journal of Cell Biology*. 149, 603–612.
- Martin, M., Assmann, P.S., Kedinger, M., Martind, M., Mangeatd, P., Realá, F.X. and Fabrea, M., 2006, DCC regulates cell adhesion in human colon cancer derived HT-29 cells and associates with ezrin, *European Journal of Cell Biology*. 85, 769–783.
- Martínez-Alonso, M., González-Montalbán, N., García-Fruitós E. and Villaverde, A., 2009, Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies, *Microbial Cell Factories*. 8, 4. doi:10.1186/1475-2859-8-4.
- McCarrity, G.J. and Kotani, H., 1985, Pathogenesis of mycoplasma diseases, In *The Mycoplasmas*, Vol. IV, New York, Academic Press. pp, 353-90.
- McGahon, A.J., Martin, S.J., Bissonnette, R.P., Mahbaubi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., Nishioka, W.K. and Green, D.R., 1995, The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. In "Methods in Cell Biology, Vol 46, Cell Death", Academic Press, San Diego. pp,150-181.
- Mikeš, J., Kleban J., Sačková V., Horváth V., Jamborová, E., Vaculová, A., Kozubík, A., Hofmanová, J. and Fedoročko, P., 2007, Necrosis predominates in the cell death of human colon adenocarcinoma HT-29 cells treated under variable conditions of photodynamic therapy with hypericin, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Science. 6, 758-766.
- Miller, T.J., Knapton, A., Adeyemo, O., Noory, L., Weaver, J. and Hanig, J.P., 2008, Cytochrome c: a non-invasive biomarker of drug-induced liver injury, *Journal of Applied Toxicology*. 28, 815–828.
- Mitchell, D.M. and Ball, J.M., 2004, Characterization of a spontaneously polarizing HT-29 cell line, HT-29/cl.f8, *In vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*. 40, 297-301.
- Mohammadi, K., Kometiani, P., Xie, Z. and Askari, A., 2001, Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2, *Journal of Biological Chemistry*. 276, 42050–42056.
- Moor, A.C., 2000, Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 57, 1–13.

- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. and Yuan, J., 2000, Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloidbeta, *Nature*. 403, 98–103.
- Nam, J.S., Kang, M.J., Suchar, A.M., Shimamura, T., Kohn, E.A., Michalowska, A.M., Jordan, V.C., Hirohashi, S. and Chemokine, L.M., 2006, C–C motif ligand 2 mediates the prometastatic effect of dysadherin in human breast cancer cells, *Cancer Research*. 66, 7176–7184.
- Nam, J-S., Hirohashi, S. and Wakefield, L.M., 2007, Dysadherin: A New Player In Cancer Progression, *Cancer Letters*. 255, 161–169.
- National Cancer Institution (Ulusal Kanser Enstitüsü) <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/colon/Patient/page1>. Son ulaşma tarihi: Ocak, 2012.
- Neumann, C., Grünert, B.R. and Bednarski, P.J., 2003, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphateregenerating system coupled to a glutathione-reductase microtiter method for determination of total glutathione concentrations in adherent growing cancer cell lines, *Analytical Biochemistry*. 320, 170–178.
- Nobes, C.D. and Hall, A., 1995, Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell*. 81, 53-62.
- Obach, R.S., 2000, Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 294 (1), 88-95.
- Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Mae'da, Y., and Narita, A., 2009, The nature of the globular- to fibrous-actin transition, *Nature*. 457 (22), 441-445.
- Oleinick, N.L. and Evans, H.H., 1998, The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms, *Radiation Research*. 150, 146-156.
- Ormerod, M., 2011, Flow cytometry a basic introduction <http://www.denovosoftware.com/site/introtowormerod.shtml>. Last accessed date: September 2011.
- Park, J.R., Kim, R.J., Lee, Y.K., Kim, S.R., Roh, K.J., Oh, S.H., Kong, G., Kang, K.S. and Nam, J.S., 2011, Dysadherin can enhance tumorigenesis by conferring properties of stem-like cells to hepatocellular carcinoma cells, *Journal of Hepatology*. 54, 122–131.
- Patocka, J., 2003, The chemistry, pharmacology and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum L.*, *Journal of Applied Biomedicine*. 1, 61-70.
- Pazos, M.D.C. and Nader, H.B., 2007, Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 40, 1025-1035.

