

**THP-1 KÖKENLİ M1 MAKROFAJ HÜCRELERİ İLE İNDÜKLENEN
NÖROİNFLAMATUAR YANITIN DÜZENLENMESİNDE PROTOKATEŞÜİK
ASİT' İN ETKİLERİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ARAŞTIRILMASI**

Fidan BAYRAMOVA

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ

(İkinci Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN)

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ağustos 2021

ÖZET

THP-1 KÖKENLİ M1 MAKROFAJ HÜCRELERİ İLE İNDÜKLENEN NÖROİNFLAMATUAR YANITIN DÜZENLENMESİNDE PROTOKATEŞUİK ASİT' İN ETKİLERİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ARAŞTIRILMASI

Fidan BAYRAMOVA

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ağustos 2021

Danışman: Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ

(İkinci Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN)

Beyin tümörleri, beyindeki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak kitle oluşturması sonucu oluşur ve en yaygın beyin tümörü gliomlardır. Gliomlar çok az proliferasyona sahip olmakla birlikte sağlıklı dokulara metastaz yaparak, radioterapi ve cerrahi yolla tedavi edilemez duruma gelir.

Protokateşuik asit (3,4-dihidrobenzoik asit, PCA) bitkilerde yaygın olarak bulunan, suda ve alkolde çözünebilen bir kristalik fenolik bileşiktir. Polifenollerin başlıca biyoaktif metaboliti olmasının yanısıra, antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuvar, antiapoptotik ve antiproliferatif etkiler göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda PCA' nın bu biyolojik aktivitelerinin ön plana çıkması nedeniyle bu tez çalışmasında PCA' nın C6 sıçan glioma hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. PCA' nın etkileri hem tek başına C6 sıçan glioma hücreleri üzerinde, hemde THP-1 insan monosit hücrelerinden farklılaştırılan M1 makrofaj sitokin ortamında araştırılmıştır. PCA' nın C6 sıçan glioma hücrelerinde ilk olarak WST-1 yöntemi ile toksik olan ve olmayan konsantrasyonları belirlenmiştir. Daha sonra THP-1 monosit hücreleri, sırasıyla M0 ve M1 makrofajlara farklılaştırılarak, M1 makrofajlarda IL-1 β ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile çalışmalarının doğruluğu belirlenmiştir. Daha sonra PCA konsantrasyonlarının; C6 sıçan glioma hücreleri üzerinde akridin oranj/propidyum

iyodür boyama ile anti-apoptotik etkileri, çizik testi ve RTCA-DP analiz sistemi ile hücre migrasyonuna etkileri, koloni formasyonu üzerine etkileri, PCNA immünfloresan yöntemi ile antiproliferatif etkileri ve tek hücre jel elektroforezi (SCGE) yöntemiyle de DNA hasarına olan etkileri araştırılmıştır.

C6 hücreleri için WST-1 yöntemi sonucu PCA' nın 24, 48 ve 72 saatlik IC₅₀ değerleri sırasıyla 1.7, 2.8 ve 3.8 mM olarak belirlenmiştir. RTCA-DP kullanılarak yapılan proliferasyon değerlendirmesinde de 72 saatlik IC₅₀ değeri 3.8 mM olarak belirlenmiştir. PCA, C6 hücrelerinde ve M1 makrofaj sitokin ortamında (inflamasyon ortamı) anlamlı düzeyde anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkiler göstermiştir. Bununla birlikte inflamasyon ortamında, PCA' nın anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkilerini arttırdığı belirlenmiştir. PCA konsantrasyon artışına bağlı olarak, C6 hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri ve migrasyonu etkileri azalırken, inflamasyon ortamında C6 hücre migrasyon yetenekleri artış göstermiştir. Ancak inflamasyon ortamında artan hücre migrasyonu ise PCA konsantrasyon artışına paralel olarak azalmıştır. PCNA yöntemi ile PCA konsantrasyonlarının C6 hücrelerinde hem tek başına, hem de M1-1 sitokin ortamı uygulanan grupların artan konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunun anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir. PCA' nın 3.8 ve 5 mM konsantrasyonları DNA hasarını önemli ölçüde arttırmış, M1-1 kontrol grubu ise PCA gruplarına oranla DNA hasarına daha az neden olmuş ve aynı zamanda M1-1'in PCA ile beraber uygulandığı gruplarda C6 hücrelerine tek başına PCA uygulanan gruplara oranla DNA hasarını daha fazla arttırdığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: C6, Protokateşuik asit (PCA), PCNA, Apoptoz, DNA hasarı..

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PROTOCATECHUECUIC ACID IN CELL CULTURE ON REGULATING THE NEUROINFLAMMATORY RESPONSE INDUCED BY M1 MACROPHAGE CELLS OF THP-1 ORIGIN

Fidan BAYRAMOVA

Department of Advanced Technologies

Programme in Biotechnology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, August 2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ

(Co-Supervisor: Prof. Dr. Miriş DİKMEN)

Brain tumors occur when cells in the brain multiply uncontrollably and form a mass, and the most common brain tumor is gliomas. Although gliomas have very little proliferation, they metastasize to healthy tissues and become untreatable by radiotherapy and surgery.

Protocatechuic acid (3,4-dihydrobenzoic acid, PCA) is a water- and alcohol-soluble crystalline phenolic compound commonly found in plants. In addition to being the main bioactive metabolite of polyphenols, it has antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antiapoptotic and antiproliferative effects. Since these biological activities of PCA have come to the fore in recent studies, it was aimed to determine the effects of PCA on C6 rat glioma cells in this thesis study. The effects of PCA were investigated both on C6 rat glioma cells alone and in M1 macrophage cytokine medium differentiated from THP-1 human monocyte cells. Firstly, non-toxic and non-toxic doses of PCA were determined in C6 rat glioma cells by WST-1 method. Then, THP-1 monocyte cells were differentiated into M0 and M1 macrophages, respectively, and IL-1 β and TNF- α mRNA expression levels in M1 macrophages were determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Then PCA concentrations; Anti-apoptotic effects with acridine orange/propidium iodide staining on C6 rat glioma cells, effects on cell migration with scratch test and RTCA-DP analysis system, effects on colony formation, antiproliferative effects with PCNA immunofluorescence method and single

cell gel electrophoresis (SCGE) method. The effects on DNA damage were also investigated.

As a result of WST-1 method for C6 cells, IC₅₀ values of PCA at 24, 48 and 72 hours were determined as 1.7, 2.8 and 3.8 mM, respectively. In the proliferation evaluation using RTCA-DP, the 72 hour IC₅₀ value was determined as 3.8 mM. PCA showed significant anti-proliferative and anti-apoptotic effects in C6 cells and M1 macrophage cytokine medium (inflammation medium). However, in the environment of inflammation, it was determined that PCA increased its anti-proliferative and anti-apoptotic effects. Depending on the increase in PCA concentration, the colony forming abilities and migration effects of C6 cells decreased, while the migration abilities of C6 cells increased in the inflammatory environment. However, increased cell migration in the inflammatory environment decreased in parallel with the increase in PCA concentration. With PCNA method, it was observed that cell proliferation decreased significantly in C6 cells, both alone and in increasing concentrations of the groups treated with M1-1 cytokine medium. 3.8 and 5 mM concentrations of PCA significantly increased DNA damage. It has been observed to increase DNA damage more.

Keywords: C6, Protocatechuic acid (PCA), PCNA, Apoptosis, DNA damage..

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında desteğini esirgemeyen, bana tezimin doğru bir şekilde yönlendirilip sonuçlanmasında her daim yardımcı olan ve yol gösteren, ailemden uzakta olduğumu hissettirmeyecek kadar sevgilerini hissettiğim değerli danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ ve Sayın Prof. Dr. Miriş DİKMEN' e

Fikirleri ve görüşlerine önem verdiğim, yardımını, bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Zerrin KAHRAMAN CANTÜRK' e

Laboratuvar çalışmalarımda bana destek olan, bilgi ve birikimini benden hiçbir zaman esirgemeyen hocam Arş. Gör. Dr. Elif KAYA TILKI' ye

Pozitif enerjisi ile her daim destekçim olan hocam Arş. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA'ya ve arkadaşım Perihan Ezgi TUNCER' e

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren sorduğum bütün sorulara usanmadan cevap veren, laboratuvar bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan arkadaşım Nalan BİRİZ' e ve Banu Büşra AKGÜL'e

Laboratuvar ve cihaz olanaklarından faydalandığım ve kazandığım tüm mesleki tecrübeler için hem Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na hem de Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı ve Farmakoloji Anabilim Dalının tüm saygıdeğer üyelerine,

Yüksek lisans eğitimim sürecinde uzakta olmalarına rağmen maddi ve manevi desteklerini esirgemediğim yanımda olan, her zaman en iyisini başaracağıma en az benim kadar inanan canım aileme ve

Eğitim alanımız farklı olsa bile bütün deney sonuçlarımı benimle beraber yorumlamaya çalışan, en büyük destekçim sevgili eşim Kamran MEHDİYEV' e

sonsuz teşekkür ederim.

Fidan BAYRAMOVA

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Fidan BAYRAMOVA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser	2
1.1.1. Kanser gelişiminde inflamasyon' un rolü	3
1.2. Beyin Tümörleri	5
1.2.1. Beyin tümörleri ve inflamasyon	6
1.3. Polifenoller	7
1.3.1. Protokateşuik Asit (3,4-Dihidrobenzoik asit, PCA)	9
1.3.2. PCA ve inflamasyon ilişkisi	10
1.4. Hücre Ölüm Mekanizmaları	11
1.4.1. Apoptoz.....	12
1.4.1.1. Apoptoz Yolakları.....	13
1.4.2. Nekroz.....	15
1.4.3. Otofaji.....	15
1.5. Çoğalan Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA)	15
2. MATERYEL VE YÖNTEM.....	17
2.1. Deneylerde Kullanılan Hücre Hatları	17
2.1.1. C6 Glioma Hücre Hattı.....	17

2.1.2. THP-1 Monosit Hücre Hattı.....	18
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Laboratuvar Gereçleri.....	18
2.3. Kullanılan Laboratuvar Cihazları	20
2.4. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi.....	21
2.5. Kullanılan maddelerin hazırlanması.....	22
2.5.1. Protokatesuik asit (PCA)	22
2.5.2. Karmustin	22
2.5.3. Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA)	22
2.5.4. Lipopolisakkarit (LPS E. coli 0111: B4).....	22
2.5.5. Rekombinant insan IFN- γ	23
2.5.6. Akridin Oranj (AO)/ Propidyum İyodür (PI)	23
2.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	23
2.6.1. Hücre hatlarının çoğaltılması.....	23
2.6.1.1. C6 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık.....	23
2.6.1.2. THP-1 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık.....	24
2.6.2. Hücre sayımı	25
2.6.2.1. C6 hücrelerinin sayımı	25
2.6.2.2. THP-1 hücrelerinin sayımı.....	25
2.6.3. WST-1 yöntemi ile C6 hücrelerinde PCA' nın sitotoksik etkileri.....	25
2.6.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA-DP) C6 Hücrelerinde Protokatesuik asit (PCA)' in Anti – Proliferatif Etkilerinin Belirlenmesi.....	27
2.6.5. THP-1 insan monosit hücrelerinin makrofaja farklılaştırılma çalışmaları	28
2.6.5.1. THP-1 insan monosit hücrelerinin THP-1 kökenli makrofaja (M0) farklılaştırılması	28
2.6.5.2. THP-1 kökenli makrofaj (M0) hücrelerinin, M1 polarize alt türüne farklılaştırılması.....	29
2.6.6. Gerçek Zamanlı Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) çalışmaları	29

2.6.6.1. THP-1 kökenli makrofaj (M0) hücrelerinin M1 polarize alt türüne farklılaştırılması çalışmasının RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi.....	29
2.6.7. M1 makrofajlardan salgılanan sitokin ortamında protokateşuik asit (PCA)'nın C6 hücrelere hücre canlılığı üzerine etkileri	31
2.6.8. Migrasyon Analizi Çalışmaları	32
2.6.8.1. Çizik Deneyi (Hücre migrasyonu).....	32
2.6.8.2. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA-DP) C6 Hücrelerinin Migrasyon analizi.....	33
2.6.9. Akridin Oranj/ Propidyum İyodür (AO/PI) Boyama Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Belirlenmesi	34
2.6.10. Koloni Formasyon (Agaroz koloni - 3D) Analizi	35
2.6.11. Çoğalan Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) İle İmmünofloresan İnceleme	36
2.6.12. Tek Hücre Jel Elektrofrez (SCGE) Yöntemi	38
2.6.13. İstatistiksel Analiz.....	39
3. BULGULAR.....	40
3.1. WST-1 yöntemi ile C6 hücrelerinde PCA' nın sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	40
3.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak C6 Hücrelerinin PCA için IC50 Değerlerinin Değerlendirilmesi	41
3.3. THP-1 monosit hücrelerinin makrofaja farklılaşma çalışmaları	42
3.4. RT-PCR çalışmalarının değerlendirilmesi	43
3.4.1. THP-1 kökenli makrofaj hücrelerinin M1 polarize alt türüne farklılaştırılması çalışmalarının RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi	43
3.5. WST-1 yöntemi ile M1 makrofajlardan salgılanan sitokin ortamında PCA' nın C6 hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi	44
3.6. Migrasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	46
3.6.1. Çizik deneyi ile C6 glioma hücrelerinin göç etme (migrasyon) yeteneklerinin değerlendirilmesi.....	46

3.6.2. PCA' nın C6 hücrelerinde hücre migrasyonuna etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA-DP) kullanılarak değerlendirilmesi	49
3.7. Akridin Oranj/ Propidyum İyodür (AO/PI) Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Belirlenmesi	51
3.8. PCA' nın C6 Glioma Hücrelerinde Koloni Formasyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	60
3.9. Çoğalan Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) İle İmmünofloresan İncelemenin Değerlendirilmesi	62
3.10. Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) Bulguları	64
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKÇA.....	75
ÖZGEÇMİŞ	91

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Protokatesuik asidin farmakolojik aktiviteleri (Khan vd.,2015).....	10
Tablo 2.1. Genlerin dizilimleri.....	31
Tablo 3.1. C6 hücrelerinin % canlılıkları (Kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir).....	41
Tablo 3.2. C6 hücrelerinin % canlılık değerleri (Kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir).	45
Tablo 3.3. C6 hücrelerinin floresan ölçümlerden elde edilen % canlılık değerler (Kontrolün.....	53
Tablo 3.4. SCGE analiz sonuçları (Ortalama± Standart sapma).....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Yara iyileşmesine karşı invaziv tümör büyümesi: a, Normal dokular; b, İnvaziv.....	4
Şekil 1.2. Glioblastomda iltihaplanma kaskadı ve karmaşık sinyal yolları(Bharat vd., 2014).	7
Şekil 1.3. Fenolün moleküler ve yapısal formülü (http-3)	8
Şekil 1.4. <i>Polifenollerin temel ve alt sınıfları (http-4)</i>	8
Şekil 1.5. Protokateşuik asit'in (3,4-Dihidroksibenzoik asit (PCA) kimyasal yapısı (http-5)	9
Şekil 1.6. Hücre ölüm mekanizmaları (http-6).	12
Şekil 1.7. İntrinsik (mitokondriyal) ve Ekstrinsik (ligandlar / ölüm reseptörleri) hücre ölüm yolları	14
Şekil 2.1. C6 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü: A-10X; B-20X.....	24
Şekil 2.2. THP-1 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü: A-10X; B-20X.....	25
Şekil 2.3. WST-1 boyasının kimyasal yapısı (http-7)	26
Şekil 2.4. Migrasyon Çalışmasında Kullanılan 16 Kuyucuklu CIM Plaka (http-8).....	33
Şekil 3.1. C6 hücre hattında Protokateşuik asit (PCA) konsantrasyonlarının WST-1 yöntemi ile	40
Şekil 3.2. PCA konsantrasyonlarının 72 saatlik C6 hücre proliferasyon eğrisi (sarı)	41
Şekil 3.3. RTCA- DP sisteminde PCA' nın C6 hücrelerinde 72. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC^{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon- hücre indeksi eğrisi (IC_{50} : 3,8 mM).....	42
Şekil 3.4. RTCA- DP sisteminde C6 hücreleri üzerinde PCA konsantrasyonlarının 72. saatteki	42
Şekil 3.5. THP-1 kökenli M0 makrofajların mikroskop altındaki görüntüsü: A- 10X;B-20X.....	43
Şekil 3.6. M1 polarize makrofajların mikroskop altındaki görüntüsü: A-10X; B- 20X.....	43
Şekil 3.7. M1 polarize makrofaj ilişkili genlere ait mRNA ekspresyonları, THP-1 kontrol grubuna	44
Şekil 3.8. M1-1 sitokin ortamında PCA' nın C6 hücrelerinde WST-1 yöntemi ile hesaplanmış 24 ve	45

Şekil 3.9. PCA' nın C6 hücre migrasyonu üzerinde 0., 24 ve 48. saatteki %çizik genişlikleri ve.....	46
Şekil 3.10. PCA' nın C6 hücreleri üzerinde yara iyileştirici etkisinin 0. saat görüntüleri (10X)	47
Şekil 3.11. PCA' nın C6 hücreleri üzerinde yara iyileştirici etkilerinin 24. saatteki görüntüleri (10X)	48
Şekil 3.12. PCA' nın C6 hücreleri üzerinde yara iyileştirici etkilerinin 48. Saatteki görüntüleri (10X)	49
Şekil 3.13. RTCA DP sisteminde C6 glioma hücreleri üzerinde PCA ve M1 + PCA.....	50
Şekil 3.14. RTCA DP sisteminde C6 glioma hücreleri üzerinde PCA ve M1 + PCA.....	50
Şekil 3.15. RTCA DP sisteminde C6 glioma hücreleri üzerinde PCA ve M1 + PCA.....	51
Şekil 3.16. RTCA DP sisteminde C6 glioma hücreleri üzerinde PCA ve M1 + PCA.....	51
Şekil 3.17. PCA' nın 24 saatlik inkübasyon sonunda C6 hücreleri üzerinde AO/PI boyama.....	52
Şekil 3.18. C6 hücrelerinde kontrol grubunun AO/PI boyama sonucu mikroskopik görüntüleri (10X).	54
Şekil 3.19. 300 µM Karmustinle muamele edilmiş C6 hücrelerinin AO/PI boyama sonucu	55
Şekil 3.20. 3.8 mM PCA ile muamele edilmiş C6 hücrelerinde apoptozun mikroskopik tespiti.....	56
Şekil 3.21. 5 mM PCA ile muamele edilmiş C6 hücrelerinde apoptozun mikroskopik tespiti.....	57
Şekil 3.22. C6 hücrelerinde M1 kontrol grubunun AO/PI çift boyama sonucu apoptozun	58
Şekil 3.23. C6 hücrelerine M1 + 3.8 mM PCA muamelesi sonucu apoptozun mikroskopik tespiti.....	59
Şekil 3.24. C6 hücrelerine M1+5 mM PCA muamelesi sonucu apoptozun mikroskopik tespiti.....	60

Şekil 3.25. PCA' nın C6 hücrelerinde 14. günde koloni oluşumu üzerindeki etkileri (10X): A-	61
Şekil 3.26. PCA' nın C6 hücreleri üzerinde % koloni formasyon değerleri ve istatistiksel analizi:	62
Şekil 3.27. PCA' nın C6 hücre proliferasyonu üzerine PCNA ekspresyonunun istatistiksel olarak.....	63
Şekil 3.28. C6 (A) Kontrol ve (B) pozitif kontrol (Karmustin) gruplarının PCNA ekspresyonu.....	63
Şekil 3.29. (C) 3.8 mM PCA, (D) 5 mM PCA gruplarında PCNA ekspresyonu görüntüleri (10X)	64
Şekil 3.30. (E) M1-1 kontrol, (F) M1-1+ 3.8 mM PCA, (G) M1-1 + 5 mM PCA gruplarında PCNA	64
Şekil 3.31. SCGE analiz sonuç grafiği: a. Kontrol grubuna göre, b. M1 Kontrol grubuna göre, c.....	65
Şekil 3.32. SCGE analiziinin temsili Görüntü: a:Kontrol; b:M1-1 Kontrol; c:PCA 3.8;mM;.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Alpha
B	: Beta
ANOVA	: Varyans Analizi
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BSA	: Bovine Serum Albumin
CI	: Hücre İndeksi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
FBS	: Fötal Sığır Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Gr-	: Gram negatif
IC50	: %50 İnhibitör Konsantrasyon
IL	: İnterlökin
IL-1 β	: İnterlökin 1 Beta
IFN- γ	: İnterferon –gamma
LPS	: Lipopolisakkarit
WST-1	: 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate
ort $\pm$	: Ortalama
PBS	: Phosphate buffered saline (Fosfat ile tamponlanmış tuz)
Pen-Strep	: Penisilin-Streptomisin
PCA	: Protokareşik Asit

PCNA	: Prolifere hücre çekirdek antijeni
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	: Rounds per munte (Dakikadaki dönüş sayısı)
RPMI	: Roswell Park Memorial Institue
RTCA DP	: xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi
THP-1	: İnsan monositik lösemi hücre hattı
TNF	: Tümör Nekroz Faktör



1. GİRİŞ

Kanser vücudun herhangi bir bölgesinde hücrelerin düzensiz çoğalmasıyla meydana gelen hastalık grubuna verilen genel isimdir. Hücrelerin düzensiz çoğalmasına neden ise hücre içerisinde DNA hasarının birikmesidir (Baykara, 2016) .

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) alt kuruluşlarından biri olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) 2020 yılının kanser oranına ait son tahminleri yayınlamıştır. Bu tahminlere göre 19.3 milyon yeni vaka sayısı ve 10 milyon yaşam kaybı bilinmektedir. Dünya genelinde her 5 kişiden biri ömür boyu kansere yakalanma olasılığına sahiptir. Erkeklerde kansere yakalanma olasılığı kadınlardan yüksektir. Öyle ki, istatistiklere göre her 8 erkekten biri kansere yakalanırken, her 11 kadından birinin kansere yakalanma durumu vardır (<http-1>).

Bir hastalık grubu olan kanserin günümüzde 150 türü vardır. Bunun yanı sıra alt ve çok az oranda rastlanan nadir türleriyle birlikte 1000' nin üzerinde bir rakama ulaşmaktadır. Dünya genelinde en sık karşılaşılan kanser türü akciğer ve meme kanseridir. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi beyin tümörlerinin de oluşum nedenleri ile ilgili tek veya birden fazla kaynağa işaret eden net bir bilgi yoktur.

Beyin tümörleri iyi huylu ve kötü huylu tümörler olarak iki gruba ayrılır. Aynı zamanda beyin içinde başlayan birincil tümörler ve en yaygın olarak beyin dışında yer alan tümörlerden yayılan ve beyin metastazı tümörleri olarak bilinen ikincil tümörler olarak sınıflandırılabilir. Tümör boyutuna ve beyinin etkilediği kısmına göre farklı tümörler farklı semptomlara neden olabilir. Baş ağrıları, nöbetler, görme sorunları, kusma ve zihinsel değişiklikler tümör belirtileridir. Hastalığın daha ağır belirtileri arasında yürümede, konuşmada, duylarda zorluk veya bilinç kaybı yer almaktadır (Lisa ve DeAngelis, 2001).

Beyin tümörlerinde diğer yaygın kanser türlerinden farklı olarak hücre proliferasyonu çok az gözlemlenmektedir. Ancak bu tümörler metastaza uğrayarak sağlıklı beyine sızdığında cerrahi ve radyoterapi ile tedavi edilemez duruma gelir.

Bu tez çalışması kapsamında C6 sıçan glioma kanser hücrelerine protokatesuik asit' in (PCA) sitotoksik etkileri WST-1 yöntemi bir taramaya tabi tutulmuş ve toksik olan ve toksik olmayan konsantrasyonları belirlenmiştir. Daha sonra Xcelligence gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Belirlenen IC₅₀ değerleri

kullanılarak C6 hücrelerinde PCA' nın yara iyileştirici etkileri ve koloni formasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda C6 hücreleri ile THP-1 insan monosit hücrelerinden farklılaştırılmış M1 makrofaj *in vitro* ko kültür modeli oluşturulmuştur.

THP-1 kökenli M0 makrofajlardan M1 polarize makrofajların farklılaşmasının doğrulanması yapılmıştır. M1 polarize makrofajların C6 sıçan glioma hücrelerinde anti-proliferatif etkileri WST-1 sitotoksitesite yöntemi ile araştırılmıştır. Ayrıca, Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile makrofajlarda IL-1 β ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir.

Çalışmada, PCA' nın hem tek başına C6 glioma hücreleri üzerinde, hem de oluşturulan inflamasyon kültür modelindeki etkileri araştırılmıştır. C6 sıçan glioma hücreleri üzerine PCA konsantrasyonlarının akridin oranj ve propidyum iyodür boyama yöntemi ile anti-apoptotik etkileri, çizik testi ve RTCA DP analiz sistemi ile hücre migrasyonuna etkileri, koloni formasyonu üzerine etkileri, PCNA immünfloresan yöntemi ile anti-proliferatif etki ve tek hücre jel elektroforezi (SCGE) yöntemi ile DNA hasarı üzerinde etkiler analiz edilmiştir.

1.1. Kanser

Kanser, birtakım genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu vücudun herhangi bir bölgesinde kontrolsüz çoğalan ve diğer bölgelerine yayılma veya istila etme potansiyeli olan anormal hücre büyümesini içeren bir hastalıktır (Nussbaum vd.,2005).

Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun hemen hemen her yerinde başlayabilir. Normalde, insan hücreleri, vücudun ihtiyaç duyduğu yeni hücreler oluşturmak için (hücre bölünmesi adı verilen bir süreç yoluyla) büyür ve çoğalır. Hücreler yaşlandığında veya hasar gördüğünde ölürler ve onların yerini yeni hücreler alır. Bazen bu düzenli süreç bozulur ve anormal veya hasar görmüş hücreler, büyümeleri gerektiğinde bile çoğalır (http-2). Bu hücreler, kanserli hücreler olup, tümörleri oluşturur. Bu tümörler oldukları dokularda fark edilmediği süreçte dokudan çıkarak başka dokulara sirayet eder ve bu durum invazyon olarak bilinmektedir. İnvazyon ile ilişkin olarak kanserli hücreler kan ve lenf dolaşımına karışarak vücudun farklı bölgelerine taşınarak metastaz oluşturur (Güllü ve Akalın, 2005).

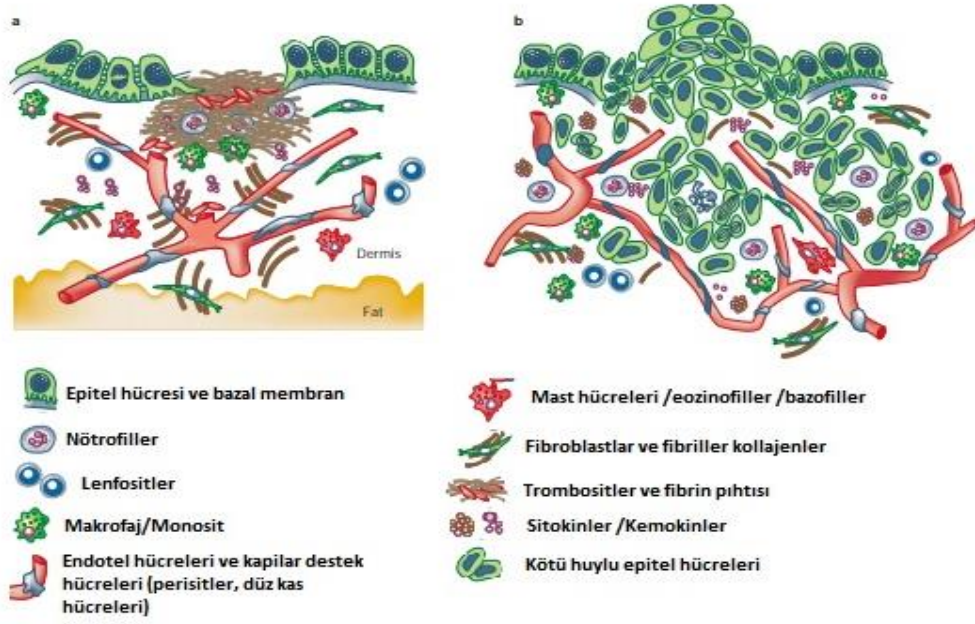
Tümörler davranışlarından dolayı malign ve benign olarak adlandırılmaktadırlar. Malign tümörler, kanser özelliği taşıyan kötü huylu tümördür ve en önemli özelliği metastazdır. Normal hücrelerden farklı olarak bu tümörü oluşturan kanserli hücreler

çoğalma kontrollerini kaybetmiş olup, tüm vücuda yayılarak ölümle sonuçlanır (Dong, 2018). Bening tümörler veya iyi huylu tümörler morfolojik ve fonksiyonel olarak normal dokuya benzer olup metastaz özelliği yoktur ve başlangıç bölge ile sınırlıdır (Ünal, 2012).

Vücudumuzun dış ve iç kontrol sistemleri hücrel değişimlerimizi daima takip altında tutar. “*Programlanmış hücre ölümü*” olarak adlandırılan süreçte iç kontrol sistemi mutasyon geçirmiş hücrelerin büyümesini ve gelişimini baskılamak için genlerden oluşur (Gibbons Johnson ve Dong, 2017). Programlanmış ölüme maruz kalmayan tümör hücreleri immün sistemin yönettiği dış kontrolle karşılaşır. Kanseri hücreleri bazı proteinleri kodlayan genomlardaki hatalar nedeni ile değiştirilmiş protein barındırırlar ve bu anormal proteinleri immün hücreler tümör hücrelerinin üzerinde tespit eder ve aktive hale gelerek tümör hücrelerini yararsız hale getirirler (Chen ve Mellman, 2013).

1.1.1. Kanseri gelişiminde inflamasyon’ un rolü

İnflamasyonun kanserin evrimindeki rolünü anlamak için, inflamasyonun ne olduğunu ve yara iyileşmesi ve enfeksiyon gibi fizyolojik ve patolojik süreçlere nasıl katkıda bulunduğunu anlamak önemlidir (Şekil 1.1) (Lisa ve Zena, 2002).



Şekil 1.1. Yara iyileşmesine karşı invaziv tümör büyümesi: a, Normal dokular; b, İnvaziv karsinomlar (Lisa ve Zena, 2002).

Normal dokular (a) oldukça organize görünüme sahiptir. Epitel hücreleri, vaskülarize stromal (dermis) kompartımandan ayrılan bir bazal membranın üzerine oturur. Yaralanma veya doku saldırısı üzerine trombositler aktive olur ve vasküler geçirgenliği, serum fibrinojen akışını ve fibrin pıhtı oluşumunu düzenleyen vazoaktif araçları serbest bıraktıklarında hemostatik bir tıkaç oluşturur. Aktive trombositlerden türetilen transforme edici büyüme faktörü- β ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi kemotaktik faktörler, granülasyon dokusu oluşumunu, fibroblastların aktivasyonunu ve hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesi için gerekli proteolitik enzimlerin indüksiyonunu ve aktivasyonunu başlatır. Kombinasyon halinde granülositler, monositler ve fibroblastlar toplanır, venöz ağ restore edilir ve yara boyunca yeniden epitelizasyon meydana gelir. Epitelyal ve stromal hücre tipleri, iyileşmeyi kolaylaştırmak için karşılıklı bir sinyal diyaloguna girer. Yara iyileştiğinde, karşılıklı sinyalleşme azalır. İnvaziv karsinomlar (b) daha az organizedir. Neoplazi ile ilişkili anjiyogenez ve lenfanjiyogenez, neoplastik hücrelerin diğer hücre tipleri (mezenkimal, hematopoietik ve lenfoid) ve yeniden şekillendirilmiş bir hücre dışı matris ile etkileşime girdiği kan damarları ve lenfatiklerin kaotik bir vasküler organizasyonunu üretir. Neoplastik ilerleme sırasında vasküler ağ, yaralanma sırasında olduğu gibi aynı şekilde bozulmasa da paralel olarak birçok karşılıklı etkileşim meydana gelir. Neoplastik hücreler, granülositler, mast hücreleri, monositler/makrofajlar, fibroblastlar ve

endotelial hücreler için mitojenik ve/veya kemo-çekici olan bir dizi sitokin ve kemokin üretir (Lisa ve Zena,2002).

Ek olarak, aktive fibroblastlar ve infiltre edici enflamatuar hücreler, neoplastik hücreler için mitojenik olan proteolitik enzimler, sitokinler ve kemokinlerin yanı sıra neoanjiyogenez ve lenfanjiyogenezde yer alan endotelial hücreler salgılar. Bu faktörler tümör büyümesini güçlendirir, anjiyogenez uyarır, fibroblast göçünü ve olgunlaşmasını indükler ve venöz veya lenfatik ağlarla etkileşim yoluyla metastatik yayılmayı sağlar.

Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi için hücrel tümör baskılayıcı genlerdeki nokta mutasyonları, DNA metilasyonu ve translasyon sonrası modifikasyonlar gibi epigenetik bozukluklara ihtiyaç vardır. Bu olaylar, normal hücrel homeostazın korunmasından sorumlu kritik yollarda değişikliklerle sonuçlanır ve kanser gelişimine yol açabilecek bir enflamatuar yanıtı tetikler. Enflamatuar yanıt, çeşitli çözünür araçların toplu eylemi yoluyla hem doğal hem de adaptif bağışıklık yanıtlarını içeren, herhangi bir yapıdaki bir yaralanma dokusuna yanıt olarak etkinleştirilen evrensel bir savunma mekanizmasıdır (Fernandes vd.,2015).

Bağışıklık sisteminin kesin kontrolünde herhangi bir başarısızlık nedeniyle çözülmemiş bir iltihaplanma, kanserle ilgili genlerin ifadesinde değişikliklere ve hücre döngüsünde yer alan hücrel proteinlerde translasyon sonrası modifikasyona, DNA onarımına ve kanserin gelişimini destekleyen apoptoza yol açabilir (Eiró ve Vizoso., 2012). Günümüzde, kronik inflamasyonun, proinflamatuar sitokinlerin ve diğer immünomodülatörlerin salınımına yol açarak, tümör ilerlemesi ve metastaz için uygun bir mikro-ortam yaratması nedeniyle, kanser ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (Campbell vd., 2013). Bir yandan inflamasyon karsinogenez, malign transformasyonu, tümör büyümesini, invazyonu ve metastatik yayılmayı destekler, öte yandan inflamasyon, tümör büyümesini sınırlayabilecek bağışıklık efektör mekanizmalarını uyarabilir gibi pleiotropik etkiler gösterir. Kanser ve inflamasyon arasındaki bağlantı, içsel ve dışsal yollara bağlıdır (Multhoff vd., 2012).

1.2. Beyin Tümörleri

Beyin tümörü, beyinde olan hücrelerin kontrolsüz çoğalarak farklılaşması ve kitle haline gelmesi ile oluşur. Beyin tümörleri, fokal veya genelleştirilmiş nörolojik semptomlara neden olabilir. Genelleşmiş semptomlar, kafa içi basıncının arttığını

yansıtır ve baş ağrısı, hastalık şiddetli olduğunda mide bulantısı, kusmaya neden olur (Lisa ve Deangelis,2001). Tümör oluşumu ve gelişiminde kimyasal faktörlerin, radyasyonun, çevre kirliliğinin, genetik faktörlerin etkili oldukları bilinmektedir.

Beyin tümörlerinden en sık karşılaşılan gliomlar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sistemine göre uluslararası olarak sınıflandırılan 4 derecesinin tamamında mevcuttur (Kleihues vd.,2002). 1. dereceli gliomalar çok nadirdir ve çocukluk dönemi ile sınırlıdır. 2.dereceli gliomalar (astrositom ve oligodendroglioma ile birlikte) her yaşta, özellikle genç yaşlarda pik derecede ortaya çıkabilir. Çok az proliferasyon göstermelerine bakmayarak, sıklıkla sağlıklı beyne sızarlar ve bu nedenle cerrahi veya radyoterapi ile tedavi edilemezler. Daha kötü huylu gliomalar anaplastiktir (3. derece) veya glioblastomu (4. derece) karakterize eder ve büyük hücrel nekrozları içerir (Herholz vd.,2012).

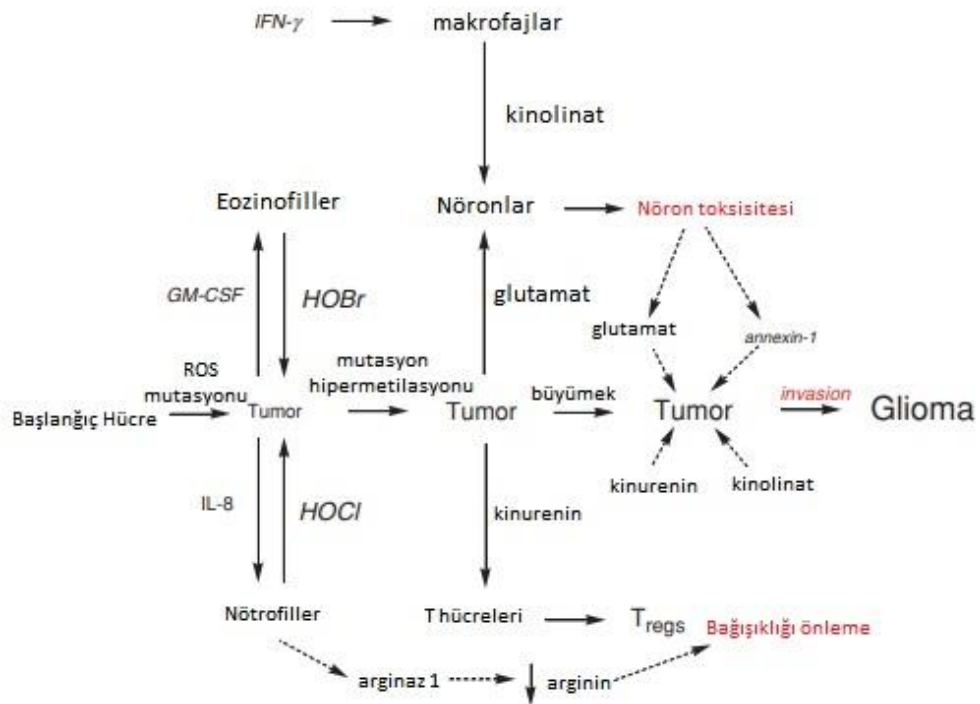
Birincil ve ikincil beyin tümörleri bilinmektedir. Beynin kendisinden (glial tümörler) ve çevresindeki zarından (menenjiomalar) gelişenler birincil beyin tümörleri, başka organlarda gelişen ve yayılımla (metastazlar) beyinde oluşan tümörler ise ikincil beyin tümörü olarak değerlendirilmektedir. Hem birincil hem de ikincil beyin tümörleri yüksek morbitideye ve kötü sonuçlara sahiptir. Glioblastoma (GBM), yetişkinlerde en sık görülen birincil beyin kanseridir (Wen vd.,2008), (Jones vd.,2012) ve agresif ve invazif büyüme sergilererek yılda 13.000 ölümle sonuçlanır. Ortalama 9-15 aylık bir hayatta kalma oranı vardır (Rulseh vd.,2012).

İkincil beyin tümörleri veya metastazlar, görünüşte iyi kontrol edilen birincil hastalığı olan kişiler dahil olmak üzere yılda yaklaşık 60.000 meme kanseri hastasında görülür (Eichler ve Loeffler,2007), (Liu vd.,2013). Bu komplikasyon genellikle primer tümör teşhisinden 2-3 yıl sonra ortaya çıkar ve neredeyse her zaman ölümcül olduğunu kanıtlar.

1.2.1. Beyin tümörleri ve inflamasyon

Glioblastomdaki tümör mikroçevresi, infiltratif inflamatuvar hücreler, kök benzeri özelliklere sahip hücreler, nöral, glial ve miyeloid belirteçlere sahip hücreler ve ayrıca nekroz geçiren bazı hücreler dahil olmak üzere birçok hücre tipinden etkilenir. Hızlı tümör büyümesi hem hipoksi hem de anormal vasküler proliferasyonun yanı sıra makrofajlar, eozinofiller, nötrofiller ve T lenfositler dahil olmak üzere bağışıklık

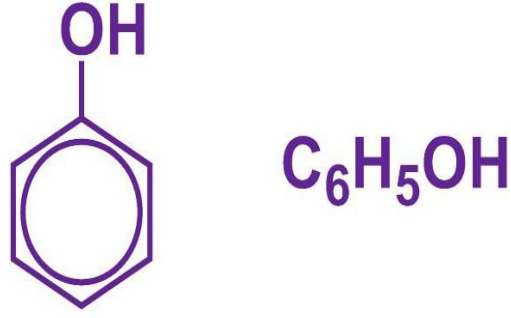
hücrelerinin infiltrasyonu ile sonuçlanır. Bu çeşitli hücre tipleri arasındaki sinyal yolları karmaşıktır ve hem parakrin hem de otokrin şekilde işlev gören çok sayıda sitokin içeren, anormal aktivasyon veya çoklu sinyal yollarının baskılanması ile sonuçlanır (Şekil 1.2.). Bu çoklu etkileşimli bileşenler muhtemelen yaralanmayı takiben doku onarımını kolaylaştırırken, aktive edilmiş inflamatuvar hücrelerin varlığı ve inflamatuvar araçların salınımı, tümör proliferasyonunu, anjiyogenezisi ve invazyonu destekler ve muhtemelen tümör hücrelerinin moleküler evrimine katkıda bulunur (Bharat vd., 2014).



Şekil 1.2. Glioblastomda iltihaplanma kaskadı ve karmaşık sinyal yolları (Bharat vd., 2014).

1.3. Polifenoller

Polifenoller, bitkiler tarafından üretilen, çok sayıda fenolik halkanın varlığı ile karakterize edilen ikincil metabolitlerdir (Daglia, 2012). Meyve ve sebzeler, yaklaşık 100 gr taze ağırlık başına 200-300 mg polifenol içeren üzüm, çilek, zeytinyağı, fındık, yer fıstığı ve meyvelerden üretilen çay, kahve, şarap, bira gibi içecekler polifenollerin ana kaynağıdır. Fenolik grupların (Şekil 1.3.) sayısı ve özellikleri, her polifenol sınıfının belirli özelliklerinden (biyolojik, kimyasal ve fiziksel) sorumludur (Quideau vd., 2011).

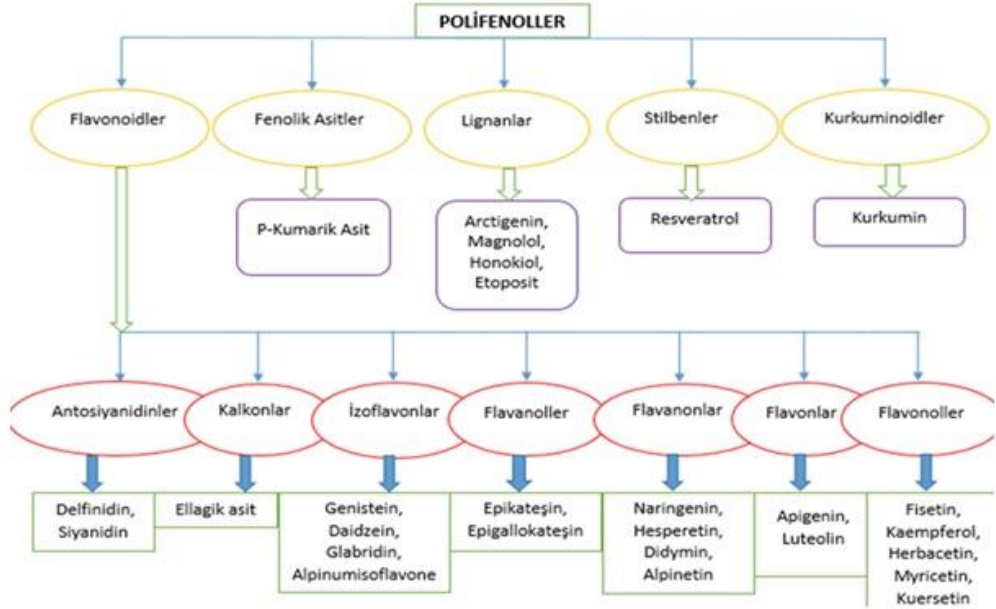


Şekil 1.3. Fenolün moleküler ve yapısal formülü (<http-3>)

Polifenoller bitkilerde farklı görevlere sahiptir;

- Bazı polifenoller bitkilerin fizyolojik fonksiyonları,
- Stress durumlarını uyaran (ışık, su vd) faktörlere karşı savunma fonksiyonları için gereklidir.

Fenolik halkaların sayısına ve bu halkaların yapısal elemanlarına göre oluşturulmuş birkaç polifenol sınıfı ve alt sınıfı vardır. **Şekil 1.4.**' te ana polifenol gruplarının sınıflandırmasını göstermektedir.



Şekil 1.4. Polifenollerin temel ve alt sınıfları (<http-4>)

Meyve ve sebze tüketimi, kardiyoprotektif, antikanser, antioksidan, anti-diyabetik ve anti-obezite özelliklerini içeren sağlık yararları için dünya çapında dikkat çekiyor. Flavonoidler, tanenler, kateşinler, C ve E vitaminleri, β -karoten dahil olmak üzere

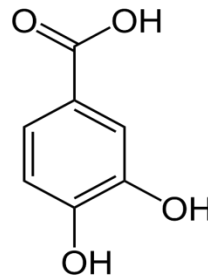
biyoaktif bileşikler olan polifenoller sağlığı koruyucu özelliklere sahiptirler. Bu bileşiklerin karışımı, sinerjik etkilerinden dolayı tek fitokimyasaldan daha iyi koruma sağlayabilir (Bazzano vd., 2003). Bu faydalar genellikle, anti-oksidasyon, anti-inflamasyon, anti-bakteriler, enzim inhibisyonu, glikasyon inhibisyonu, immünomodülasyon ve miRNA interferansı gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri ile ilişkilendirilmiştir (Xie ve Chen, 2013; Xie vd., 2014).