- Peters G.J., van Triest, B., Backus, H.H., Kuiper, C.M., van der Wilt, C.L. and Pinedo, H.M., 2000, Molecular downstream events and induction of thymidylate synthase in mutant and wild-type p53 colon cancer cell lines after treatment with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor raltitrexed, *European Journal of Cancer*. 36, 916–924.
- Porter, A.G. and Janicke, R.U., 1999, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death and Differentiation*. 6, 99-104.
- Prince, A.M., Pascual, D., Meruelo, D., Liebes, L., Mazur, Y., and Dubovi, E., 2000, Strategies for evaluation of enveloped virus inactivation in red cell concentrates using hypericin, *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 71 (2), 188-95.
- Raab, O., 1900, Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien, *Zeitung Biologie*. 39, 524–526.
- Rahman, M., 2006, Introduction to flow cytometry, Serotec Ltd. Oxford UK, Published by Serotec Ltd. www.ab-direct.com. Last accessed date: December 2011.
- Rai, P., Mallidi, S., Zheng, X., Rahmanzadeh, R., Mir, Y., Elrington, S., Khurshid, A. and Hasan, T., 2010, Development and applications of photo-triggered theranostic agents, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62, 1094–1124
- Ray, R.M., Bhattacharya, S. and Johnson, L.R., 2011, Mdm2 inhibition induces apoptosis in p53 deficient human colon cancer cells by activating p73- and E2F1-mediated expression of PUMA and Siva-1, *Apoptosis*. 16, 35–44.
- Reed, J.C., 1998, Bcl-2 family proteins, *Oncogene*. 17, 3225–3236.
- Ren, J.Z. and Huo, J.R., 2010, Effects of 5-Aza-CdR on expression and methylation of E-cadherin gene in human colon carcinoma cells, *Chinese Journal of Cancer*. 29, 38-42.
- Rodrigues, R., Rowan, A., Smith, M.E.F., Kerr, I.B., Bodmer, W.F., Gannon, J.V. and Lane, D.P., 1990, p53 mutations in colorectal cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87, 7555–7559.
- Rousset, N., Vonarx, V., Eléouet, S., Carré, J., Kerninon, E., Lajat, Y. and Patrice, T., 1999, Effects of photodynamic therapy on adhesion molecules and metastasis, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 52 (1-3), 65-73.
- Ryan, K., 2004, Plague and Other Bacterial Zoonotic Diseases. In: Sherris J.C., Ryan K.J., Ray C.G. (eds) *Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*. Fourth Edition. McGraw-Hill, USA, 481–491.
- Ryter, S.W. and Tyrrell, R.M., 1998, Singlet molecular oxygen (1O_2), a possible effector of eukaryotic gene expression, *Free Radical Biology and Medicine*. 24, 1520-1534.
- Sačková, V., Fedoročko, P., Szillardiová, B., Mikeš, J. and Kleban, J., 2006, Hypericin-induced Photocytotoxicity is Connected with G2/M Arrest in HT-29