1.3.1. Protokateşuik Asit (3,4-Dihidrobenzoik asit, PCA)

Glioblastoma multiformenin (GBM) primer beyin tümörlerinin en tehlikeli grubunu oluşturduğu bilinmektedir. Hızlı proliferasyonu ve kemoterapötik ilaçlara direnci nedeniyle gliomaların tedavisi çok zordur (Collet vd., 2011). Ayrıca kemoterapide kullanılabilen standart kemoterapötik ilaçlar beyindeki kan beyin bariyerini geçmez (Reithmeier vd., 2010) ve bu gibi nedenlerden dolayı hastaların tümör tanısından sonra yaşam süreci 1 yıldan azdır. Birçok klinik uygulamalar ile tedavi edilmeye çalışılsa bile bu yetersizdir ve beyin tümörlerinin tedavisi için yeni ilaçlara ihtiyaç vardır (Das vd., 2008).

Bir polifenol grubu olan fenolik asitler hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitlerden oluşmaktadır ve hidroksibenzoik asit, C6-C1 yapısını kendinde taşıyan salisilik, gallik, p-hidroksibenzoik ve vanilik asitleri içermektedir. Protokateşuik asit (PCA) aynı yapıya sahip bir hidroksibenzoik asittir (Balasundram vd., 2006).

Protokateşuik asit (3,4-Dihidroksibenzoik asit (Şekil 1.5., PCA) günlük beslenmede tükettiğimiz birçok bitkide yaygın olarak bulunur; örneğin üzüm, erik, çay, kepek, badem, fındık, ceviz, soğan, zeytin, siyah pirinç ve zeytinyağı PCA içeriği bakımından zengindir (Khan vd., 2015; Han vd., 2018).



Şekil 1.5. Protokateşuik asit'in (3,4-Dihidroksibenzoik asit (PCA) kimyasal yapısı (<http-5>)

Protokateşuik asitin dolaşım sisteminde konsantrasyonunun yüksek olduğu ve kan beyin bariyerini kolayca geçebildiği bilinmektedir. Alzheimer ve Parkinson hastalıkları

dahil nörodejeneratif hastalıkların kontrolünde etkili ve güvenilir bir terapötik aday olduğu in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmektedir (Krzysztoforska vd., 2019). PCA' nın bazı önemli biyolojik aktiviteleri **Tablo 1.1.**'de özetlenmiştir.

Tablo 1.1. *Protokatesuik asidin farmakolojik aktiviteleri (Khan vd.,2015)*

No.	Farmakolojik aktiviteler	PCA' nın inhibe edici etkileri
1	Antibakteriyel	Bakterilerin membran lizizi, sıçangil sitokrom P450 ve faz II enzimlerini azaltır ve lipid oksidasyon seviyelerinin azalmasına neden olur.
2	Antiviral	HBsAg salgılanmasını aşağı düzenler ve HepG2'den HBV DNA'nın salınımını azaltır.
3	Nörolojik etki	PCA, PC12 hücrelerinde sitotoksiteyi, apoptotik morfolojiyi, TH ekspresyonunun azalmasını ve α -sinükleinin anormal oligomerizasyonunu inhibe eder.
4	Anti-aterosklerotik	TNF- α ile aktive olan sıçan aortik endotel hücrelerine monosit yapışmasını inhibe eder VCAM-1 ICAM-1 ekspresyonu ve NF-Kb bağlanma aktivitesini azaltır
5	Antifibrotik	TGF- β 1, CTGF seviyelerini inhibe eder ve HSC'lerin proliferasyonunu inhibe eder.
6	Yaşlanma karşıtı	Glutasyon peroksidaz, katalaz aktivitesini artırır ve malondialdehit seviyesini düşürür.
7	Anti ülser	Sitoprotektif etki ve mide mukozasının güçlendirilmesi; mukozal savunmayı artırır.
8	Antikanser	Serbest radikallerin oluşumunun engellenmesi, belirli kanserojen metabolizmasına faz 1 ve faz 2 reaksiyonlarındaki etkiler, kanserojenlerin DNA molekülleri ile bağlanma bölgesini doğrudan bloke eder.

Antosiyaninlerin ve prosiyanidinlerin ana metoboliti olarak besin yolu ile meyve ve sebzelerden kolayca alınması ve yapılan çalışmalarla biyolojik aktivitelerinin bu kadar geniş olması son yıllarda PCA' a olan ilgini artırmıştır.

1.3.2. PCA ve inflamasyon ilişkisi

Beslenme ve bağışıklık sistemi arasında bir ilişki olduğu kadar beslenme ile kronik hastalıklar arasında bir bağlantı vardır (Wolowczuk vd.,2008). Bu nedenle, diyet besinlerinin inflamasyonun farmakolojik hedeflerini nasıl etkileyebileceğinin anlaşılmasına büyük çaba ve kaynakların odaklanmış olması şaşırtıcı değildir. Ayrıca

bazı sentetik ilaçlar bilinmeyen yan etkiler sağladığından, yeni ve güvenli antiinflatuar ajanlara ihtiyaç duyulmuştur. Fenolik bileşikler dahil olmak üzere çeşitli fitokimyasallar, *in vitro* ve *in vivo* olarak antiinflatuar aktivite göstermiştir (Masella vd.,2012). Birçok veri, polifenollerin faydalı etkilerini ortaya çıkarmak için sinyal iletim yollarının değiştiricileri olarak çalışabileceğini öne sürmüştür (Santangelo vd.,2007; Spencer, 2010; Sears ve Ricordi, 2011). Bu inflammatuar düzenleyicileri gıda bileşenleri kullanarak hedeflemek, kronik inflamasyonla ilişkili hastalıkların gelişimini önlemek veya iyileştirmek için yararlı bir strateji olabilir. Son çalışmalar PCA' nın önemli anti-inflatuar aktiviteler gösterebileceğini öne sürdüğü için PCA iyi bir aday gibi görünmektedir (Hsu vd., 2009; Min vd., 2010; Wang vd., 2010). Nitrik oksit, lipid aracıları, sitokinler/kemokinler, adezyon molekülleri ve matris metalloproteinazları (MMP'ler) dahil olmak üzere çok sayıda aracı, inflammatuar sürecin başlatılması, sürdürülmesi ve çözülmesinde rol oynar (Manicone ve McGuire, 2008; Lawrence ve Fong, 2010).

PCA' nın koruyucu etkiye sahip olduğu akut akciğer hasarı üzerindeki *in vivo* koruyucu etkisi araştırılarak NF- κ B inhibisyon yoluyla lipolisakkaritin neden olduğu akciğer hasarına sahip sıçanlarda inflammatuar sitokinler tümör nekroz faktörü α (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β) ve IL-6'yı inhibe ettiği belirlenmiştir (Wei vd.,2012).

1.4. Hücre Ölüm Mekanizmaları

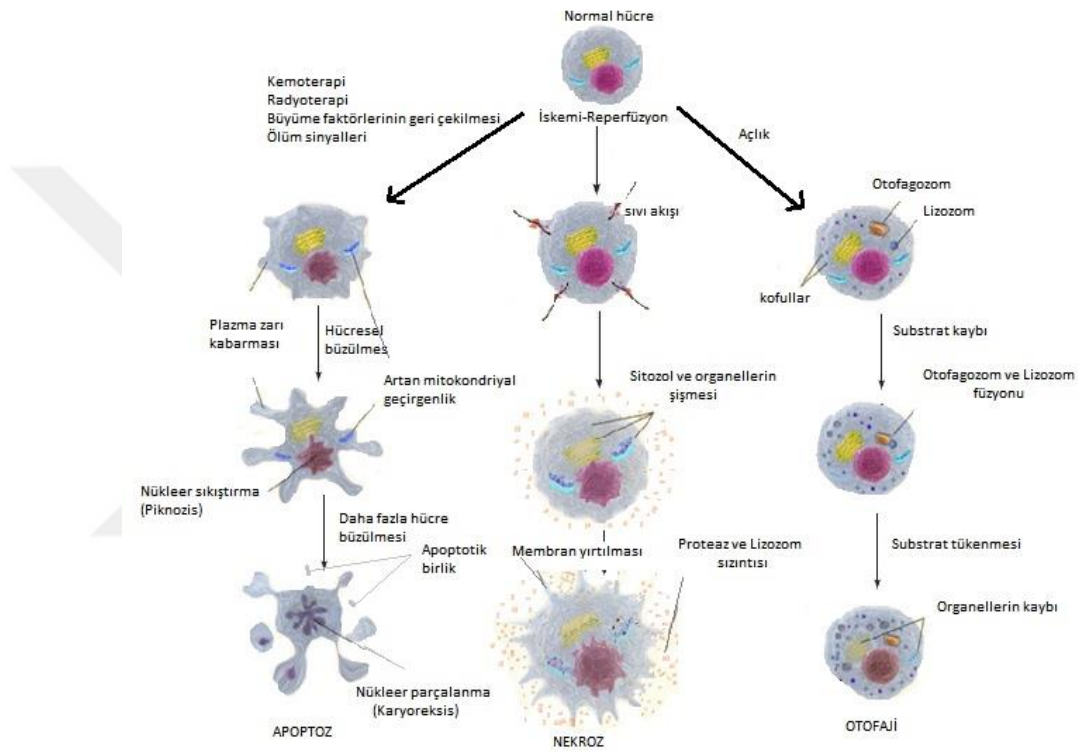
Hücre ölümü, ölümcül sürecin morfolojik görünümüne (apoptotik, nekrotik, otofajik veya mitozla ilişkili olabilir), enzimolojik kriterlere (kaspazlar veya katepinler gibi nükleazların ve/veya farklı proteaz sınıflarının dahil olduğu veya olmadığı), fonksiyonel yönler (programlanmış veya tesadüfi, fizyolojik veya patolojik) veya immünolojik özelliklere (immünojenik veya immünojenik olmayan) göre sınıflandırılabilir (Galluzzi vd.,2007). Hücre ölüm mekanizmaları daha fazla oranda bazı bakteri ve mantar çeşitlerinde gözlemlenmektedir (Cornillon vd., 1994, 1998; Eisenberg vd.,2007; Buttner vd.,2006).

Genel olarak hücre ölüm mekanizmaları (**Şekil 1.6.**) hücre ölümünde yüksek ölçekte değişimlere neden olabilecek etmenlerden dolayı 3 tipe ayrılmaktadır: (Galluzzi vd.,2007; Schweichel ve Merker,1973).

- Tip I: Apoptoz, hücre sitoplazmasının büzülmesi ile belli oluyor. Piknoz veya kromozom kümelenmesi ve Karyorreks, hücre çekirdeğinin dağılması ile kendini gösterir.

- Tip II: Otofaji, lizozomal degradasyon yolu ile hücre ölümüne yol açar.

- Tip III: Nekroz, diğer hücre ölümlerinden farklıdır, zarar görmüş hücrelerin lizozomal veya fagositik etkinlikler olmaksızın atılması ile sonlanır.



Şekil 1.6. Hücre ölüm mekanizmaları (<http://6>).

1.4.1. Apoptoz

Eski Yunancadan gelen apoptoz kavramı “apo” ve “ptosis” kelimelerinin birleşmesi ile sonbaharda yaprak dökümünü ifade etmek için Homeros tarafından kullanılmış ve “ayrı” ve “düşmek” anlamı taşıyor. İlk olarak 1972 yılında bir makalede Kerr, Wyllie ve Currie tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü türünü tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr vd, 1972). Apoptoz, herhangi bir hücrenin büyüme ve bölünmesinin durdurularak, hücre içeriğinin çevreye dağılmaması ile ilerleyen, hücrelerin kontrollü bir ölüm mekanizmasıdır ve bir dizi enzime bağlı biyokimyasal süreçle birlikte hücrenin yapısında farklı morfolojik değişiklik ile karakterize edilir (Mark, 2019).

Umut verici terapötik potansiyeli göz önünde bulundurarak, tıpta küçük molekülü ilaç kullanımı ile apoptozun indüklenerek kanser hücrelerinin yok edilmesi yönünde yöntemler geliştirilmiştir. Sonuç olarak bir grup ilaç terapisinin apoptozdan yararlanarak hastalıkların tedavisinde yararlı oldukları kanıtlanmıştır (Xu vd.,2019).

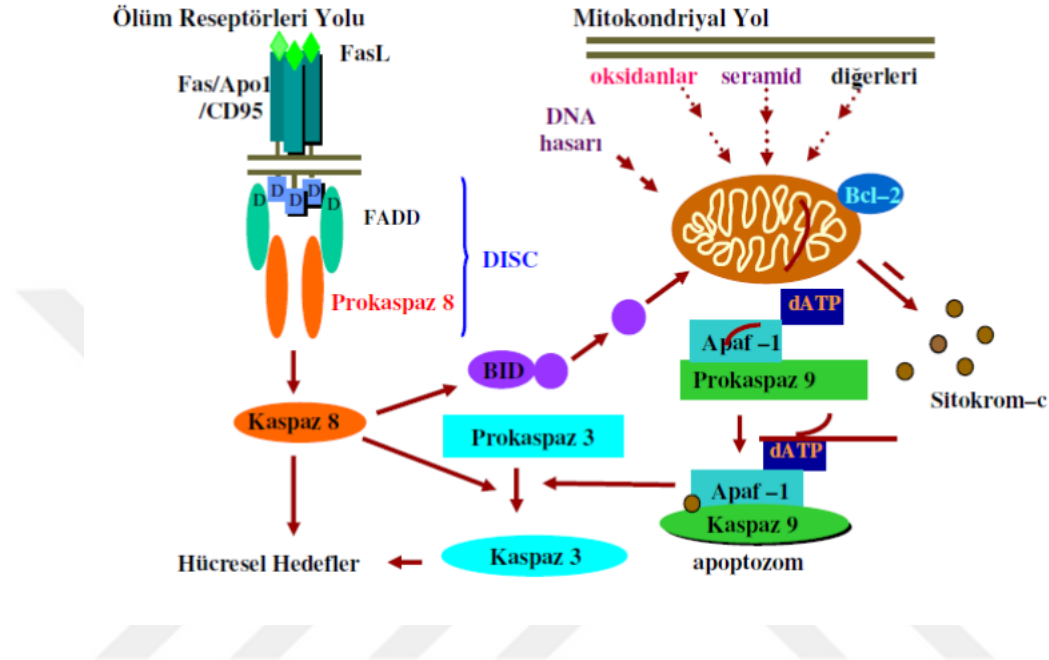
Gene bağlı toksik stres gibi hücre içerisinden gelen sinyaller veya hücre dışı ölüm reseptörlerine ligandların bağlanmasıyla oluşan sinyaller apoptozu tetiklemektedir. Apoptotik hücre ölümü mekanizmasındaki dereglasyon, kanserin ayırt edici özelliğidir. Klinik onkolojide kullanılan antikanser ilaçlar çoğu kanser hücresi ölümünü tetiklemek için bozulmamış apoptotik sinyal yollarını kullanır. Ölüm yollarındaki kusurlar, ilaç direncine neden olarak tedavilerin etkilerini sınırlayabilir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların direnç olmaması ve tedavide pozitif sonuçlar alınabilmesi için apoptozun temel düzenleyicilerinin rolü, anti-apoptotik faktörlerin aktivasyonu veya pro-apoptotik faktörlerin inaktivasyonu dahil olmak üzere dereglasyonunun nasıl sonuçlandığı araştırılmıştır (Pistritto vd.,2016).

1.4.1.1. Apoptoz Yolakları

“Programlanmış hücre ölüm” mekanizması olan apoptozu indükleyen dış (ekstrinsik) ve iç (intrinsik) sinyal yolakları vardır. Ekstrinsik yol, DR'nin (ölüm reseptörleri) aracılık ettiği yolu ifade eder ve içsel yol, mitokondriyal aracılı bir yoldur (Elmore, 2007).

Ekstrinsik apoptotik yol (ölüm reseptörüne bağlı), tümör nekroz faktör reseptörünün (TNFR) hücre yüzeyine maruz kalan ilgili protein TNF ailesi ligandları ile etkileşimi ile başlatılır. Apoptozu indükleyen sinyallemde önemli yer alan ölüm alanı (DD) hücre içi protein-protein etkileşim alanı tarafından ölüm reseptörleri tanımlanır (Guicciardi ve Gores, 2009; Fulda ve Debatin,2003). TNF (Tümör Nekroz Faktör), Fas-L (Fas Ligand) ve TRAIL (TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand) ekstraselüler ligandları transmembranel ölüm reseptörlerinin (TNF reseptör tip 1, Fas, TRAIL reseptörleri) ekstraselüler alanlarına bağlanırlar. Reseptörün ölümü üzerine, aynı reseptör oligomerizasyona ve diğer DD içeren proteinlerle homotipik etkileşimleri desteklemek için sitoplazmik ölüm alanını ortaya çıkarmak için konformasyonel bir değişikliğe uğrar. Adaptör proteinlerin (FADD / TRADD) rolü, bu protein kompleksi düzeyinde başlatıcı pro-kaspaz-8 ve / veya -10'u ayırmaktır ve bu da ölüme neden olan sinyal kompleksinin (DISC) oluşumuyla sonuçlanır (Boatright ve Salvesen, 2003).

Başlatıcı kaspazların aktivasyonu, hücre canlılığı için temel substratların bölünmesine yol açarak hücre ölümünü indükleyen aşağı akış efektör kaspazlarının (-3, -6 ve -7) bölünmesi ve aktive edilmesi ile sonuçlanır (Degterev vd., 2003). Böylelikle hücre apoptozu gözlemlenir (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. İntinsik (mitokondriyal) ve Ekstrinsik (ligandlar / ölüm reseptörleri) hücre ölüm yolları (Degterev vd., 2003).

Ekstrinsik yoldan farklı olarak İntinsik apoptotik yolak, ışınlanma ve kemoterapötik ajanlarla tedavi gibi farklı stres koşullarına yanıt olarak mitokondriyal düzeyde birleşen hücre içi sinyaller tarafından tetiklenir. Mitokondriyal membranın zarar görmesi sonucu intermembran boşluğundan pro-apoptotik proteinler sitoplazmaya geçer (Green ve Kroemer, 2004). Bu proteinler, sitozoldeki mitokondriyal bağımlı ölümü aktive etmede önemli bir rol oynayan sitokrom-c gibi apopto genik faktörleri içerir. Sitokrom-c, sitozolik Apaf-1'e (apoptoz proteaz aktive edici faktör-1) bağlanır ve başlatıcı pro-kaspaz-9'u kaspaz toplama alanına (CARD) dahil ederek otoaktivasyona ve ardından proteolize izin veren apoptozom adlı bir kompleks oluşumunu tetikler (Danial ve Korsmeyer, 2004). İşlem sırayla hücresel substratların bölünmesi için apoptotik hücre ölümüne yol açan aşağı akış yürütme kaspazları-3, -6 ve -7'yi etkinleştirir ve böylelikle hücre apoptoza gider (Slee vd., 1999; Kuribayashi vd., 2006) (Şekil 1.7).

1.4.2. Nekroz

Apoptozun aksine nekroz, ani bir şokla (radyasyon, ısı, kimyasallar hipoksi veya iltihaplanma) yaralanarak, enerjiden bağımsız halde kontrolsüz hücre ölüm mekanizmidir (Elmore, 2007). Nekroz, hücre zarının yırtılmasına ve hücre içeriğinin çevredeki alanlara dökülmesine neden olan NF-κB gibi farklı pro-enflamatuar proteinlerin ve bileşiklerin yukarı düzenlenmesini içerir ve bu da bir dizi iltihaplanma ve doku hasarıyla sonuçlanır. Hücre, çevresi ile homeostazı sürdürmede başarısız olduğu için genellikle şişerek (onkoz) yanıt verir. Nekrozun bu tanımı apoptoza karşı yararlı bir kavramdır, ancak nekroz genellikle ortamdaki hücresel fragmanların varlığıyla hücre kültüründe bir son nokta durumu olarak ve genellikle bütünlüğünü yitirmiş geç apoptotik hücrelerin kalıntıları olarak gözlendiğinden, hücre kültürü ortamında çoğunlukla nekroz olarak tanımlanır (Mark, 2019).

1.4.3. Otofaji

Otofaji, sitoplazmik bileşenleri lizozoma ileten hücre içi bir bozunma sistemidir. Basitliğine rağmen, son gelişmeler, otofajinin bazen karmaşık olan çok çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik roller oynadığını göstermiştir. Otofaji birkaç ardışık adımdan oluşur - sekestrasyon, lizozomlara taşınma, bozunma ve bozunma ürünlerinin kullanımı - ve her adım farklı işlev görebilir (Mizushima, 2007).

Otofaji, ökaryotik hücre ölümü ve apoptoz ile yakından ilişkilidir. Gerçekten de, bazı durumlarda aynı proteinler hem otofajiyi hem de apoptozu kontrol eder. Apoptotik sinyalleme, otofajiyi düzenleyebilir ve tersine otofaji, apoptozu (ve büyük olasılıkla diğer hücre ölüm mekanizmalarını) düzenleyebilir. Bununla birlikte, otofaji ve hücre ölümü arasındaki moleküler bağlantılar karmaşıktır ve farklı bağlamlarda, otofaji hücre ölümünü teşvik edebilir veya engelleyebilir (Lane vd., 2013).

1.5. Çoğalan Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA)

PCNA (prolifere hücre çekirdek antijeni) DNA polimeraz deltanın kofaktörü olarak işlev gören 36 kDa (kilodalton) molekul ağırlığına sahip bir proteindir. PCNA ile ilgili bilgiler ilk defa 1978 yılında Miyachi tarafından verilmiştir. Sistemik lupus eritematozlu hastaların serumunda çoğalan hücre antijenleri ile reaksiyona giren antikorların varlığı bildirilmiştir. Bunun ardından 1980 yılında Bravo ve Celis yaptıkları araştırmada “siklin” olarak adlandırdıkları bir proteinin hücre döngüsünde farklı etkiler gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Mathews ve arkadaşları PCNA ile siklin’in aslında aynı

protein olduğunu ortaya koymuşlardır. (Matsumoto vd.,1987; Baserga, 1991; Celis ve Madsen, 1986).

PCNA'nın nükleer dağılımının görüntülenmesi (antikor etiketleme yoluyla), hücre döngüsünün erken, orta ve geç S fazını ayırt etmek için kullanılabilir. Prolifere olan hücrelerde PCNA hücre döngüsünün G1 fazında ortaya çıkmakta ve bu fazın ortasında yükselmeye başlıyarak ve S fazı boyunca yüksek kalmaktadır. G2 ve M fazlarında ise azalarak aynı G1 fazındaki seviyeye kadar düşmektedir (Theocharis vd, 1994; Filizel vd, 1996).

PCNA bir homotrimerdir ve işleme kabiliyetini, DNA replikasyonu, DNA onarımı, kromatin yeniden modellemesi ve epigenetik ile ilgili proteinleri toplamak için bir iskele görevi gördüğü DNA'yı çevreleyerek başarır (Moldovan vd.,2007).

PCNA' nın immunohistokimyasal çalışmalar sonucu saptanması hem aktif DNA ikileşmesini hem de karsinogenez ile sonuçlanan DNA hasarının varlığını göstermektedir. PCNA insan glioma hücrelerinin çekirdeklerinde hem in vitro hem de in situ indirekt bir immünoperoksidaz yöntemiyle başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Değişken nükleolar boyama ile PCNA için benekli nükleoplazmik boyama, üstel büyümede kültürlenmiş insan glioma hücrelerinin yaklaşık %37'sinde gözlenirken, aşılınmış çıplak sıçanlardan alınan subkutan tümör hücrelerinin sadece %14'ü nükleer PCNA için kesin olarak pozitif boyandığı gözlemlenmiştir (Tabuchi vd., 1987). Aynı zamanda karaciğer, gastrointestinal sistem, meme, cilt, üriner sistem ve akciğer malignitelerinde proliferasyon belirteci olarak kullanıldığı ve tümör infiltrasyonu sağladığı çoğu çalışmada gösterilmiştir (Hu vd., 2017; Abike ve Zengeroğlu, 2010).

PCNA ekspresyonunun çoğalan hücrelerde artış göstermesi beklense de bazen birçok tümör hücrelerinde aktif bir şekilde DNA onarımı olduğu zamana proliferasyon olmayan hücrelerde de gözlemlenebilir (Bishayee ve Dhir, 2009).

2. MATERYEL VE YÖNTEM

2.1. Deneylerde Kullanılan Hücre Hatları

2.1.1. C6 Glioma Hücre Hattı

Sınırsız mitotik aktivitesi olan beyin tümörlerinden elde edilen hayvansal kökenli hücre dizileri, beyin tümörlerinin oluşum ve gelişim süreçlerinin araştırılmasında ve yeni tedavi yollarının belirlenmesinde kullanılan kaynaklardır (Adilay, 2006).

C6 hücre hattı ilk olarak 1968 yılında Benda ve arkadaşları tarafından yetişkin Wistar-Furth sıçanlarının tekrar tekrar N-N' nitrozometilüre ile maruz bırakılması sonucunda geliştirilmiş ve ilaç etkileşim çalışmaları için kullanılmaktadır (Benda vd.,1968). Tümör nekroz odakları, nükleer polimorfizm ve yüksek mitotik indeks gibi insan GBM'si ile aynı histolojik özellikleri sergiler (Doblas vd.,2010; Gieryng vd.,2017). Temel histolojik farklılıklar, C6'nın glial fibriler asidik proteini (GFAP) ifade etmemesi, vimentin ise değişken şekilde ifade edilmesidir (Chou vd.,2003).

Bu hücre hattı değişken şekilli çekirdeklere sahip pleomorfik hücrelerden oluşan ve genetik olarak doğal tipte bir p53 genine, Rb geninin ekspresyonunda bir artışa ve mutant p16 / Cdkn2a / Ink4a lokusuna sahip olduğu, ancak p16 ve p19ARF mRNAs6 ekspresyonuna sahip olmadığı belirlenmiştir (Schlegel vd.,1999).

C6 glioma hücre dizisinde, CD9 önemli bir artışa sahiptir (Sibenaller vd.,2005). β -galaktosidaz işaretleyici proteini bir tümör antijeni olarak işlev görebilmektedir. Bu işaretleyici protein, C6 kaynaklı tümörlerin in vivo immünohistokimyasal analizine yardımcı olabilse de sıçanların β -galaktosidaz genine karşı immünizasyonunun tümör büyümesine karşı koruyabileceği dikkate alınmalıdır (Lampson vd.,1993).

C6 glioma hücreleri, endotelial bazal membrana bağlanarak serebral kortekse göç eder (Izumoto vd.,1996). Bu göç yolu, insan malign astrositoma hücrelerinin göç modeline benzerdir.(Bernstein vd.,1990).

C6 tümörünün gelişimi gliomaların vasküler durumu ile de ilişkilidir. Tümörün merkezinde oksijen eksikliği, neovaskülarizasyonun önemli bir etkenidir. C6 hücreleri, sırasıyla tirozin kinaz reseptörleri ve matriks metalloproteinazlar (MMP) aracılığıyla tümör büyümesine katkıda bulunan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi birkaç anjiyojenik faktör salgılar (Gross vd.,1990; Plate vd.,1993).

Genel olarak, C6 glioma modeli, tümör büyümesi, tümör istilası ve göçü, anjiyojenez, büyüme faktörü üretimi ve regülasyonu ve kan-beyin bariyeri bozulması gibi beyin tümörlerinin çeşitli biyolojik özelliklerini incelemek için kullanılmıştır (Valable vd.,2007; Valable vd., 2008).

Çalışmamızda Amerikan Doku Kültürü Koleksiyonu'ndan önceden temin edilmiş C6 sıçan glioma hücre hattı (ATCC® CCL-107TM) kullanılmıştır.

2.1.2. THP-1 Monosit Hücre Hattı

THP-1, bir insan monositik lösemi hücre hattıdır. Bu hücre hattı, monosit ve makrofaj aktivitelerinin modülasyonunu tahmin etmek için ortak bir model haline gelmiştir. Forbol esterlerle tedaviden sonra, THP-1 hücreleri, çeşitli yönlerden doğal monosit türevli makrofajları taklit eden makrofaj benzeri hücrelere farklılaşır. Bu özelliklerden dolayı THP-1 hücre hattı, makrofaj farklılaşmasında yer alan mekanizmaları incelemek ve bu hücreler tarafından sergilenen fizyolojik işlevlerle ilgili olan makrofaja özgü genlerin düzenlenmesini keşfetmek için değerli bir model sağlar (Auwerx vd.,1991).

Memelilerin dolaşım sistemindeki monositler, Gram negatif bakterilerle enfeksiyona karşı etkili koruma sağlar. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarının makromoleküler bir yapısı olan Lipopolisakkarit (LPS) ile stimüle edildikten sonra, periferik monositler lenf düğümlerine göç eder, dendritik hücrelere farklılaşır ve yüksek etkinlikle CD4- + ve CD8 -+ T hücrelerine antijen sunar, böylece gram negatif bakterilere karşı adaptif bağışıklığı başlatırlar (Sallusto ve Lanzavecchia, 2010). Ek olarak, dolaşımdaki monositler, doku makrofajlarına farklılaşma potansiyeline sahiptir, böylece embriyonik olarak türetilmiş makrofaj havuzuna katkıda bulunur ve istilacı patojenlerin fagositozuna yardımcı olurlar (Epelman vd.,2014).

Çalışmamızda Amerikan Doku Kültürü Koleksiyonu'ndan önceden temin edilmiş THP-1 insan monosit hücre hattı (ATCC® TIB-202™) kullanılmıştır.

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Laboratuvar Gereçleri

Protokateşuik asit (PCA) (154.12 g/mol)	Acros Organics, Çin
Karmustin (214.05 g/mol)	Sigma – Aldrich, USA
Akridin oranj 5G	Sigma – Aldrich, USA

Hidroklorik asit (36.5 -38%)	Sigma Aldrich, Almanya
Agaroz, yüksek çözünürlüklü	Sigma, Almanya
Trizma® base (kat no:T1503)	Sigma Aldrich, USA
Titriplex® III (kat no: 6381-92-6)	Merck KGaA, Hollanda
Sodyum Hidroksit Peletleri (kat no: 250938)	AFG Bioscience LLC, USA
Select agar	Sigma, Almanya
Tritom X 100	Sigma, Almanya
Paraformaldehit	Sigma Aldrich, Almanya
0.2 mL' lik PCR tüpü	Greiner Bio-One, ABD
10, 100, 1000 ve 5000 µL'lik pipetör	Eppendorf, Kanada
10, 100, 200, 1000 µL 'lik mikropipet ucu	Greiner Bio-One, ABD
12 kanallı otomatik pipet	Axygen, İngiltere
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
İzoterm mikroskop lamaları	SentezLab, Türkiye
Lamel	Isolab, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Biological Industries, İsrail
Piromisin	İnvivogen, ABD
B-Merkaptoetanol	AppliChem, Almanya
Thermo Flask, Filtreli Kapak (75 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
Thermo Flask, Filtreli Kapak (25 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
2 mL'lik Ependorf tüpü	Greiner bio-one, ABD 5 Ve
10 mL'lik cam pipet	Isoterm, Türkiye
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	Isolab, Almanya
12 ve 24 kuyucuklu hücre kültür plakası	Jet Biofil,

6 kuyucuklu hücre kültür plakası	Nest, Çin
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma – Aldrich, Almanya
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Capricorn Scientific, ABD
RPMI-1640 medyum (1X)	HyClone, Thermo Scientific,
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma – Aldrich, Almanya
Cedex Smart Slide	Roche, Almanya
Parafilm	Pechiney, Fransa
Şarjlı pipetör	Starlab, Almanya
Trypsin-EDTA 10X	Pan Biotech, Almanya
Trypan mavisi	Roche, Almanya
Kryotüp (2mL)	Cyros, Türkiye
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One, ABD
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Invitrogen, Almanya
Forbol 12-miristat 13 -asetat (PMA)	Sigma – Aldrich, Almanya
Lipopolisakkarit E.coli L4005-100 MG	Sigma – Aldrich, Almanya
Rekombinant İnsan IFN- γ	Peptotech, ABD
WST-1 Solüsyonu 25 mL	Roche, Almanya
xCELLigence E-plate 16	Roche, Almanya
xCELLigence CIM-plate 16	Roche, Almanya
Primer antibadi: PCNA	Cell Signaling Technology 2586S
Sekonder antibadi: Alexa Fluor®488	Cell Signaling Technology 4412

2.3. Kullanılan Laboratuvar Cihazları

HERAcell 240 Steril CO2 inkübatörü	Thermo Scientific, ABD
Laminar flow kabini	Heal Force, Çin

Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Almanya
Hücre sayımı için Cedex XS	Innovatis, ABD
Cytation 3 Multi-Mode Reader	Bio-Tek, ABD
RTCA DP	Roche, Almanya
Derin dondurucu buzdolabı	Altus, Türkiye
DNA-RNA çalışma kabini	UVP, Kanada
Hassas terazi	Ohaus, Avustralya
PH metre	WTW Inolab, Almanya
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Mikro santrifüj	Hettich, Almanya
NanoDrop 2000 Spektrofotometre	Thermo Scientific, ABD
Otoklav	Alp, Türkiye
Otomatik pipetler	Eppendorf, Almanya
PCR Thermal Cycler (Gradient PCR)	Takara, Japonya
Sterilizatör	Nüve, Türkiye
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Vorteks	Daihan, Güney Kore
Elektroforez	Cleaver, İngiltere
DM 6000 Floresan Mikroskop	Leica, Almanya

2.4. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi

Çalışmalarda kullanılan malzemelerden cam ve metal olanları alüminyum folyolara sarılı olarak 170°C'de 3 saat sterilizatörde, sıvı solüsyonlar, şişeler, rezervuarlar, falkon tüpler ve kazıyıcılar ise alüminyum folyolarla uygun bir şekilde kaplanarak 121°C, 1.5 atm/Hg'de (atmosfer basıncı) 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

2.5. Kullanılan maddelerin hazırlanması

2.5.1. Protokatesuik asit (PCA)

Toz halindeki Protokatesuik asit (PCA) (3,4-Dihidroksibenzoik asit, 97%; kod: 114890250; Acros Organics, Çin) steril distile su içerisinde çözülerek 200 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, alikvatlanarak -20°C’de saklanmıştır. Bu stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak gerekli konsantrasyonları her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

2.5.2. Karmustin

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak bir anti-kanser ("antineoplastik" veya "sitotoksik") kemoterapi ilacı olan karmustin (Kod: 154-93-8; Sigma – Aldrich, USA) kullanılmıştır. Toz halindeki karmustin dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 200 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Stok solüsyon, alikvatlanarak -20 °C’de saklanmıştır. Ana stoktan, kültür medyumunda çeşitli seyreltmeler yapılarak gerekli konsantrasyon her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

2.5.3. Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA)

Toz halindeki PMA (Katalog No: P8139, Sigma) dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 50 mg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır ve alikvatlanarak -20 °C’de saklanmıştır. Ana stoktan kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır ve THP-1 insan monosit hücrelerini makrofaja (M0) dönüştürmek için kullanılmıştır.

2.5.4. Lipopolisakkarit (LPS E. coli 0111: B4)

Liyofilize halde bulunan LPS (L4005-100MG, Sigma) steril distile su içinde çözülerek 1000 ug/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. LPS’ den hazırlanan ana stok, alikvatlanarak -20°C’de saklanmıştır. Çalışmamızda LPS’nin kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemi yapılarak elde edilen gerekli konsantrasyonu THP-1 insan monosit hücrelerinin PMA ile M0 makrofaj’ a dönüştürülmesi sonrası M1 polarizasyonunu sağlamak amacıyla IFN- γ ile beraber kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan LPS konsantrasyonları her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

2.5.5. Rekombinant insan IFN- γ

Tez çalışmamızda IFN- γ (Peptotech, Katalog No:AF-300-02) THP-1 insan monosit hücrelerinin PMA ile M0 makrofaj' a dönüştürülmesi sonrası M1 polarizasyonunu sağlamak amacıyla LPS ile beraber kullanılmıştır. Kullandığımız IFN- γ liyofilize halde olup, içerisinde %0,1 konsantrasyonda sığır serum albümin (BSA) bulunan PBS ile çözülerek 100 μ g/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmış ve aliquatlanarak -80°C'de saklanmıştır. Deneylerde kullandığımız IFN- γ konsantrasyonları her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

2.5.6. Akridin Oranj (AO)/ Propidyum İyodür (PI)

Tez çalışmamızda canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesi için Akridin oranj ve Propidyum iyodür (AO/PI) boya ları birlikte kullanılmıştır. Başlangıç olarak 1 mg akridin oranj 1M hacimdeki 1mL HCL içerisinde çözülerek 1000 μ g/mL ana stok hazırlanmıştır. Aynı zamanda propidyum iyodür 1 mL PBS içerisinde çözülerek 1000 μ g/mL ana stok hazırlanmıştır. Daha sonra her iki ana stok ortak bir şekilde PBS içerisinde seyreltilerek 100 μ g/mL olacak şekilde AO/PI karışım haline getirilerek çalışmada kullanılmıştır.

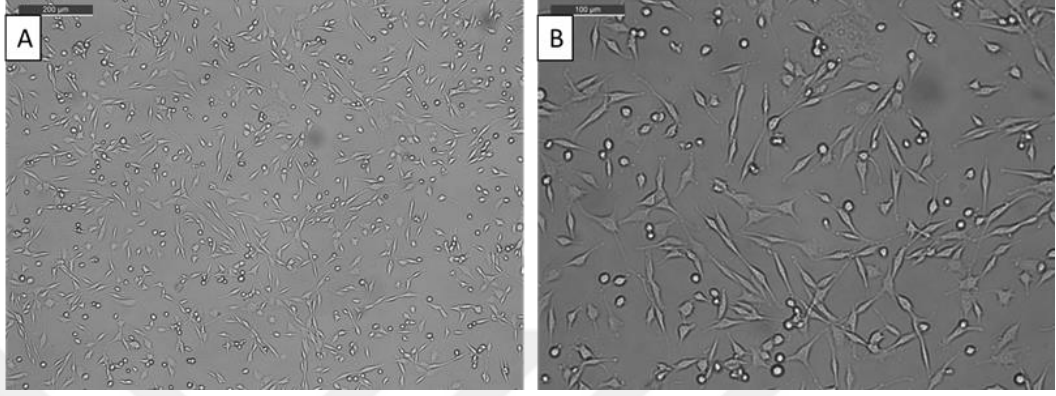
2.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.6.1. Hücre hatlarının çoğaltılması

2.6.1.1. C6 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık

Sıçan glioma hücreleri (C6) %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin (PS) ve %0.1 piromisin içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) büyüme besiyeri kültür ortamında çoğaltılmıştır. C6 hücre hattı %5 CO₂'li etüvde 37°C sıcaklık ve %95 bağıl nem ortamında geliştirilmiştir. Hücreler ilk aşamada 25 cm²'lik küçük flasklarda geliştirilmiş ve yüzeye yapışan C6 hücreleri (**Şekil 2.1.**) kültür kabının %70-80 oranını kapladığında (yaklaşık 2 gün) alt kültüre alınarak büyümesi sağlanmıştır. Bunun için küçük flask içerisindeki besiyeri çekilerek atılmış, sonra 5 mL (PBS) eklenerek yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası PBS uzaklaştırılmış ve flaska tripsin-EDTA (500 μ L) eklenmiş ve 3 dakika CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası flask hafif mekanik güç kullanılarak hücreler yüzeyden tamamen kaldırılmış ve tripsinin etkisini nötralize etmek için 5 mL taze besiyeri eklenerek süspanse hale gelmiş hücreler 50 mL'lik falkona aktarılarak 5 dakika 1250 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant

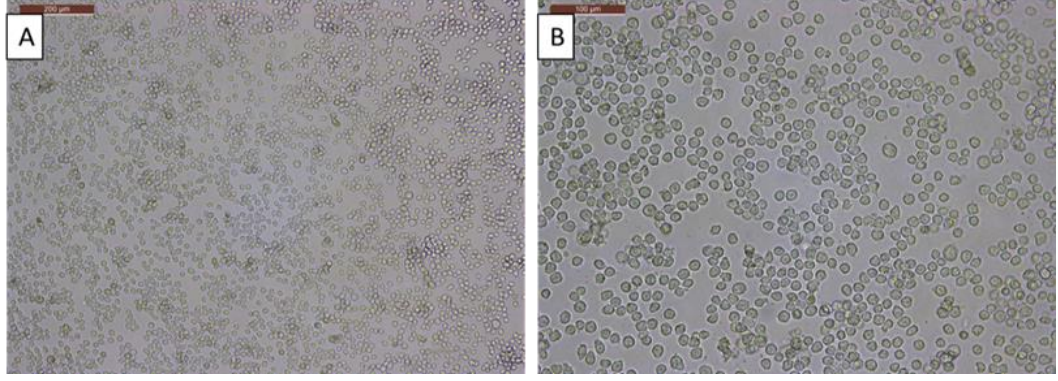
uzaklaştırılmış ve dipte kalan hücre pelletinin üzerine 15 mL taze besiyeri eklenerek elde edilen süspansiyon hücreler 75 cm²'lik büyük flaska aktarılmıştır. Büyük flask içerisinde gelişen hücrelerin bir kısmından %95 FBS ve %5 DMSO ortamında stok hazırlanmış ve deneylerde tekrar kullanılabilmesi için -80° C'de saklanmıştır.



Şekil 2.1. C6 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü: A-10X; B-20X.

2.6.1.2. THP-1 hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlık

İnsan monosit hücreler THP-1 %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin (PS), %0,1 piromisin ve %0.0004 β -merkaptoetanol içeren Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) büyüme besiyeri kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hücre hatları %5 CO₂'li etüvde 37°C sıcaklık ve %95 bağıl nem ortamında geliştirilmiştir. Hücreler ilk aşamada 25 cm²'lik küçük flasklarda geliştirilmiştir. Süspanse özellikte olan THP-1 hücreleri koloni halinde geliştirilmiştir (**Şekil 2.2.**) ve hücre yoğunluğu %70-80 oranında olduğunda (yaklaşık 2 gün) alt kültüre alınarak büyümesi sağlanmıştır. Bunun için küçük flastaki süspanse hücreler pipet yardımıyla çekilerek 50 mL'lik falkona aktarılarak 5 dakika 1100 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu hücreler dibe çöktürülerek süpernatant uzaklaştırılmış ve dipte kalan hücre pelletinin üzerinde 15 mL taze besiyeri eklenerek elde edilen hücre süspansiyonu 75 cm²'lik büyük flaska aktarılmıştır. Büyük flask içerisinde gelişen THP-1 hücrelerinin bir kısmından %95 FBS ve %5 DMSO ortamında stok hazırlanmış ve deneylerde tekrar kullanılabilmesi için -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 2.2. THP-1 hücre hattının mikroskop altındaki görüntüsü: A-10X; B-20X.

2.6.2. Hücre sayımı

2.6.2.1. C6 hücrelerinin sayımı

C6 hücreleri 75 cm²'lik flask içinde yeterli yoğunluğa ulaştığında pipet yardımı ile besiyeri uzaklaştırılır ve flaska 5 mL 1X PBS eklenerek yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkamadan sonra PBS uzaklaştırılmış ve flaska 1 mL tripsin- EDTA eklenerek 3 dakika etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hafif mekanik güç uygulanarak hücreler flasktan tamamen kaldırılmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için 5 mL taze besiyeri eklenmiş ve hücre süspansiyonu 50 mL'lik falkona aktarılarak 5 dakika 1250 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve falkon tüp içerisinde kalan hücre pelleti üzerine 1 mL taze DMEM besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Homojen hale gelmiş C6 hücreleri tripan mavisini kullanılarak hücre sayım Cedex XS (Roche – Almanya) cihazında sayılmıştır.

2.6.2.2. THP-1 hücrelerinin sayımı

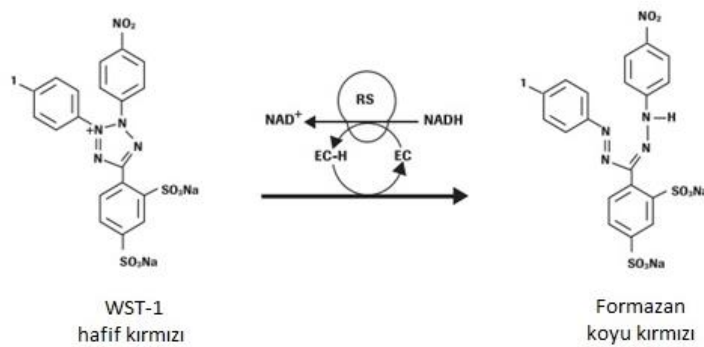
THP-1 hücreleri 75 cm²'lik flask içerisinde yeterli yoğunluğa ulaştığında serolojik pipet yardımıyla flasktan çekilerek 50 mL'lik falkona aktarılmıştır. Falkon içindeki hücre süspansiyonu 5 dakika 1100 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve falkon tüp içinde kalan hücre pelletinin üzerine 1 mL taze RPMI-1640 besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Pipetaj sonucu homojen yoğunluk sağlanmış ve THP-1 hücreleri tripan mavisini kullanılarak hücre sayım Cedex XS (Roche – Almanya) cihazında sayılmıştır.

2.6.3. WST-1 yöntemi ile C6 hücrelerinde PCA' nın sitotoksik etkileri

Tetrazolyum tuzları ile hücrelerde canlılık testleri 3 aşamayı içermektedir. Birinci aşamada hücreler belirlenmiş bir süre içinde belirli toksik madde etkisine maruz bırakılır. İkinci aşamada toksik madde uzaklaştırılarak yöntem uygun olarak

tetrazolyum tuzları ortama eklenir ve canlı hücrelerin bu tetrazolyum tuzlarını indirgeyerek formazon oluşumunun sağlanması ve renk değişiminin gerçekleşmesidir. Üçüncü aşamada spektrofotometrik olarak absorbans değerlerinin ölçülündeki canlı/ölü hücre oranlarının belirlenmesidir (Mossman, 1983; Riss ve Moravec, 2004).