- and S-Phase Arrest in U937 Cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 82 (5), 1285-1291.
- Sačková, V., Mikeš, J. and Fedoroc̣ko, P., 2007, Caspase-independent apoptosis induced by hypericin in HT-29 cells is associated with increased acid and neutral sphingomyelinase activity, *Programme and Book of Abstracts, 15th Euroconference on Apoptosis, Portoroz, Slovenia*, pp, 200.
- Salvador, A., 2008, Investigation about the mechanism of action of new antiproliferative compounds, PhD thesis, *Universita' Degli Studi Di Padova*.
- Sattler, S., Schaefer, U., Schneider, W., Hoelzl, J. and Lehr, C.M., 1997, Binding, uptake, and transport of hypericin, by Caco-2 cell monolayers, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 86, 1120–1126.
- Schreider, C., Peignon, G., Thenet, S., Chambaz J. and Pinçon-Raymond, M., 2002, Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin-actin complexes, *Journal of Cell Science*. 115, 543-552.
- Sen, P., Chakraborty, P.K. and Raha, S., 2007, Activation of p38MAPK by repetitive low-grade oxidative stress leads to prosurvival effects. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Cell Research*. 1773, 367–374.
- Sharman, W.M., Allen, C.M. and van Lier, J.E., 1999, Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications, *Drug Discoveries and Therapeutics*. 4, 507-517.
- Shimamura T., Yasuda, J., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuchiya, A., Nakajima, A., Sakamoto, M., Kanai, Y. and Hirohashi, S., 2004, Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells, *Cancer Research*. 64, 6989–6995.
- Siboni, G., Weitman, H., Freeman, D., Mazur, Y., Malik, Z. and Ehrenberg, B., 2002, The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells, *Photochemical and Photobiological Sciences*. 1, 483-491.
- Sivagami, G., Vinothkumar, R., Preethy, C.P., Riyasdeen, A., Akbarsha, M.A., Menon, V.P. and Nalini, N., 2012, Role of hesperetin, a natural flavonoid, and its analogue on apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cell line: A comparative study, *Food and Chemical Toxicology*. 50, 660–671.
- Sweadner, K.J. and Rael, E., 2000, The FXFD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression, *Genomics*. 68, 41–56.
- Taneli, F., 2007, Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı, 2007, *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 5 (2), 75-82.
- Tao, J., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Wong, G. and Levy, J.G., 1996, Stimulation of stress-activated protein kinase and p38 HOG1 kinase in murine keratinocytes

following photodynamic therapy with benzoporphyrin derivative, *The Journal of Biological Chemistry*. 271, 27107-27115.

- Tarnowski, B., Sens, D.A., Nicholson, J.H., Hazen-Martin, D.J., Garvin, A.J. and Sens, M.A., 1993, Automatic Quantification of Cell Growth and Determination of mitotic index using DAPI Nuclear Staining. *Pediatric Pathology*, 13, 249-265.
- Theodossiou, T.A., Hothersall, J.S., De Witte, P.A., Pantos, A. and Agostinis, P., 2009, The multifaceted photocytotoxic profile of hypericin, *Molecular pharmaceutics*. 6 (6), 1775–1789.
- Thomas, C. and Pardini, R.S., 1992, Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 55, 831–837.
- Tsuji, H., Takasaki, S., Sakamoto, M., Irimura, T. and Hirohashi, S., 2003, Aberrant O-glycosylation inhibits stable expression of dysadherin, a carcinoma-associated antigen, and facilitates cell-cell adhesion, *Glycobiology*. 13, 521–527.
- Tsuji, M., Kawano, S. and Dubois, R.N.D., 1997, Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94, 3336-3340.
- Ulukaya, E., 2001, Akciğer Kanseri Tanı Ve Tedavide Temel İlkeler Ve Uygulamalar, <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>. Son ulaşma tarihi: Aralık, 2011.
- Upton, R., 1997, St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), *American Herbal Pharmacopoe*, Santa Cruz, CA, USA. pp. 1-32.
- Uzdensky, A.B., Ma, L.W., Iani, V., Hjortland, G.O., Steen, H.B. and Moan, J., 2001, Intracellular localisation of Hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines, *Lasers in Medical Science*. 16, 276–283.
- Vandenbogaerde, A.L., Kamuhabwa, A., Delaey, E., Himpens, B.E., Merlevede, W.J. and de Witte, P.A., 1998, Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 45, 87-94.
- Vantieghe, A., Xu, Y., Declercq, W., Vandenabeele, P., Vandenheede, J.R., Denecker, G., Merlevede, W., deWitte, P.A.M. and Agostinis, P., 2001, Different pathways mediate cytochrome c release after photodynamic therapy with hypericin, *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 74, 133–142.
- Vantieghe, A., Xu, Y., Assefa, Z., Piette, J., Vandenheede, J.R., Merlevede, W., de Witte, P.A.M. and Agostinis, P., 2002, Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with Hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis, *The Journal Of Biological Chemistry*. 277 (40), 37718–37731.