Bir tetrazolyum tuzu olan WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate), kültürde serbestçe diffüze olmakta ve canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanarak suda çözünmeyen formazan tuzlarına dönüşür. Bu özelliklerinden dolayı, WST-1 yöntemi kolay uygulanan bir yöntemdir (Galluzi vd., 2009). Kullanıma hazır hücre proliferasyon reaktifi WST-1 hücresel mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından tetrazolyum tuzu WST-1'in formazana dönüşümüne dayanan hücre canlılığı/proliferasyonunu ölçmek için kullanılmaktadır (Şekil 2.3.). WST-1 yönteminde canlı hücre sayısı ile ilişkili olan ve spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değeri, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerinin göstergesidir. Canlı hücrelerin sayısındaki artışa bağlı olarak, formazan tuzu oluşumu ile absorbans değeri de artış gösterir (Carmicheal vd., 1987; Lian vd., 2003; Engur ve Dikmen, 2017). Oluşan formazan oranına göre, 420 -480 nm'de absorbans değerleri ölçülerek hücre canlılığı belirlenebilir. Bu yöntem radyoaktif değildir, hızlıdır ve MTT, XTT veya MTS tabanlı testlerden daha hassastır.



Şekil 2.3. WST-1 boyasının kimyasal yapısı (<http://7>)

Sıçan C6 glioma hücreleri, %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisillin/streptomisin (PS) ve %0,1 piromisin içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) büyüme besiyerinde %5 CO₂'li etüvde, %95 bağıl nem'de 37 °C sıcaklıktaki kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra

hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5x10³ hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. C6 hücrelerini yapışmaları için etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır ve 24 saatin sonunda plakalardan besiyeri uzaklaştırılmıştır. PCA stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak uygun PCA (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mM) konsantrasyonları plakalardaki hücreler üzerine uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücelere sadece medyum uygulanmıştır. Konsantrasyonlara bağlı olarak oluşabilecek renk değişikliklerini belirlemek için PCA konsantrasyonları hücre içermeyen kuyulara 100 µL olacak şekilde dağıtılmış ve böylece kör grupları oluşturulmuştur. Daha sonra plakalar 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 96'lık kuyucuktaki hücreler üzerine, WST-1 kit (Katalog no:11644807001, Roche) talimatlarına göre 10 µL WST-1 reaktifi ilave edilerek, hücreler 3 saat inkübatörde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda absorbanslar 420 nm dalga boyunda ELİZA okuyucu cihazında (Cytation 3 Multi-mode Reader, Biotek) her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde okunmuştur. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir. Kör değerleri de değerlendirilerek elde edilen sonuçlar canlılık formülüne göre hesaplanıp % canlılık olarak hesaplanmıştır.

$$\%canlılık = (\text{Örneğin absorbans değeri}) / (\text{Kontrolün absorbans değeri}) \times 100$$

2.6.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA-DP) C6 Hücrelerinde Protokateşuik asit (PCA)' in Anti – Proliferatif Etkilerinin Belirlenmesi

PCA' nın, WST-1 sitotoksitesite yöntemi ile tarama yapılarak elde edilen konsantrasyonları ile gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA-DP) kullanılarak C6 hücrelerinde IC₅₀ değeri belirlenmiştir. Hücre proliferasyonunun kinetiği, doku kültürü E-plakalarının tabanına dahil edilen birbirine bağlı mikro elektrotlar boyunca elektriksel empedansı ölçen xCELLigence RTCA DP cihazı ile izlenmiştir. Hücre indeksi (CI) değeri olarak belirtilen elektriksel empedans, hücre sayısı, canlılık ve hücre morfolojisi hakkında nicel bilgi sağlar (Bird ve Kirstein, 2009).

C6 hücreleri %10 FBS, %1 Pen-Strep ve %0,1 piromisin içeren DMEM besiyeri içinde %5 CO₂'li etüvde, 37°C, %95 bağıl nemde geliştirilerek yeterli yoğunluğa ulaşmıştır. Hücreler geliştirildikten sonra gerçek zamanlı hücre analizi için kullanılan xCELLigence cihazında deney kurulmuştur. Bunun için 16 kuyucuklu E-plakaların her bir kuyusuna 100 µL DMEM besiyeri eklenerek ilk ölçümler alınmıştır. İlk ölçümlerden

sonra cihaz durdurulmuş ve 100 µL besiyeri içerisinde her kuyuya 1×10^4 sayıda olacak şekilde C6 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Bir kuyu hücresiz sadece medyum olarak ayrılmıştır. E-plakalar cihaza yerleştirilerek 1 saatlik aralıklarla empedans ölçümü alınmıştır. Yaklaşık 24 saat sonra, hücreler log büyüme fazındayken, cihaz durdurulmuş ve E-plakaların kuyularından 100 µL besiyeri çekilerek atılmıştır. Daha sonra PCA' nın WST-1 yöntemi ile seçilmiş konsantrasyonları hücreler üzerine 100 µL besiyeri içinde uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak 0.3 mM karmustin kullanılmıştır ve cihaz tekrardan çalıştırılmıştır. RTCA-DP cihazında çalışılan gruplar aşağıdaki gibidir:

Kontrol (medyum)

PCA (0,5 mM)

PCA (2,8 mM)

PCA (5 mM)

Karmustin (0,3 mM)

İnkübasyon sürelerine göre IC_{50} değerlerini belirlemek için 24,48 ve 72 saatlerde konsantrasyon yanıt eğrileri oluşturulmuş ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

2.6.5. THP-1 insan monosit hücrelerinin makrofaja farklılaştırılma çalışmaları

Tez çalışmamızda, THP-1 insan monosit hücreleri, THP-1 kökenli makrofajlara (M0) farklılaştırılmıştır. THP-1 kökenli makrofajlarda (M0), M1 polarize makrofajlara farklılaştırılarak C6 sıçan glioma hücrelerinde anti-proliferatif etkileri WST-1 sitotoksitesite yöntemi ile araştırılmıştır.

2.6.5.1. THP-1 insan monosit hücrelerinin THP-1 kökenli makrofaja (M0) farklılaştırılması

İnsan monosit THP-1 hücreleri %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin (PS), %0.1 piromisin ve %0.0004 β -merkaptotanol içeren Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) büyüme besiyeri kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler yeterli yoğunluğa (%70-80) ulaştığında sayım yapılmıştır. Sayım sonrası THP-1 hücreleri serumsuz RPMI-1640 büyüme besiyeri içerisinde 1×10^6 sayıda olacak şekilde 25 cm² lik küçük flaska aktarılmış ve 100 ng/mL PMA konsantrasyonu ile 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası PMA' nın

etkisini uzaklaştırmak için serum içeren RPMI-1640 büyüme besiyeri ile 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

2.6.5.2. THP-1 kökenli makrofaj (M0) hücrelerinin, M1 polarize alt türüne farklılaştırılması

THP-1 insan monosit hücrelerinin THP-1 kökenli makrofajlara (M0) farklılaştırılmasından sonra, 48 saatlik inkübasyonun ardından M1 makrofajlara farklılaştırılması için sırasıyla IFN- γ ve LPS içeren kültür ortamına maruz bırakılmıştır. Bunun için M0 makrofajlara 20 ng/mL IFN- γ + 1 μ g/mL LPS konsantrasyonları eklenerek 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası IFN- γ ve LPS' li besiyeri (süpernatant) toplanmış ve içerisinde hücre kalmaması için 5 dakika 1100 rpm' de santrifüj edilmiştir. Daha sonra hücreler, IFN- γ ve LPS'nin etkisini gidermek için normal besiyeri ile 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası besiyeri tekrar toplanmış ve aynı şekilde besiyeri içerisinde hücre kalmaması için süpernatant 5 dakika 1100 rpm' de santrifüj edilmiştir. M1 polarizasyon sırasında elde edilen ve yukarıda açıklanan 2 farklı süpernatant (M1 ve M1-1 makrofaj süpernatantı olarak kodlanmıştır) sonraki deneylerde sitokin ortamı olarak kullanılmak için stoklanmıştır.

2.6.6. Gerçek Zamanlı Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) çalışmaları

Gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), PCR reaksiyonunun her döngüsü sırasında amplifikasyon ürünlerinin üretimini izlemek için floresan roportör molekülleri kullanır. Bu, nükleik asit amplifikasyonu ve saptama adımlarını tek bir homojen deneyde birleştirir ve amplifikasyon ürünlerini saptamak için jel elektroforezine olan ihtiyacı ortadan kaldırır. Uygun kimyasalların ve veri analizinin kullanılması, amplikon tanımlaması için Southern blot veya DNA sekanslama ihtiyacını ortadan kaldırır. Basitliği, özgüllüğü ve hassasiyeti, yüksek verim potansiyeli ve daha güvenilir enstrümantasyon ve gelişmiş protokollerin piyasaya sürülmesiyle birlikte, gerçek zamanlı RT-PCR RNA seviyelerinin tespiti ve / veya karşılaştırılması için bir kıyaslama teknolojisi haline gelmiştir (Bustin vd., 2005).

2.6.6.1. THP-1 kökenli makrofaj (M0) hücrelerinin M1 polarize alt türüne farklılaştırılması çalışmasının RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi

THP-1 kökenli M0 makrofaj hücrelerinin M1 polarize makrofajlara farklılaşmasını doğrulamak için bazı genlerin (TNF- α , IL-1 β), mRNA ekspresyon

düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir.

THP-1 insan monosit hücreleri 1×10^6 sayıda serumsuz RPMI-1640 besiyeri içerisinde 100 ng/mL PMA konsantrasyonu ile THP-1 kökenli M0 makrofajlara farklılaştırılmıştır. M0 makrofajlar aynı şekilde serumsuz RPMI -1640 besiyeri içerisinde 20 ng/mL IFN- γ + 1 μ g/mL LPS konsantrasyonlarına maruz kalarak 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır ve M1 polarize makrofajlara farklılaştırılmıştır. İnkübasyon süreçleri hesaba katılarak hem IFN- γ ve LPS uygulamalarından 24 saatlik inkübasyon sonucu farklılaşmış M1 polarize makrofajlar, hem de 24 saatlik inkübasyon sonrası serumlu RPMI-1640 besiyeri ile 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her iki inkübasyon sonrası farklılaştırılmış olan M1 polarize makrofajlardan RNA izolasyon yöntemi ile RNA izole edilmiştir. RNA verimi NanoDrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ölçüm cihazında 260 nm ve 280 nm optik aralıkta ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Daha sonra RNA' dan her örnek için (100 ng/örnek) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Makrofaj polarizasyonunu doğrulamak için kalıp cDNA' dan housekeeping gen olan GAPDH (Gliseralehid-3-fosfat dehidrogenaz) kullanılarak TNF- α ve IL-1 β genlerinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir (**Tablo 2.1.**).

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (katalog no:05091284001, Roche) prosödürü uygulanmış ve sentez iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada PCR tüplerine 1 μ L Oligo (dT)18 primeri (2.5 μ M), her bir örnek için eşit miktarda RNA (100ng) koyulmuştur ve toplam hacmi 11.4 μ L' e steril distile su ile tamamlanmıştır. Daha sonra tüplerdeki örnekler PCR Thermal Cycler cihazında 65°C'de 10 dakika denature edilmiştir. Bu süreçte örnek sayısına uygun olacak şekilde, 4 μ L Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer (1X ve 8 mM MgCl₂ içerir), 0.5 μ L RNase inhibitörü (20 U), 2 μ L dNTP karışımı (her biri 10mM) ve 1 μ L DTT (5mM) eklenerek miks hazırlanmıştır. İkinci aşamada denatüre edilmiş tüplerin her birinin içerisine hazırlanmış olan miksten 7.5 μ L ve ardından 1.1 μ L Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (10 U) ilave edilerek toplam hacim 20 μ L'ye tamamlanmış ve tekrar PCR Thermal Cycler cihazında 55°C'de 30 dakika, 85 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA' lar, LightCycler® 480 RT-PCR cihazında yöntemine uygun kit (Syber Green Master Mix, Roche) ve

primerler kullanılarak amplifi edilmiştir. TNF- α ve IL-1 β genlerinin mRNA seviyeleri THP-1 (kontrol grubu olarak) ve iki farklı inkübasyon süreci uygulanmış olan M1 makrofajlarının gen ifadeleri ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

Tablo 2.1. Genlerin dizilimleri

Genler	Kısa adı	Baz Dizisi (Forward Primer- Reverse Primer)
İnterlökin-1 Beta	IL-1 β	Forward: 5'-AAGATGCTGGTTCCTGCC-3' Reverse: 5'-GCGTGCAGTTCAGTGATCGTAC-3'
Tümör nekroz faktörü-alfa	TNF- α	Forward: 5'-GGCTTTCGGAACTCACTGGA-3' Reverse: 5'-CCCGTAGGGCGATTACAGTC-3'
Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz	GAPDH	Forward: 5'-GTCAAGGCTGAGAACGGGAA-3' Reverse: 5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTC-3'

Elde edilen sonuçlara göre inflamasyon belirteci olan IL-1 β ' nın M1-1 makrofajlarda artış göstermiş ve bu nedenle sonraki deneylerde M1-1 makrofajlardan stoklanmış süpernatant kullanılmıştır.

2.6.7. M1 makrofajlardan salgılanan sitokin ortamında protokatesuik asit (PCA)'nın C6 hücrelere hücre canlılığı üzerine etkileri

C6 hücreleri %10 FBS, %1 Pen-Strep ve %0,1 piromisin içeren DMEM besiyeri içinde %5 CO₂'li etüvde, 37°C ve %95 bağıl nemde çoğaltılarak gerekli yoğunluğa ulaştığında, 75 cm² flaskın yüzey tabanına yapışan hücreler kaldırılarak sayım yapılmıştır. Hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakalara her kuyuda 5x10³ hücre olacak şekilde ekilerek 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plakalardan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Daha sonra protokatesuik asit (PCA)'nın WST-1 yöntemi ile elde edilen 24, 48 ve 72 saatlik konsantrasyonları THP-1 kökenli makrofajlardan farklılaştırılmış M1 polarize alt türün 48 saatlik inkübasyon süreci sonrası süpernatant olarak toplanan besiyeri ile inkübe edilmiştir. M0 makrofaja IFN- γ ve LPS konsantrasyonları uygulandıktan 48 saatlik inkübasyon sonrası toplanılan normal besiyeri (M1-1 süpernatantı) içerisinde PCA (0.5, 1.5, 3.8, 5 ve 10mM) ve pozitif kontrol olarak Karmustin 0.3 mM konsantrasyonları C6 hücreleri üzerine 100 μ L besiyeri içerisinde uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere normal DMEM besiyeri eklenmiştir. Ayrıca M1-1 polarize makrofajlarının besiyeri ile de kontrol grubu

oluşturulmuştur. Madde konsantrasyonlarının renk oluşturma özeliğini belirlemek için boş plakaya madde konsantrasyonları 100 µL olacak şekilde dağıtılmış ve kör gruplar hazırlanmıştır. Daha sonra plakalar 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyusuna 10 µL WST-1 reaktifi ilave edilerek, hücreler inkübatörde 3 saat inkübe edilmiştir. WST-1 sonuçları ELİSA (Cytation 3 Multi-mode Reader, Biotek) okuyucu cihazında 420 nm dalga boyunda, her grupta 8 kuyucuk olacak şekilde okunmuştur. Birbirinden bağımsız şekilde 3 tekrar yapılan deney sonuçlarından elde edilen değerler hücre canlılığı olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiş ve diğer konsantrasyonların canlılık değerleri bu kontrol grubuna göre Microsoft Office Excel programında % canlılık olarak hesaplanmıştır. GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak elde edilen verilerden istatistiksel analiz yapılmış ve grafikleri oluşturulmuştur.

2.6.8. Migrasyon Analizi Çalışmaları

2.6.8.1. Çizik Deneyi (Hücre migrasyonu)

C6 sıçan glioma hücrelerinin göç etme yetenekleri, çizik deneyi kullanılarak değerlendirilmiştir (Fronza vd., 2009).

Sıçan glioma hücreleri (C6), %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisillin/streptomisin (PS) ve %0,1 piromisin içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) büyüme besiyerinde %5 CO₂' li etüvde, %95 bağıl nem' de 37 °C sıcaklıktaki kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler, yeterli yoğunluğa ulaştığında, yapışmış oldukları yüzey tabandan kaldırılarak sayım yapılmıştır. Sayım yapılmış hücrelerden kuyucuk başına 3 x 10⁵ hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Plaka zeminini tek sıra hücre katmanı kaplayacak kadar inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, steril 100 µL plastik pipet ucu ile kuyucuk çapı boyunca doğrusal bir yara oluşturulmuştur. Kuyucuklar 1 mL fosfat tamponlu salin (1XPBS) ile yıkanmıştır ve besiyeri içeren kontrol grubu ve PCA konsantrasyonları (0.5, 3.8 ve 5mM) kuyucuklara eklenerek Leica DM 300 invert mikroskop ile ilk fotoğraflar (0. saat) çekilmiştir. Daha sonra %5 CO₂'li etüvde, 37°C ve %95 bağıl nemde 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. Kuyucuklar 24 ve 48 saatlerde de fotoğraflanmıştır. Her kuyucuktan üç temsili görüntü ve hücrelerin göreceli migrasyonunu belirlemek için görüntülerde çizilen alanlar ölçülerek Leica LAS Görüntü Analizi programı ile analiz edilmiştir.

(Fronza vd., 2009). Veriler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak analiz edilmiştir. Deneyler en az üç kez gerçekleştirilmiştir.

2.6.8.2. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA-DP) C6 Hücrelerinin Migrasyon analizi

C6 glioma hücrelerinin göç etme yetenekleri RTCA-DP migrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada 16 kuyucuklu CIM plakalar kullanılmaktadır (Roche - Almanya). CIM plaka alt ve üst olmakla iki odacıktan oluşmaktadır (**Şekil 2.4.**). Üst odacıkta serumsuz besiyeri içerisindeki hücrelerin alt odacıktaki serumlu besiyeri içerisine göç etmesini amaçlayan bir yöntemdir ve göç etmeleri hücre boyutu ve migrasyon hızı ile ilişkilidir. Şöyle ki, daha küçük boyutlu ve migrasyonu hızlı olan hücreler alt odacıklara geçer ve çoğalır. Geçiş sırasında cihaz tarafından sinyal alınır. Migrasyon'a uğramayan hücreler ise üst odacıkta kalır ve sinyal alımı olmaz.



Şekil 2.4. Migrasyon Çalışmasında Kullanılan 16 Kuyucuklu CIM Plaka (<http-8>)

Migrasyon çalışması hem DMEM kültür ortamında, hem de THP-1 kökenli M1 makrofajlara farklılaştırılmış 48 saatlik inkübasyon sonrası toplanmış olan sitokin içeren besiyeri ortamında yapılmıştır. Bunun için CIM plakaların alt odacıklarına 160 µL serumlu DMEM besiyeri eklenmiş ve ardından üst odacıkla birleştirilmiştir. CIM plakalardan ilkinin üst odacıklarına 20 µL serumsuz besiyeri, ikinci CIM plakanın üst odacıklarına ise M1 polarize makrofajlardan toplanmış olan sitokin içeren besiyeri 20 µL olacak şekilde dağıtılmış ve plakalar %5 CO₂'li etüvde, 37°C ve %95 bağıl nemde 1 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası xCELLigence cihazında ilk

ölçümler alınmış ve cihaz durdurulmuştur. Daha sonra C6 glioma hücreleri sayım yapıldıktan sonra her kuyuda 2×10^4 hücre olacak şekilde ilk CIM plakaya 80 μ L serumsuz DMEM besiyeri içerisinde, ikinci CIM plakaya ise 80 μ L sitokinli besiyeri içerisinde hücre ekimi yapılmıştır. Her iki plakada son kuyu boş hücre bırakılarak sadece besiyerleri eklenmiştir. Hücre ekimi yapıldıktan sonra PCA' nın uygun konsantrasyonları (3.8 ve 5 mM) 100 μ L uygun ortam koşulları içeren besiyeri içerisinde uygulama yapılmıştır. Kontrol grubuna sadece uygun koşulları içeren medyum uygulaması yapılmıştır. Daha sonra CIM plakalar cihaza yerleştirilmiş ve 78 saat boyunca her 10 dakikada bir ölçüm olacak şekilde ayarlanarak analiz başlatılmıştır. Cihazdan elde edilen hücre indeksi değerleri, RTCA DP analiz programı kullanılarak slope grafikleri çizilmiştir.

2.6.9. Akridin Oranj/ Propidyum İyodür (AO/PI) Boyama Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

Tez çalışmamızda C6 hücrelerinde canlı/ölü hücreleri belirlemek için akridin oranj ve propidyum iyodür floresan boyaları kullanılmıştır. Akridin oranj (AO) ve propidyum iyodür (PI) nükleik asit bağlayıcı boyalardır. Akridin oranj (AO), hem canlı hem de ölü hücrelere karşı geçirgendir ve tüm çekirdekli hücreleri yeşil floresan olarak boyar. Propidyum iyodür (PI), hücre membranından ölü hücrelere girer ve tüm ölü çekirdekli hücreleri kırmızı floresan olarak boyar. Hem AO hem de PI ile boyanan hücreler, Förster rezonans enerji aktarımı (FRET) nedeniyle kırmızı floresan ışıldar, bu nedenle tüm canlı çekirdekli hücreler yeşili floresan ve tüm ölü çekirdekli hücreler kırmızı floresan ışıltı verir (*http-9*).

C6 sıçan glioma hücreleri %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisillin/streptomisin (PS) ve %0.1 piromisin içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) büyüme besiyerinde %5 CO₂'li etüvde, %95 bağıl nem' de 37 °C sıcaklıktaki kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında flaskın yüzey tabanından kaldırılarak Cedex XS cihazı ile sayım yapılmış ve her kuyuda 3×10^5 hücre olacak şekilde taze besiyeri ortamında 12 kuyucuklu plakaya ekim yapılmıştır. Daha sonra plaka 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki besiyeri atılmış ve kuyucuklar 1 mL 1XPBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kontrol grubu ve pozitif kontrol (karmustin 0.3 mM) ve PCA' nın uygun konsantrasyonları (3.8, 5 ve 10mM) DMEM besiyeri içerisinde ya da M1-1

sitokin ortamı içerisinde kuyucuklara uygulanmıştır. Daha sonra plakalar inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası boyama işlemi aşağıdaki sıralamaya göre gerçekleştirilmiştir;

- Kuyucuklardaki besiyeri pipet ucu ile çekilerek atılmıştır.
- Hücreler oda ısısında 1xPBS ile yıkanmış ve %70 soğuk etanol ile 5 dakika fikse edilmiştir.
- Kuyulardan fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılmış ve hücreler önce steril distile su daha sonra ise 1XPBS ile yıkanmıştır.
- PBS içerisinde 100µg/mL konsantrasyonda hazırlanan akridin oranj/propidyum iyodür (AO/PI) karışımından her kuyucuğa 500 µL eklenerek hücreler karanlıkta oda ısısında 15-20 dakika bekletilmiştir.
- Kuyucuklardan boya çekilerek atılmış ve hücreler 1XPBS ile yıkanmıştır.

Yıkama işleminden sonra hücrelerin üzerine 1XPBS eklenmiş ve plaka Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader cihazına yerleştirilerek hücreler 10X büyütme ile fotoğraflanmıştır.

2.6.10. Koloni Formasyon (Agaroz koloni - 3D) Analizi

Koloni formasyon analizi, *in vitro* hücresel dönüşümü değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Yöntemin prensibi, hücrelerin koloniler oluşturmak yeteneğini değerlendirmeyi amaçlıyor (Puck vd.,1956). Koloni formasyon analizinde hücrelerin bir kültür plakasında tabana tutunmadan agaroz ve besleyici ortam içerisinde büyüme ve bölünme kapasitesi gözlemlenmiştir. Daha sonra hücreler kristal viyole ile boyanarak koloniler sayılmıştır ve deney grupları arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir.

Bu çalışmamızda yüksek çözünürlüklü *agaroz (Sigma, Almanya)* kullanılmıştır. Agarozdan iki farklı tabaka katmanı hazırlanmıştır. Bu katmanlar dan ilki alt tabaka (%1,2 agaroz) ve üst tabaka (%0,8 agaroz) katmanlarıdır.

Agarozun solüsyonu otoklavda 121°C, 1.5 atm/Hg'de 20 dakika sterilizasyon ile hazırlanmıştır. %1.2 ' lık agaroz hazırlamak için 0.12 gram agaroz üzerine 11 mL distile su ilave edilmiştir. %0.8'lik agaroz hazırlamak için 0.08 gram agaroz üzerine 11 mL distile su eklenerek otoklavlanmıştır.

Çalışma 6 kuyucuklu kültür plakasında yapılmıştır. Başlangıçta içerisinde *bottom layer* agaroz bulunan baher otoklavdan alınmış ve 11 mL %20 fetal bovine serum (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) ortamı ile karıştırılmıştır. Agarozlu ortam karışımı katılaşmadan 6 kuyucukla plakanın her bir kuyucuğuna 3 mL olarak eklenmiş ve katılaşması için laminar flow kabin içerisinde bekletilmiştir.

İçerisinde *top layer* agaroz bulunan baher otoklavdan alınmış ve 11 mL %20 fetal bovine serum (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) kültür ortamı ile karıştırılmıştır. C6 glioma hücreleri kaldırılarak sayılmış, ardından *top layer* ortam karışımı içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her kuyuya 3,5 mL hücreli ortam *bottom layer* üzerine eklenmiştir. Agarozlu ortamın tamamen katılaşması için laminar flow kabin içerisinde bekletilmiştir. Katılaştıktan sonra deney gruplarının hücre canlılık testleri ile belirlenmiş konsantrasyonları ve kontrol grubu %20 FBS içeren DMEM besiyeri ile kuyucuklara eklenmiş ve plaka inkübasyona bırakılmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonrası kuyucuklar 1 defa 1XPBS ile yıkanmış ve taze besiyeri eklenerek 14 günlük inkübasyonlara bırakılmıştır. Toplam 14 gün devam eden koloni oluşumu için besiyeri ortamı, iki/üç günde bir taze besiyeri ile değiştirilmiştir. İnkübasyonlar sonunda besiyeri uzaklaştırılarak, hücrelerin üzerine metanol ve asetik asit (3:1) karışımı çözeltisi eklenerek sabitletme işlemi yapılmıştır. Bunun için her örnek için 500 µL metanol: asetik asit karışımı ile hücreler 5 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Ardından fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılmış ve 500 µL kristal viyole boyası (%0.05, MERCK) ile boyanmıştır. Hücreler boya ile 15-20 dakika bekletilmiş ve boya kalıntısı dH₂O ile uzaklaştırılmış 1., 7. ve 14. günlerde boyanan hücrelerin görüntüleri Leica LAS Görüntü Analizi programı kullanılarak fotoğraflanmıştır. Çalışma en az üç kez tekrar edilmiştir.

2.6.11. Çoğalan Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) İle İmmüno Floresan İnceleme

Protokateşuik asitin C6 hücre proliferasyonu üzerine etkilerinin belirlenebilmesi için anti-PCNA primer antibadi (PC10, Mouse mAb Cell Signalling Technology, 2586) ve Alexaflor488 (Cell Signaling Technology 4412) sekonder antibadi kullanılarak immün-floresan işaretleme yapılmıştır.

C6 sıçan glioma hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak yeterli hücre yoğunluğuna ulaştığında, hücreler yapışmış oldukları yüzeyden kaldırılarak sayım yapılmıştır. Sayım yapıldıktan sonra 6 kuyucuklu kültür plakasında her kuyuda 1×10^6 hücre olacak

şekilde ekim yapılmış ve hücreler tek tabaka oluşturuncaya kadar (yaklaşık 24 saat) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücrelerin besiyeri kuyulardan çekilerek atılmış ve 1 kez 1XPBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından kuyulara kontrol grubu, pozitif kontrol (Karmustin 300µM) ve PCA' nın uygun konsantrasyonları (3.8 ve 5 mM) uygun besiyeri içerisinde uygulanmış ve hücreler tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

- ✓ İnkübasyon sonrası hücrelerin besiyeri çekilerek atılmış ve ardından 3 kez 1XPBS ile yıkanmıştır.
- ✓ Hücreler yıkandıktan sonra her kuyuya 1XPBS içerisinde %4 paraformaldehit (PFA) ile 20 dakika fikse edilmiştir.
- ✓ Fiksasyon sonrası tekrar 3 kez 1XPBS ile yıkanmış
- ✓ %1 BSA içeren 1 X PBS içinde Triton X100 ile 15 dakika permeabilize edilmiştir.
- ✓ Hücreler 3 kez 1XPBS ile yıkanmış ve PBS tampon içerisindeki %1'lik BSA ile 1:2000 oranında dilüe edilmiş uygun primer antibadi solüsyonu: mouse monoklonal PCNA antibody (Cell Signaling Technology 2586S) eklenerek +4 °C gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- ✓ 3 kez 1XPBS ile yıkanmış ve PBS tampon içerisindeki %1'lik BSA ile seyreltilmiş sekonder antibadi: Anti rabbit IgG (H+L) F (ab)2 fragment Alexa flour 488 conjugate (Cell Signaling Technology 4412) ile 2 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşama karanlıkta yapılmıştır.
- ✓ Son olarak 3 kez 1XPBS ve ardından distile su ile yıkanmış ve Plaka Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader cihazına yerleştirilerek hücrelerin floresan görüntüleri alınmıştır.

Her gruptan en az 25 fotoğraf üzerinden rastgele seçilen alanlar incelenmiş, sonuçlar ImageJ Görüntüleme Program'ında analiz edilerek floresan yoğunluk düzeyleri belirlenmiştir. Floresan yoğunluk için sonuçlar temsili birimlerle ifade edilmiştir.

2.6.12. Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) Yöntemi

DNA hasarının belirlenmesi için jel elektroforez bazlı bir yöntem olan Alkali Comet Assay yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem DNA’da meydana gelen tek ve çift zincir kırıkları ile alkali-kararsız bölgelerin saptanmasına izin verir (Olive vd., 2006).

C6 sıçan glioma hücreleri, %10 FBS, %1 PS ve %0.1 primosin içeren DMEM kültür ortamında yeterli yoğunluğa ulaştığında yapışmış oldukları yüzey tabanından kaldırılarak sayım yapılmıştır. Sayılmış hücreler 6 kuyucuklu kültür plakasına, her kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücre besiyerleri atılmış ve taze besiyeri ile kontrol grubu, negatif kontrol ($100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) ve protokatesuik asitin uygun konsantrasyonları (3.8 ve 5 mM) ortama verilmiş ve hücreler 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon ardından hücre besiyerleri atılmış 1 mL tripsin -ETDA ile 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından tripsinin etkisini gidermek amacıyla ortama taze besiyeri eklenerek örnekler ayrı-ayrı 15 mL’lik falkon tüplere aktararak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve her örnek üzerine 1 mL PBS eklenerek pipetaj yapılmıştır. Daha sonra PBS ortamındaki örneklerin SCGE testi için lam üzerinde çalışılmıştır. Lamlar %1’lik normal agaroz jel ile kaplanarak donması beklenmiştir. Daha sonra 1 mL PBS içerisinde seyreltilmiş hücre örneğinden $14 \mu\text{L}$ alıp $140 \mu\text{L}$ % 0.1’lik düşük erime sıcaklığında agaroz ile karıştırılıp, üzeri agaroz ile kaplı lamın üzerine eklenmiştir ve dikkatli bir şekilde lamel ile kapatılmıştır. Örnekler 5 dakika $+4^\circ\text{C}$ ’de bekletilmiş ve daha sonra lamel çıkarılarak $+4^\circ\text{C}$ ’de liziz tamponu (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100, pH 10) içerisinde 1 saat bekletilmiştir. 1 saat sonra örnekler alkali tampon (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH 13) içerisine alınmış ve $+4^\circ\text{C}$ ’de 40 dakika bekletilmiştir. Sonra tüm örnekler 30 dakika 25 V ve 300 mA’de elektroforezde yürütülmüştür. Elektroforezin ardından her bir örneğe 5’ er dakika olmak şartıyla 3 kez nötralizasyon (0.4 M Tris, pH 7.5) işlemi uygulanmıştır ve ardından distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra her bir örnek preparatı üzerine $200 \mu\text{L}$ SYBR Green boyası eklenerek 1 gece $+4^\circ\text{C}$ ’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün boya yıkanmış ve Leica 6000DM floresan mikroskop ile incelemeler gerçekleştirilmiştir. Her preparattan ortalama 50 hücre sayılmış, SCGE analizi için Comet Assay 4 Programı kullanılmıştır. Sonuçlar kuyruk momenti olarak ifade edilmiştir;

$$\text{kuyruk genişliđi moment} = \text{kuyruk uzunluđu} \times \text{kuyruk \%DNA} / 100$$

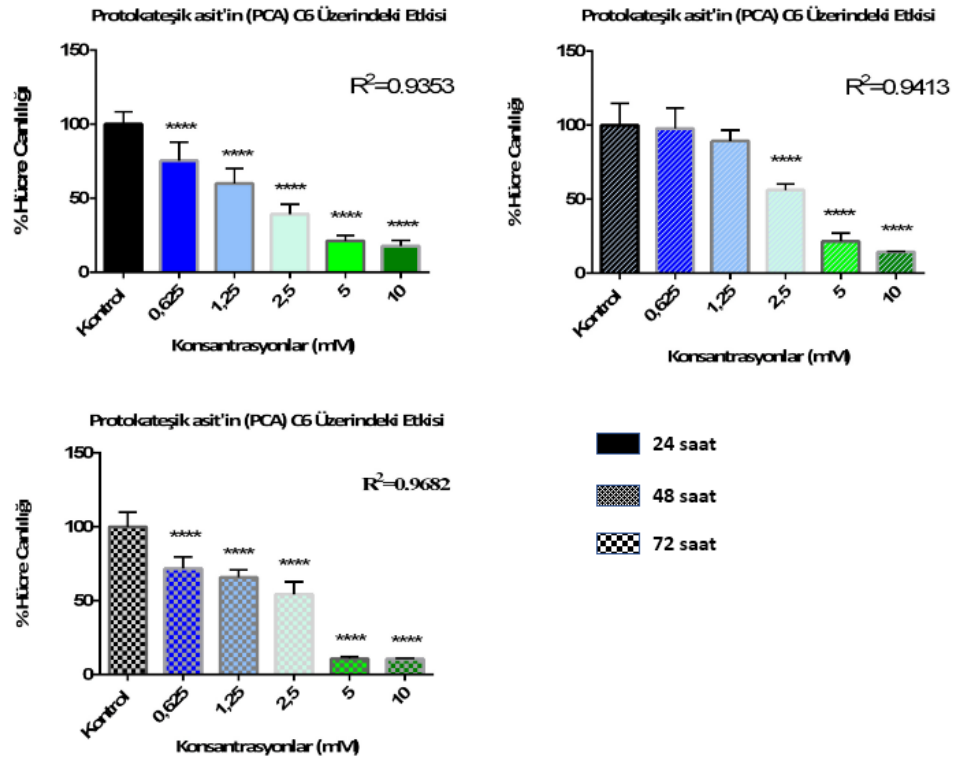
2.6.13. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{Standart sapma}$ olarak hesaplanmıştır. Deneyler 3 tekrar (n:8) olarak yapılmıştır. % hücre canlılık değerleri kontrol grubuna göre Microsoft Office Excel programında hesaplanmıştır. İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizilmesi için GraphPad Prism 6.0 programı ve SPSS Statistics 20 programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p > 0.05$ fark yok, $p < 0.05^*$ fark var, $p < 0.01^{**}$ anlamlı fark var, $p < 0.001^{***}$ önemli fark var ve $p < 0.0001^{****}$ çok önemli fark var olarak değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. WST-1 yöntemi ile C6 hücrelerinde PCA' nın sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

PCA konsantrasyonlarının (0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mM,) WST-1 yöntemi ile 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreçlerinde C6 glioma hücrehücre canlılığına olan etkileri belirlenmiştir. WST-1 sonuçlarına göre C6 hücrelerinde 24. saatteki % canlılık değerleri, kontrole göre 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 mM PCA konsantrasyonlarında sırasıyla 75.40, 59.90, 39.22, 21.18, 17.82, 48. saatteki % canlılık değerleri sırasıyla 97.78, 89.39, 56.23, 21.57, 14.39 ve 72. saatteki % canlılık değerleri sırasıyla 71.84,65.77, 54.46, 10.80, 10.56 olarak hesaplanmıştır (**Tablo 3.1.**).



Şekil 3.1. C6 hücre hattında Protokatesik asit (PCA) konsantrasyonlarının WST-1 yöntemi ile belirlenen 24, 48 ve 72. saatlerdeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($p>0.05$, **** $p<0.0001$, Ort $\pm$ Standart Sapma, $n=8$)

WST-1 yöntemi ile PCA gruplarından 24 ve 72. saatlerde 0,625 - 10 mM aralığında (**** $p<0.0001$), 48. saatde ise 0.625, 1.25 mM konsantrasyonlarda $p>0.05$, 2,5 - 10 mM aralığında anlamlı (**** $p<0.0001$) sonuçlar gözlemlenmiştir. Elde edilen verilere göre PCA' nın artan konsantrasyonlarında C6 glioma hücrelerinin %hücre canlılığı azalmıştır (**Şekil 3.1.**).

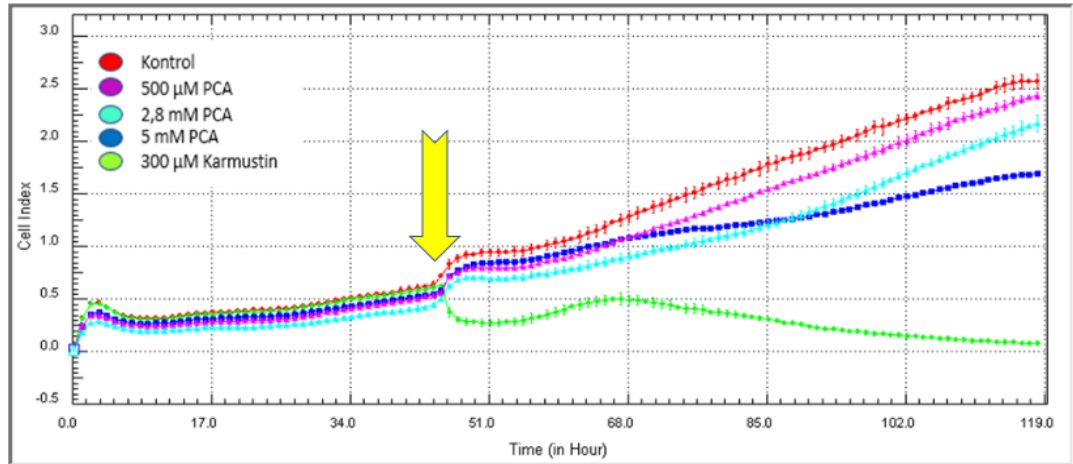
Tablo 3.1. C6 hücrelerinin % canlılıkları (Kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir)

Konsantrasyonlar (mM)	Madde Konsantrasyonlarının % Hücre Canlılıkları		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
0.625	75,40163	97,7837946	71,84006
1.25	59,90255	89,3802647	65,76823
2.5	39,21517	56,2374649	54,45884
5	21,18778	21,5703971	10,797885
10	17,8167	14,3902928	10,55658

WST-1 sonuçlarına göre Microsoft Office Excel kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda C6 glioma hücreleri için PCA' nın IC₅₀ değeri 24 saat için 1,7 mM, 48 saat için 2,8 mM ve 72 saat için 3,8 mM olarak hesaplanmıştır.

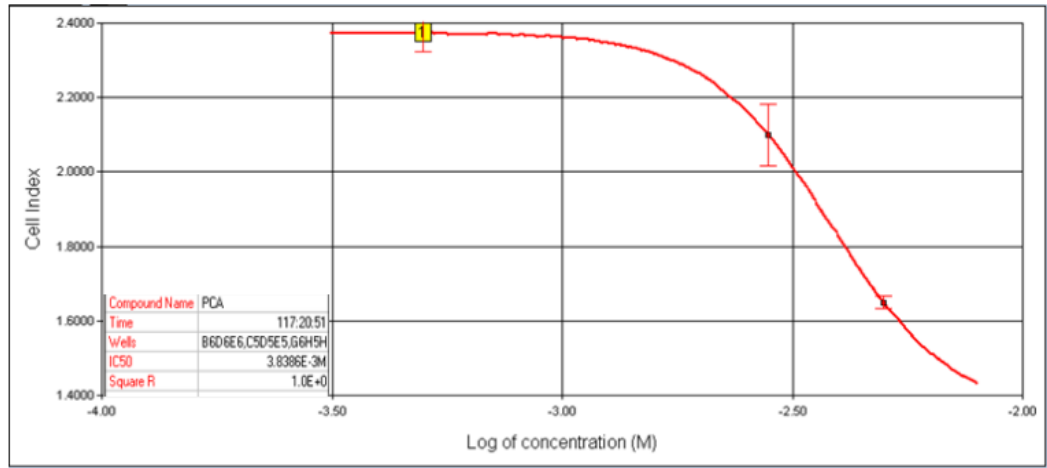
3.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak C6 Hücrelerinin PCA için IC₅₀ Değerlerinin Değerlendirilmesi

WST-1 sitotoksosite yöntemi ile yapılan tarama sonucunda belirlediğimiz 500 µM ve 5 mM PCA ve pozitif kontrol olarak karmustin 500 µM, 2.8 ve 5 mM PCA konsantrasyonları ile, pozitif kontrol olarak da 300 µM karmustin'in C6 glioma hücrelerinde antiproliferatif etkileri gerçek zamanlı hücre analiz (RTCA DP) sisteminde karşılaştırılmıştır. **Şekil 3.2'** de C6 glioma hücrelerinde PCA konsantrasyonlarının antiproliferatif etkileri, gerçek zamanlı (saat başı veri alınmıştır) olarak görülmektedir.

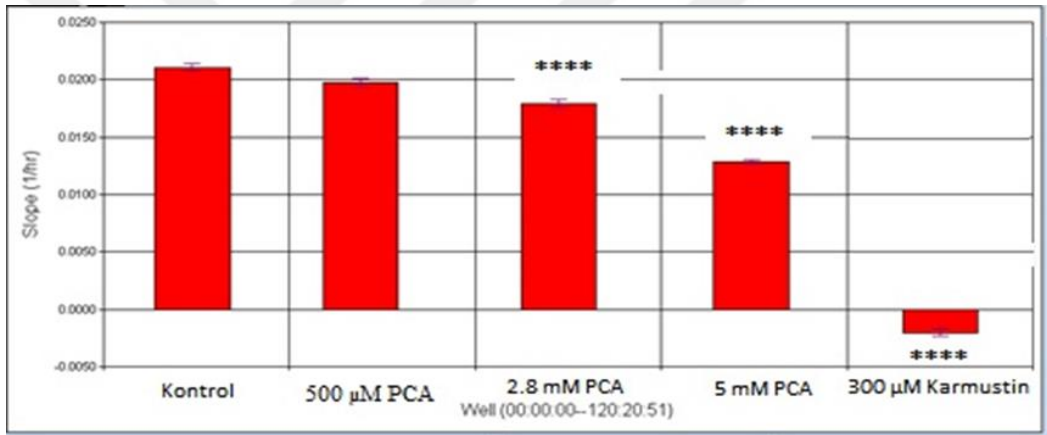


Şekil 3.2. PCA konsantrasyonlarının 72 saatlik C6 hücre proliferasyon eğrisi (sarı ok:konsantrasyon uygulandığı saat, n=6, ort± standart sapma)

PCA konsantrasyonlarının uygulanmasından 72 saat sonra cihaz durdurulmuş (120. saat) ve IC₅₀ değerleri RTCA DP Software 1.2.1 programı tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır (**Şekil 3.3.**). Hesaplamalar sonucu elde edilen verilere göre PCA' nın C6 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 3,8 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. RTCA- DP sisteminde PCA' nın C6 hücrelerinde 72. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC_{50} : 3,8 mM).



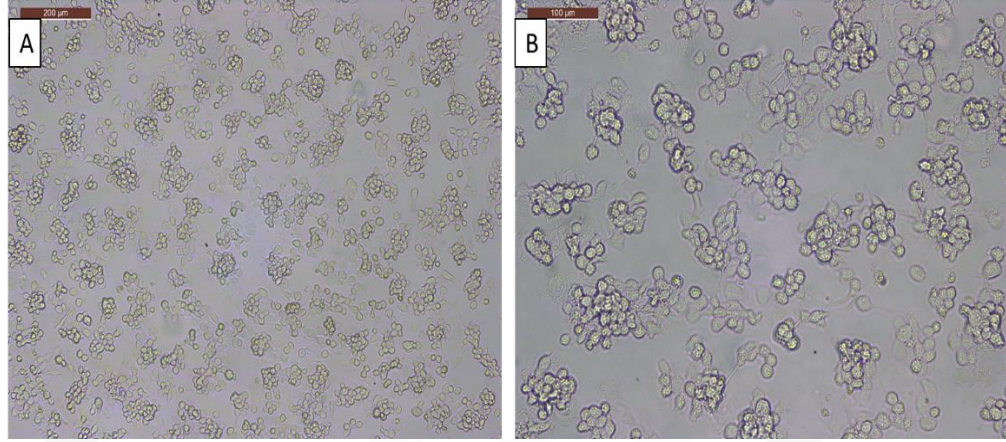
Şekil 3.4. RTCA- DP sisteminde C6 hücreleri üzerinde PCA konsantrasyonlarının 72. saatteki Slope Grafik ve kontrole göre istatistiksel olarak anlamlılık değerleri: ($p > 0.05$ fark yok, **** $p < 0.0001$, Ort $\pm$ Standart Sapma, $n = 6$)

Şekil 3.4' e göre C6 glioma hücrelerinde 500 µM, 2.8 ve 5 mM PCA kontrol grubuna göre hücre canlılığı 72 saatte sırasıyla % 13.36, 17.24 ve 26.56 oranında azaldığı ve 300 µM karmustin'in hücrelerin tamamen öldürdüğü belirlenmiştir.