- Verrico, A.K. and Moore, J.V., 1997, Expression of the collagen-related heat shock protein HSP47 in fibroblasts treated with hyperthermia or photodynamic therapy, *British Journal of Cancer*. 76 (6), 719-24.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M. and Bos, J.L., 1988, Genetic alterations during colorectal-tumor development, *The New England Journal of Medicine*. 319 (9), 525-32.
- Wicki, A. and F. Lehembre, 2006, Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton, *Cancer Cell*. 9 (4), 261-272.
- Wielgus, A.,R., Chignell, C.F., Miller, D.S., Van Houten, B., Meyer, J., Hu, D.N. and Roberts, J.E., 2007, Phototoxicity in Human Retinal Pigment Epithelial Cells Promoted by Hypericin, a Component of St. John's Wort, *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 83 (3), 706–713.
- Wilson, J.D., Bigelow, C.E., Calkins, D.J. and Foster, T.H., 2005, Light scattering from intact cells reports oxidative stress induced mitochondrial swelling, *Biophysical Journal (Biophysical Society)*. 88 (4), 2929–2938.
- Wolfe, S.L., 1994, *Biologia molecolare e cellulare*, EdiSES Napoli Italy. pp. 1006-1048.
- Wu, M.H., Hong, T.M., Cheng, H.W., Pan, S.H., et al., 2009, Galectin-1-Mediated Tumor Invasion and Metastasis, Up-Regulated Matrix Metalloproteinase Expression, and Reorganized Actin Cytoskeletons, *Molecular Cancer Research*. 7, 311-318.
- Xue, L.Y., Chiu, S.M. and Oleinick, N.L., 2001, Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: A role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event, *Experimental Cell Research*. 263, 145–155.
- Yamazaki, D., Kurisu, S. and Takenawa, T., 2005, Regulation of cancer cell motility through actin reorganization, *Cancer Science*. 96 (7) 379–386.
- Yamazaki, T., Yamazaki, I., Nishimura, Y., Dai, R. and Song, P.S., 1993, Time-resolved fluorescence spectroscopy and photolysis of the photoreceptor blepharismine, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1143, 319-326.
- Yang, Z.R., Liu, M., Peng, X.L., Lei, X.F., Zhang, J.X. and Dong, W.G., 2012, Noscapine induces mitochondria-mediated apoptosis in human colon cancer cells in vivo and in vitro, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.079>.
- Yardım, N. ve Mollahaliloğlu, S., 2007, Türkiye’de Kanser Kontrolü. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü. Syf. 113-130.

- Yılmaz, S. ve Devran, Z., 2003, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları. (<http://www.batem.gov.tr/yayinlar/derim/2003/31-42.pdf>). Son ulaşma tarihi: 7 Aralık 2011.
- Ying, L., and Bodmer, W.F., 2005, Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103 (4), 976–981.
- Yoo, J.O. and Ha, K.S., 2012, New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death, *International Review of Cell and Molecular Biology*. 295, 139-74.
- Youngs S.J., Ali, S.A., Taub, D.D. and Rees, R.C., 1997, Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines, *International Journal of Cancer*. 71, 257–266.
- Zhoua, M., Crawforda, Y., Nga, D., Tunga, J., Pynna, A.F.J., Meiera, A., Yuka, I.H., Vijayasankaranb, N., Leacha, K., Joly, J., Snedecora, B. and Shena, A., 2011, Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases, *Journal of Biotechnology*. 153, 27–34.
- Zong, W.X. and Thompson, C.B., 2006, Necrotic death as a cell fate, *Genes and Development*. 20, 1-15.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aysun KILIÇ

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1982

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1996-1999 TED Ankara Koleji

Lisans : 1999-2003 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi : 2005- Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma görevlisi