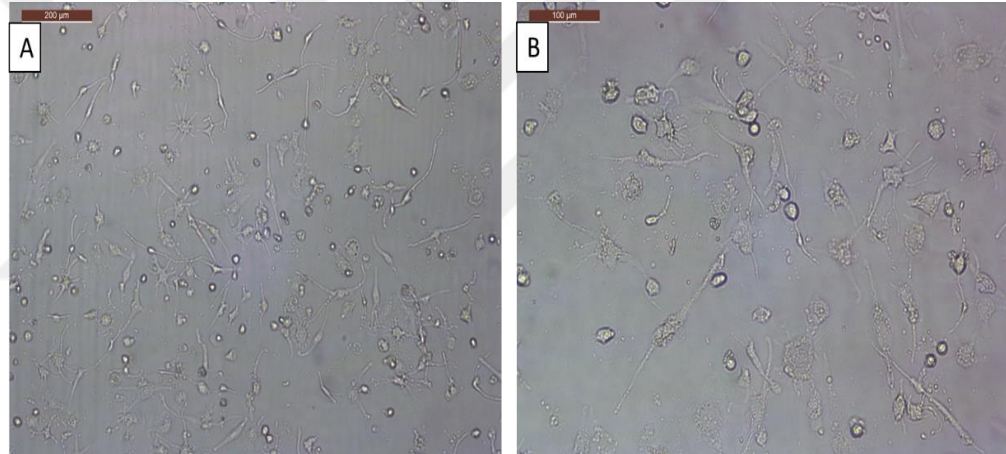
3.3. THP-1 monosit hücrelerinin makrofaja farklılaşma çalışmaları

Tez çalışmamızda THP-1 hücreleri %1 FBS içeren besiyeri içerisinde PMA'nın 100 ng/mL konsantrasyonu ile 24 saatlik inkübasyon sonucu M0 makrofaj hücrelerine farklılaştırılmıştır (Şekil 3.5.). Daha sonra ortamdan PMA'nın uzaklaştırılmasının ardından, hücreler büyüme besiyeri ile 48 saatlik dinlenmeye bırakılmıştır. 48 saatin ardından 20 ng/mL IFN- γ + 1µg/mL LPS konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyon sonucu M1 polarize makrofajlar optimize edilmiştir (Şekil 3.6.). Daha sonra hücreler 48

saat normal besiyeri ile dinlenmeye bırakılmış (M1-1) ve diğer deneylerde kullanılmak için sitokin içeren medyum ortamı toplanmıştır.



Şekil 3.5. THP-1 kökenli M0 makrofajların mikroskop altındaki görüntüsü: A-10X;B-20X.



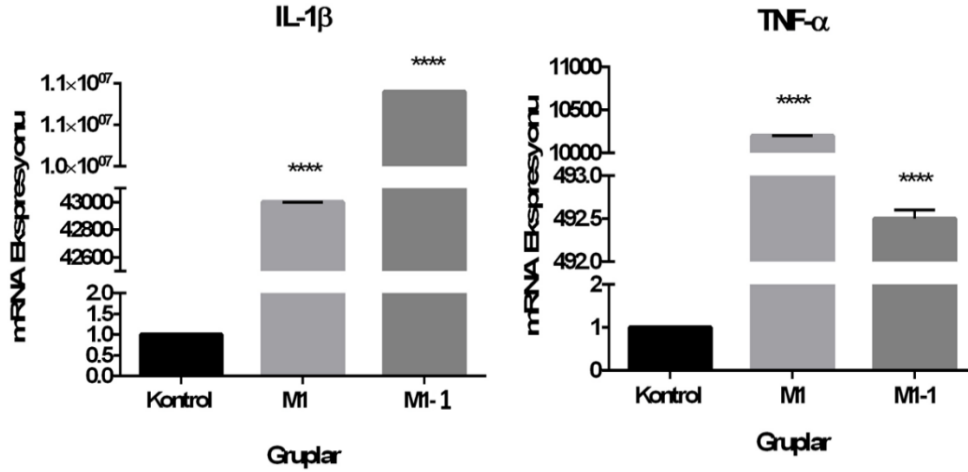
Şekil 3.6. M1 polarize makrofajların mikroskop altındaki görüntüsü: A-10X; B-20X.

3.4. RT-PCR çalışmalarının değerlendirilmesi

3.4.1. THP-1 kökenli makrofaj hücrelerinin M1 polarize alt türüne farklılaştırılması çalışmalarının RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi

THP-1 kökenli M0 makrofaj hücrelerinin M1 polarize alt türe farklılaştırılmasını doğrulamak amacı ile bazı genlerin (TNF- α , IL-1 β), mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir. Bunun için M1 (IFN- γ ve LPS ile uyarıldıktan 24 saat sonra) ve M1-1 (48 saatlik dinlenme sonrası) polarize makrofajlar kullanılmıştır. Bu yöntemde, RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilerek kalıp cDNA'dan IL-1 β ve TNF- α amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmış ve elde edilen sonuçlar 'Advanced Relative Quantification' programı (Software Release 1.5.0 SP4

version 1.5.0.39) kullanılarak analiz edilmiştir ve GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak elde edilen verilerden istatistiksel analiz yapılmış ve grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.7.).

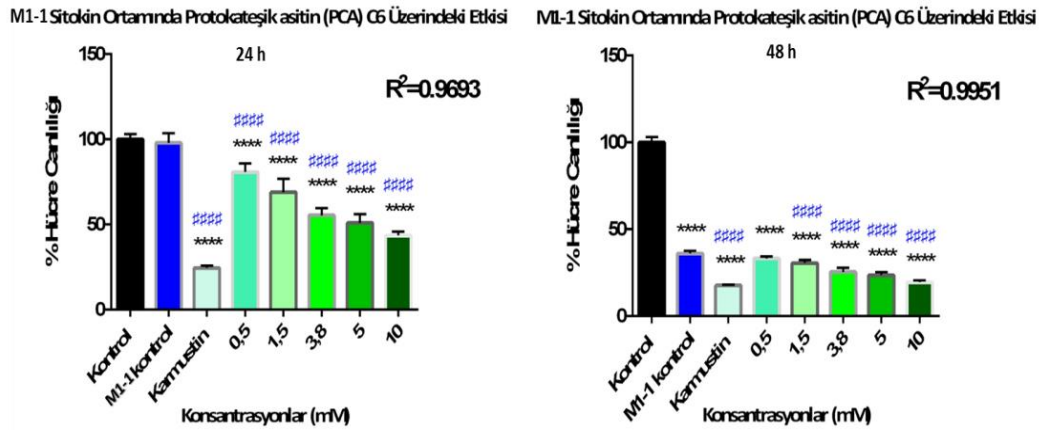


Şekil 3.7. M1 polarize makrofaj ilişkili genlere ait mRNA ekspresyonları, THP-1 kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık değerleri: (n=3, ortalama±standart sapma p<0.0001****).

Şekil 3.7’ de gösterildiği gibi IL-1β ve TNF-α mRNA ekspresyon seviyeleri THP-1 kontrol grubuna göre 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen M1 polarize makrofajlarda sırasıyla (IL-1β 43000, TNF-α 10200), 48 saatlik dinlenme sonrası elde edilen M1-1 polarize makrofajlarda sırasıyla (IL-1β 10900000, TNF-α 492.5) kat artmıştır. IL-1β ve TNF-α ekspresyon seviyelerindeki artış THP-1 kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.0001****). Sonuç olarak kontrol grubuna göre ekspresyon seviyelerinin artışı polarize makrofaj farklılaşmasının doğruluğunu desteklemiştir. İnflamasyon belirteci olan IL-1β M1-1 makrofajlarında daha çok artış gösterdiği için sonraki deneylerde M1-1 süpernatantı kullanılarak devam edilmiştir.

3.5. WST-1 yöntemi ile M1 makrofajlardan salgılanan sitokin ortamında PCA’ nın C6 hücre canlılığı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

C6 hücreleri DMEM medyumunu içerisinde 96 kuyucuklu kültür plakalarına her kuyucukta 5 x 10⁵ hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır ve ardından PCA konsantrasyonları (0.5, 1.5, 3.8, 5 ve 10 mM) 100µl sitokin ortamı (normal besiyeri ile 48 saatlik inkübasyon sonunda M1 makrofaj ortamından toplanan medyum: M1-1 ortam) içerisinde hücrelere uygulanmıştır. İnflamasyon ortamında PCA’ nın WST-1 yöntemi ile 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda hücre canlılığına olan etkileri araştırılmıştır. WST-1 yöntemine göre elde edilen sonuçlar Şekil 3.8’ de verilmiştir.



Şekil 3.8. M1-1 sitokin ortamında PCA' nın C6 hücrelerinde WST-1 yöntemi ile hesaplanmış 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($p>0.05$, $****p<0.0001$, $**p<0.01$, $\#p<0.05$ $#### p<0.0001$, Ort $\pm$ Standart Sapma $n=8$), (*Kontrol grubuna göre, # M1-1 kontrol grubuna göre)

Anlamlılık değerleri kontrol ve M1-1 kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır. Sitokin ortamında PCA' nın artan konsantrasyonlarında C6 hücrelerinin canlılığı azalmıştır. Hücrelerin %canlılık değerleri **Tablo 3.2'** de verilmiştir. Şekil 3.8 ve Tablo 3.2' de görüldüğü gibi 24. ve 48. Saatlerdeki % canlılık değerleri arasında çok önemli farklılıklar vardır. Şöyle ki, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında M1-1 kontrol grubunda 24. saatte fark yoktur ($p>0.05$), ancak 48. saatte çok önemli fark vardır ($****p<0.0001$). 0.5, 1.5, 3.8, 5 ve 10 mM PCA gruplarının 24. saatteki % canlılık değerleri sırasıyla 48. saatte önemli derecede azalmıştır. M1-1 kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında 24. saatte 0.5 mM PCA grubu ile çok önemli fark ($#### p<0.0001$) olduğu halde, 48. saatte fark yoktur ($p>0.05$).

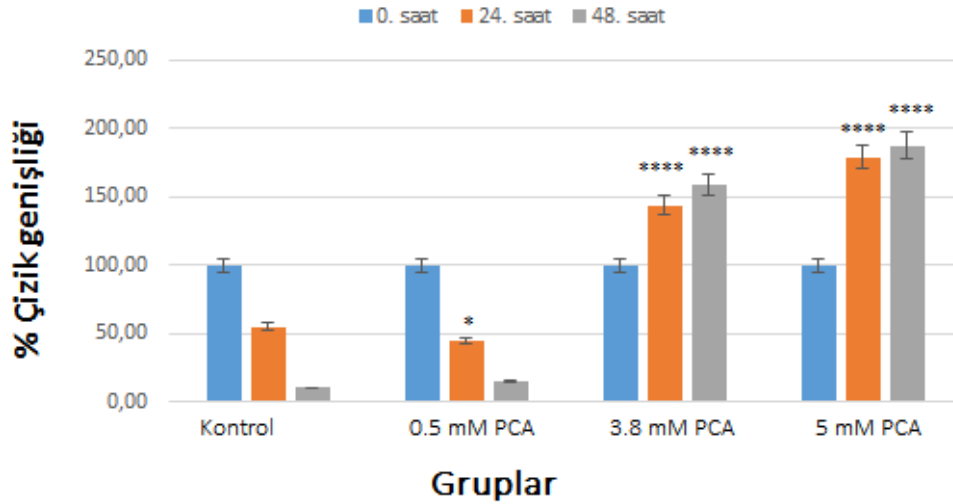
Tablo 3.2. C6 hücrelerinin % canlılık değerleri (Kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir).

Gruplar (mM)	% hücre canlılık oranları $\pm$ standart sapma	
	24 saat	48 saat
M1-1 kontrol	97,9101507 $\pm$ 6,36	36,02502 $\pm$ 1,79
0,5 PCA	80,86437305 $\pm$ 5,39	33,15326 $\pm$ 1,41
1,5 PCA	68,95081035 $\pm$ 8,69	30,53739 $\pm$ 1,92
3,8 PCA	55,45919818 $\pm$ 4,57	25,44782 $\pm$ 2,76
5 PCA	50,88143304 $\pm$ 5,73	23,58544 $\pm$ 1,92
10 PCA	43,51720216 $\pm$ 2,65	19,57634 $\pm$ 1,23
300 μ M Karmustin	24,53795849 $\pm$ 1,43	17,69974 $\pm$ 0,56

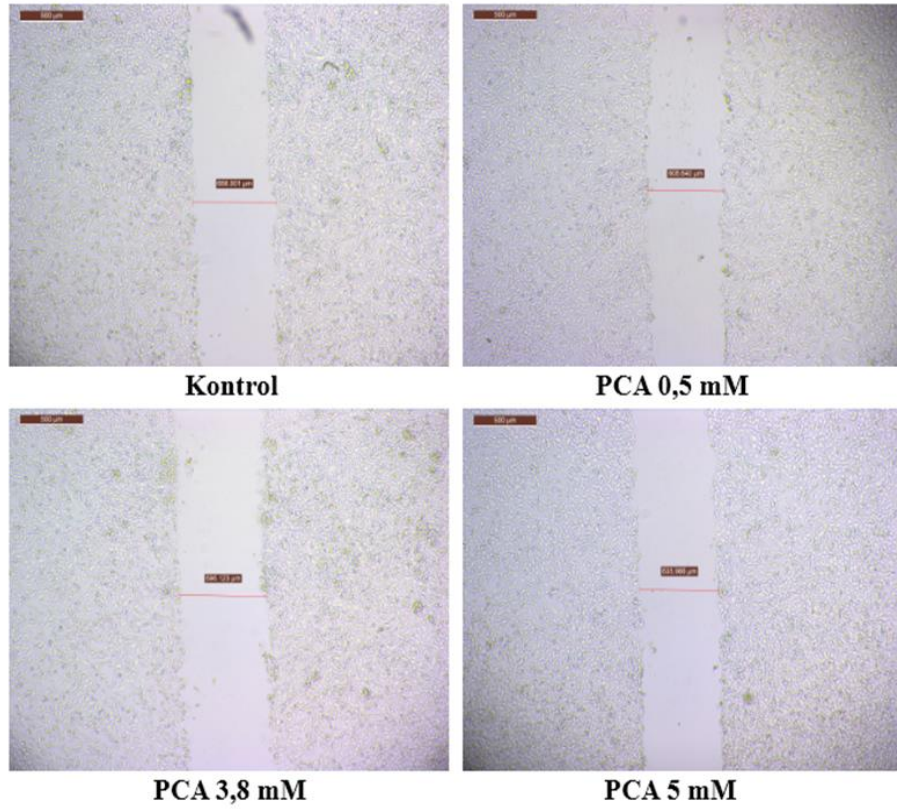
3.6. Migrasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

3.6.1. Çizik deneyi ile C6 glioma hücrelerinin göç etme (migrasyon) yeteneklerinin değerlendirilmesi

PCA' nın C6 hücrelerinde metastatik etkilerini değerlendirmek amacı ile çizik deneyi yapılmıştır. C6 hücrelerinin PCA konsantrasyonlarının uygulandığı zaman aralığında, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücrelerin ne kadar bölündüğü veya hareket ettiği gözlemlenmiştir. İlaç uygulamasından sonra 0., 24. ve 48. saatlerde fotoğraflanmış ve Leica LAS Görüntü Analizi programı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve grafik oluşturulmuştur (Şekil 3.9). PCA uygulandıktan sonra 0. saat görüntüler alınmıştır. Şekil 3.10' da görüldüğü üzere bütün gruplarda oluşturulmuş yaralar hemen hemen aynı genişliktedir.

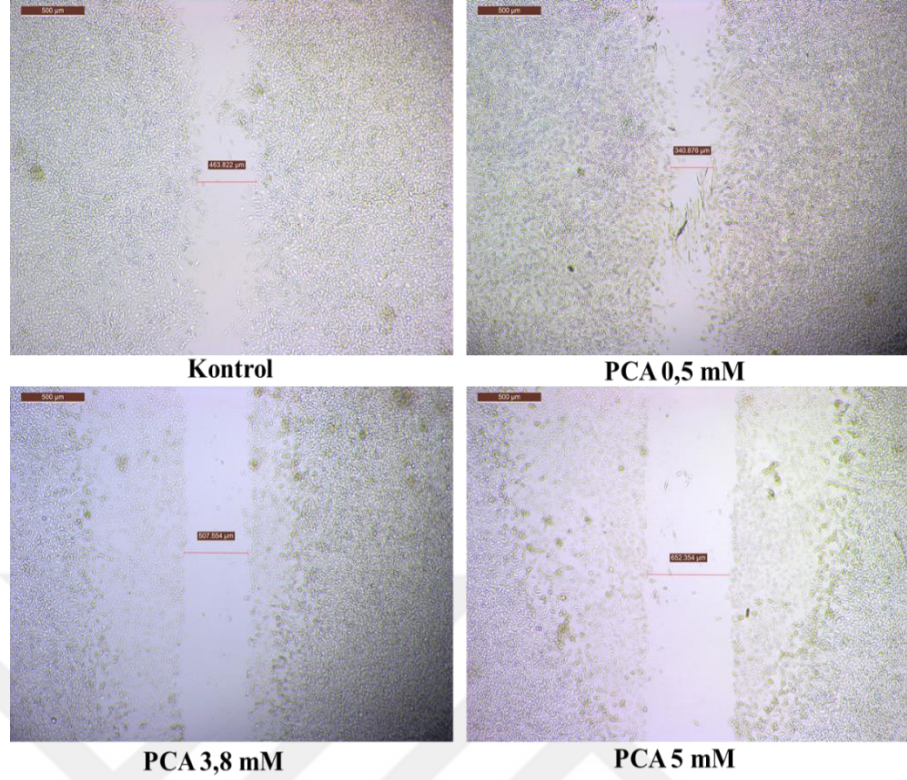


Şekil 3.9. PCA' nın C6 hücre migrasyonu üzerinde 0., 24 ve 48. saatteki %çizik genişlikleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi: ($p>0.05$, **** $p<0.0001$, * $p<0.05$, Ort $\pm$ Standart Sapma $n=8$)



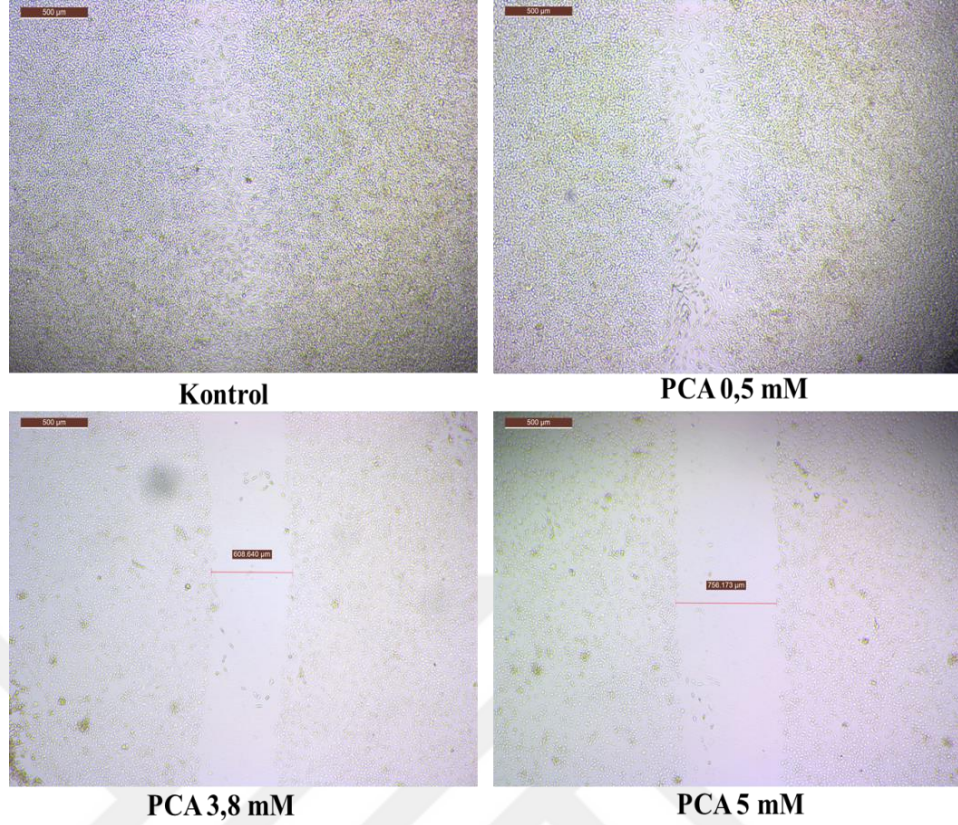
Şekil 3.10. PCA' nın C6 hücreleri üzerinde yara iyileştirici etkisinin 0. saat görüntüleri (10X)

İlaç uygulamasından 24 saat sonraki sonuçlar kontrol grubuna göre kıyaslandığında, PCA' nın zamana ve konsantrasyona bağlı olarak C6 hücreleri üzerinde etkileri olduğu gözlemlenmiştir (**Şekil 3.11.**). Kontrol grubu hücrelerinde 24 saat sonra %35 iyileşme gösterirken, 0,5 mM PCA konsantrasyonunda %45, 3,8 ve 5mM PCA konsantrasyonunda ise iyileşme gözlemlenmemiş ve zaman geçtikçe yara daha çok genişlenmiştir. Bunun nedeni, hücreler PCA' nın 3.8 ve 5 mM konsantrasyonu ile muamele edildiğinde apoptoza eğilim gösteriyor ve hücrelerde zaman geçtikçe azalma gözlemleniyor.



Şekil 3.11. PCA' nın C6 hücreleri üzerinde yara iyileştirici etkilerinin 24. saatteki görüntüleri (10X)

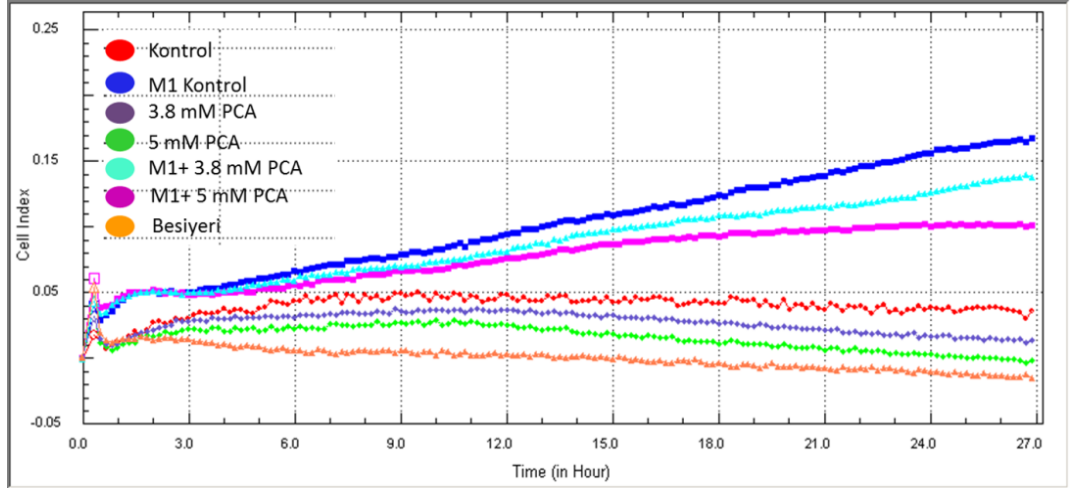
İlaç uygulamasından 48 saat sonra, sonuçlar aynı şekilde kontrol grubuna göre kıyaslandığında, PCA' nın etkilerinde artış görülmektedir (Şekil 3.12.). Kontrol grubunda oluşturduğumuz yara tamamen kapanmış, 0,5 Mm grubunda %90 ve 3,8 ve 5 mM PCA konsantrasyonunda yara daha da genişlenmiştir. Bunun nedeni 24 saatlik sonuçlarda belirttiğimiz gibi hücreler apoptoza uğradıklarından hücre sayısında azalmaların olmasıdır.



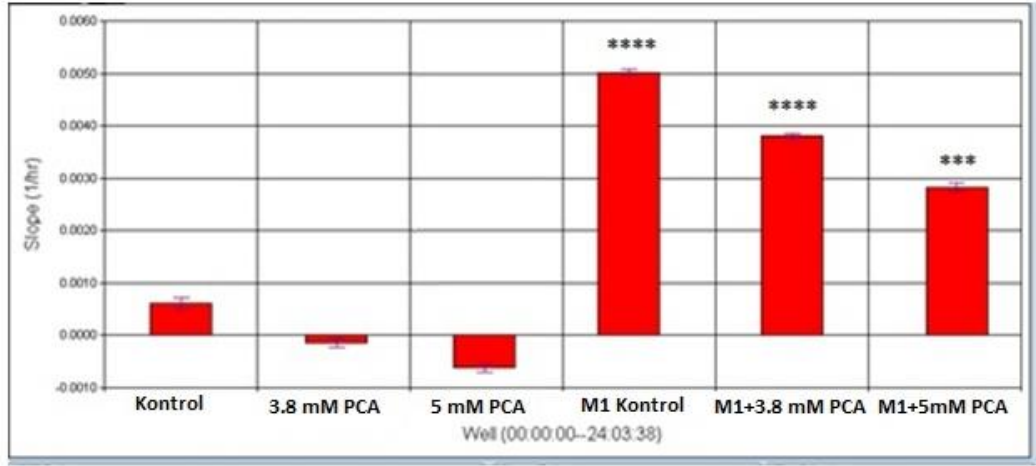
Şekil 3.12. PCA' nın C6 hücreleri üzerinde yara iyileştirici etkilerinin 48. Saatteki görüntüleri (10X)

3.6.2. PCA' nın C6 hücrelerinde hücre migrasyonuna etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA-DP) kullanılarak değerlendirilmesi

Bu çalışmada PCA' nın etkili konsantrasyonlarının C6 hücrelerinin migrasyonuna etkileri araştırılmıştır. Migrasyon için CIM plakların alt odacıklarına serumsuz medyum, üst odacıklarına ise normal medyum ve M1 sitokin ortamı içerisinde 2×10^4 C6 hücreleri ekilmiştir. Hücreler ekildikten hemen sonra üzerlerine deney gruplarına ait konsantrasyonlar uygun besiyeri ortamlarında eklenmiş ve CIM plaklar RTCA DP cihazında 48 saat inkübasyona bırakılmış ve migrasyon özellikleri süre boyunca analiz edilmiştir. **Şekil 3.13'** de görüldüğü gibi 24 saat inkübasyon sonunda kontrol grubuna göre sırasıyla 3.8 mM PCA ve 5 mM PCA konsantrasyonlarında C6 glioma hücreleri migrasyon yetenekleri azalmıştır. Ancak kontrol grubuna göre M1-1 + 5mM PCA, M1-1 + 3.8 mM PCA ve M1-1 kontrol gruplarında C6 hücrelerinde migrasyonun artmış olduğu tespit edilmiştir. 24 saat sonunda elde edilen bu sonuçlar RTCA DP Software 1.2.1 programında hücre indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ile analiz edilmiştir (**Şekil 3.14**).



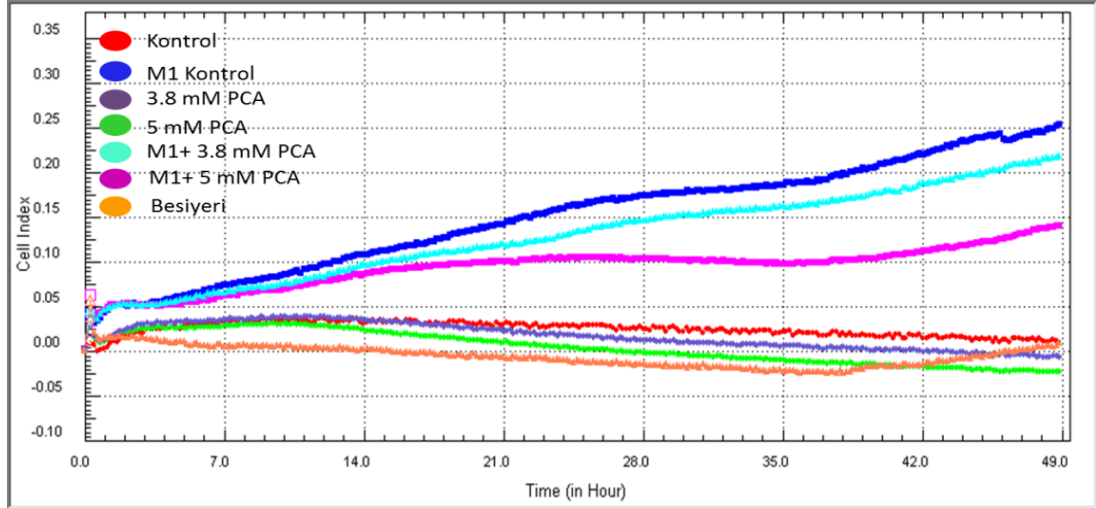
Şekil 3.13. RTCA DP sisteminde C6 glioma hücreleri üzerinde PCA ve M1 + PCA konsantrasyonlarının 24 saatlik migrasyon grafiği: (ortalama±standart sapma, n=6)



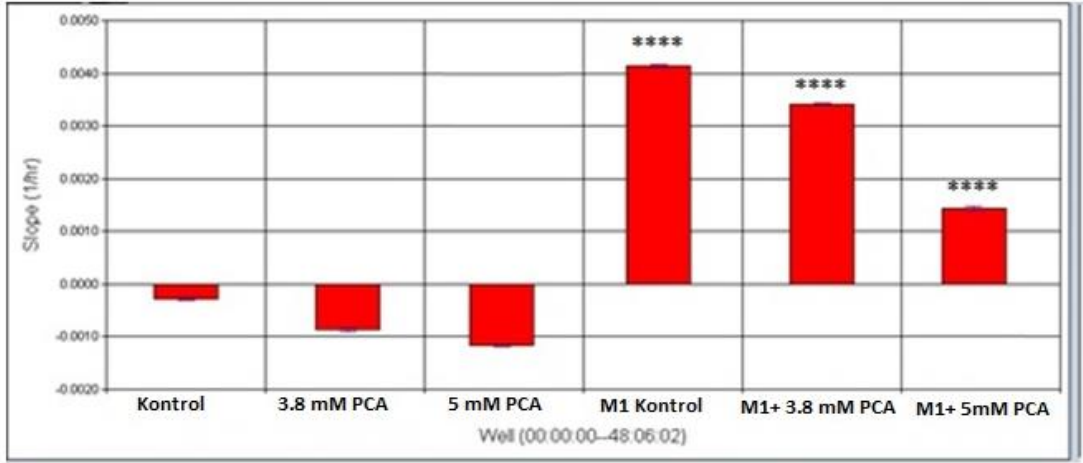
Şekil 3.14. RTCA DP sisteminde C6 glioma hücreleri üzerinde PCA ve M1 + PCA konsantrasyonlarının 24 saatlik Slope Grafiği: ($p>0.05$, **** $p<0.0001$, *** $p<0.001$, n=6)

Şekil 3.15’ de görüldüğü gibi 48 saat inkübasyon sonunda kontrol grubuna göre sırasıyla 3.8 mM PCA ve 5 mM PCA konsantrasyonlarında C6 glioma hücreleri migrasyona uğramamış ve boş besiyeri olan gruba çok yakın bir sonuç gözlemlenmiştir. Ancak kontrol grubuna göre M1-1 + 5mM PCA, M1-1 + 3.8 mM PCA ve M1-1 kontrol gruplarında C6 hücrelerinde migrasyonun önemli ölçüde artmış olduğu tespit edilmiştir.

48 saat sonunda elde edilen bu sonuçlar RTCA DP Software 1.2.1 programında hücre indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ile analiz edilmiştir (3.16).



Şekil 3.15. RTCA DP sisteminde C6 glioma hücreleri üzerinde PCA ve M1 + PCA konsantrasyonlarının 48 saatlik migrasyon grafiği: (ortalama±standart sapma, n=6)

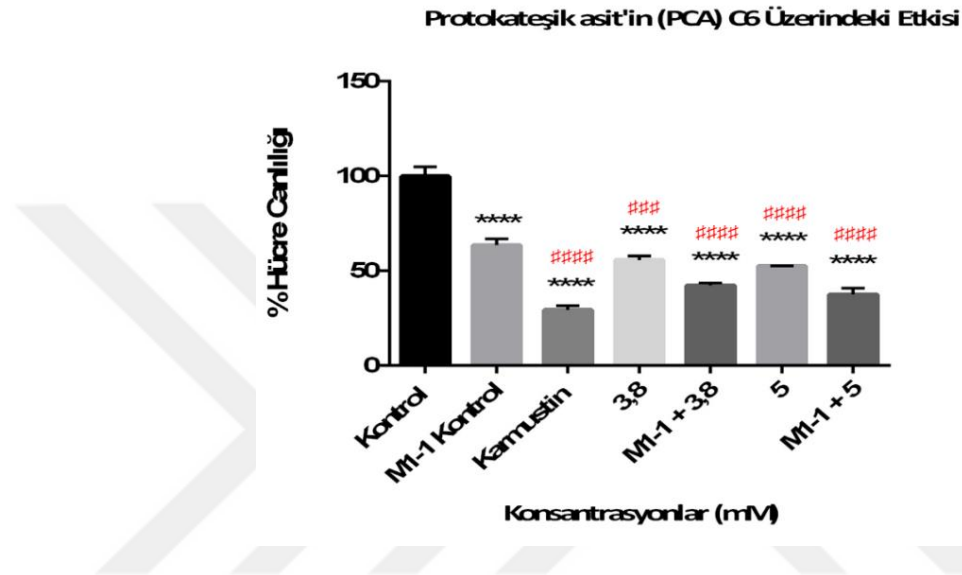


Şekil 3.16. RTCA DP sisteminde C6 glioma hücreleri üzerinde PCA ve M1 + PCA konsantrasyonlarının 48 saatlik Slope Grafiği: ($p>0.05$, **** $p<0.0001$, n=6)

3.7. Akridin Oranj/ Propidyum İyodür (AO/PI) Yöntemi İle Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

AO/PI boyama yöntemi ile C6 hücrelerinde PCA' nın etkili konsantrasyonlarının apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bunun için her bir kuyuda 3×10^5 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu plakalara ekim yapılmıştır. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda uygun PCA konsantrasyonları uygun besiyeri ortamları içerisinde hücrelere uygulanmış ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası AO/PI boyama prosedürü uygulanarak floresan ölçümler alınmış ve Cytation 3 Multi-Mode Reader cihazında kuyucukların farklı alanlarından floresan görüntüler alınmıştır. Hem AO, hem de PI hücrelerin çekirdeklerini boyama özelliğine sahiptirler.

Ancak AO canlı hücrelerin çekirdeklerini boyayarak yeşil ışıma, PI ise hasarlı ve nekrotik hücrelerin çekirdeklerini boyayarak kırmızı ışıma ile gözlemlenir (Nur Hanişah vd.,2013). Floresan ölçümlerden elde edilen sonuçlar Microsoft Office Excel programında % canlılık olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. GraphPad Prism 6.0 programı kullanılarak elde edilen verilerden istatistiksel analiz yapılmış ve grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.17.).



Şekil 3.17. PCA' nın 24 saatlik inkübasyon sonunda C6 hücreleri üzerinde AO/PI boyama yöntemine göre belirlenen floresan ölçümlerinin %hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (anlamlı farklılık var: ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$, **** $p > 0.0001$, Ort $\pm$ Standart Sapma, $n=8$), (*Kontrol grubuna göre, # M1-1 kontrol grubuna göre, karmustin 300 μ M)

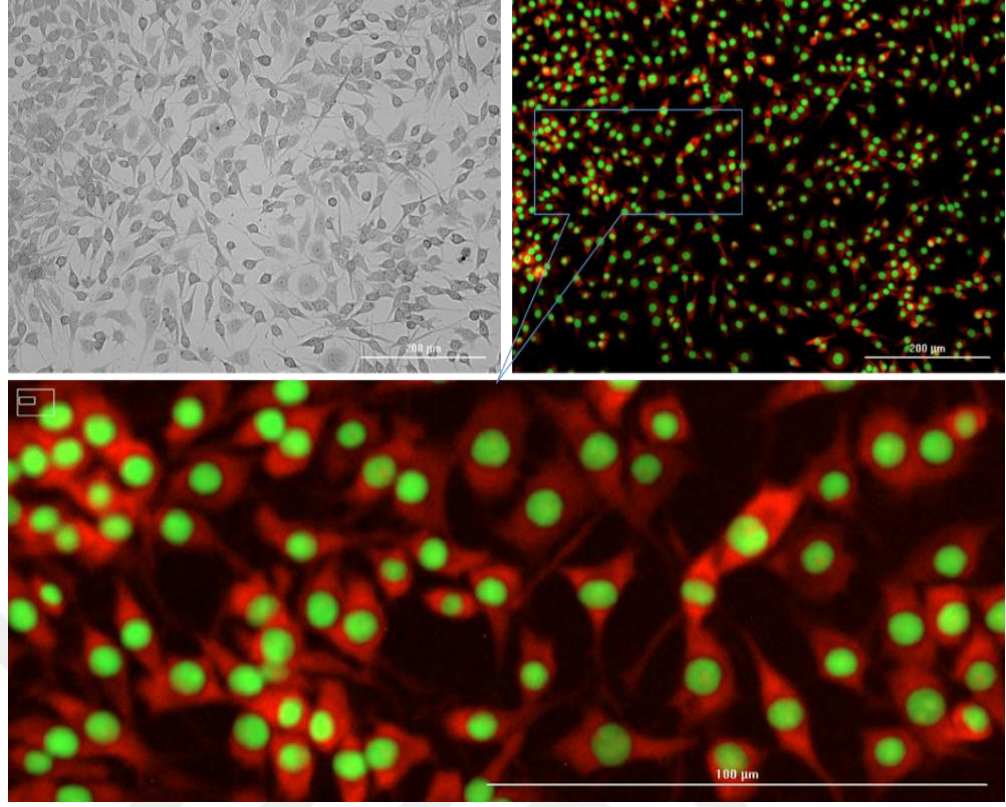
Anlamlılık değerleri medyum kontrol ve M1-1 sitokin ortam kontrol gruplarına göre hesaplanmıştır. Hücrelerin AO/PI boyama yöntemine göre belirlenen floresan ölçümlerinden elde edilen % canlılık değerleri **Tablo 3.3'** te verilmiştir. PCA' nın artan konsantrasyonlarında C6 hücrelerinin canlılıklarında azalmalar gözlemlenmiştir. Özellikle normal besiyeri ortamında PCA verilen gruplarla kıyaslandığında M1-1 sitokin ortamı ile uygulanan PCA gruplarında hücre canlılıkları daha da azalma göstermiştir. Şekil 3.17' den görüldüğü gibi 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında M1-1 kontrol grubu önemli anlamlığa sahiptir (**** $p > 0.0001$). Aynı zamanda kontrol ve M1-1 kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında karmustin, 3.8 mM PCA, M1-1+3.8 mM PCA, 5 mM PCA ve M1-1+ 5 mM PCA gruplarında sırasıyla anlamlı sonuçlar gözlemlenmiştir (**** $p > 0.0001$, #### $p < 0.0001$; **** $p > 0.0001$,

$p<0.001$; **** $p>0.0001$, #### $p<0.0001$; **** $p>0.0001$, #### $p<0.0001$; **** $p>0.0001$, #### $p<0.0001$).

Tablo 3.3. C6 hücrelerinin floresan ölçümlerden elde edilen % canlılık değerler (Kontrolün canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir)

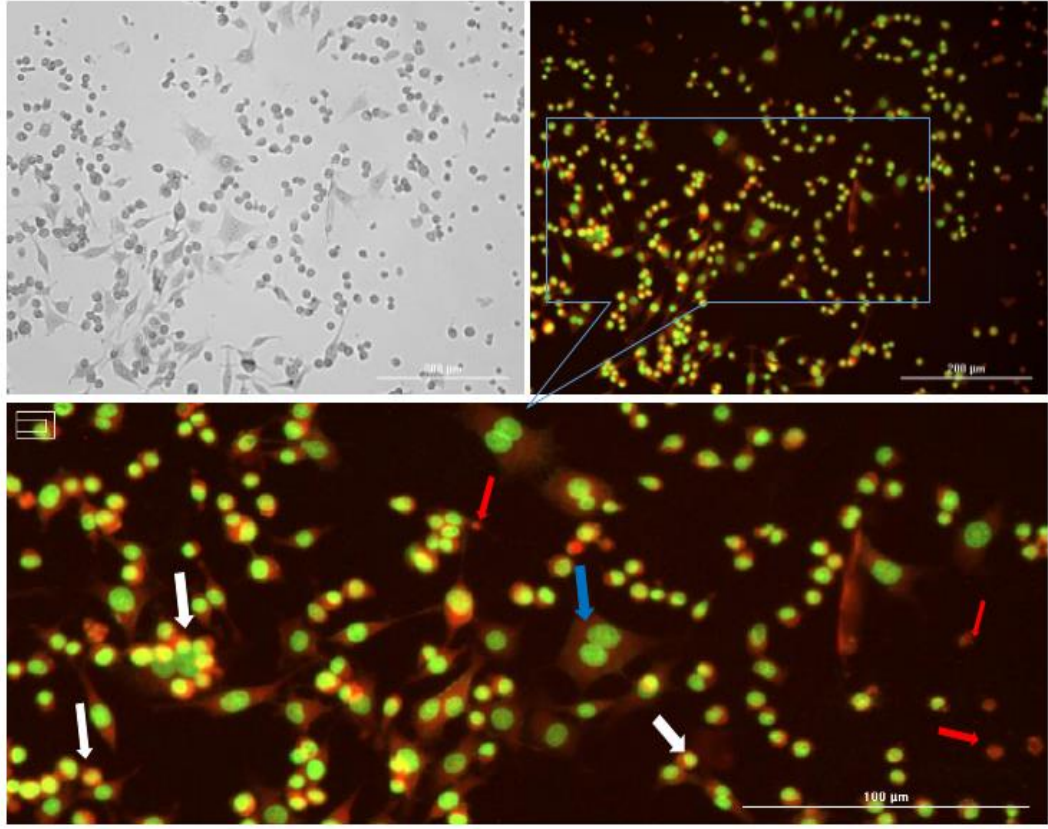
Konsantrasyonlar (mM)	24. saat Madde konsantrasyonlarının % canlılıkları
M1 Kontrol	63,57928
3.8	55,63579
M1+3.8	42,2606
5	52,40188
M1+ 5	37,58242
300 µM Karmustin	29,38776

C6 hücrelerinden floresan ölçümler alındıktan sonra yine Cytation 3 Multi-Mode Reader cihazında deney gruplarının olduğu kuyucukların farklı alanlarından hem floresan hem de ışık mikroskopik görüntüler alınmıştır. AO/PI boyama yöntemi ile C6 hücrelerinin normal besiyeri uygulanmış kontrol grubunda yeşil floresan renkle görülen sağlıklı çekirdeklere sahip olduğu ve çekirdeklerin etrafında kırmızı renklerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.18).



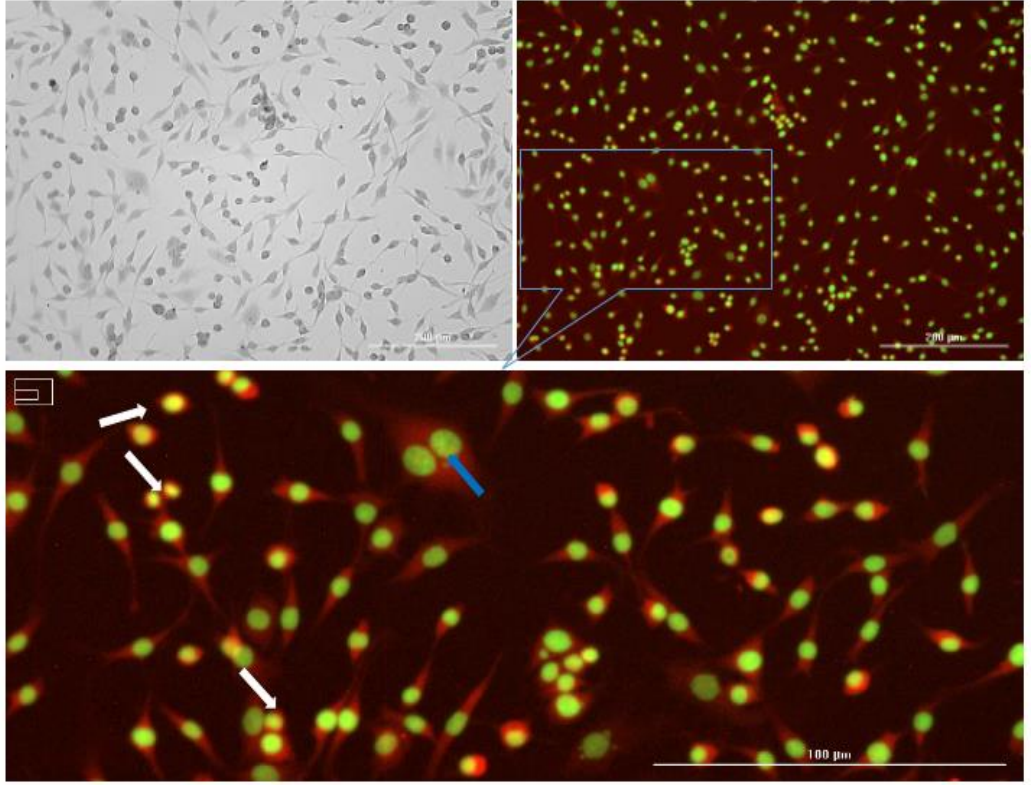
Şekil 3.18. C6 hücrelerinde kontrol grubunun AO/PI boyama sonucu mikroskopik görüntüleri (10X).

Şekil 3.19’ da gösterildiği gibi 300 μ M Karmustin muamelesi sonucu turuncu renkli hücre fazlalığı gözlemlenmiş ve geç apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda az miktarda kırmızı renkli nekrotik hücreler ve hücre çekirdeklerinde bölünmeler (karyoreksis) de gözlemlenmiştir.



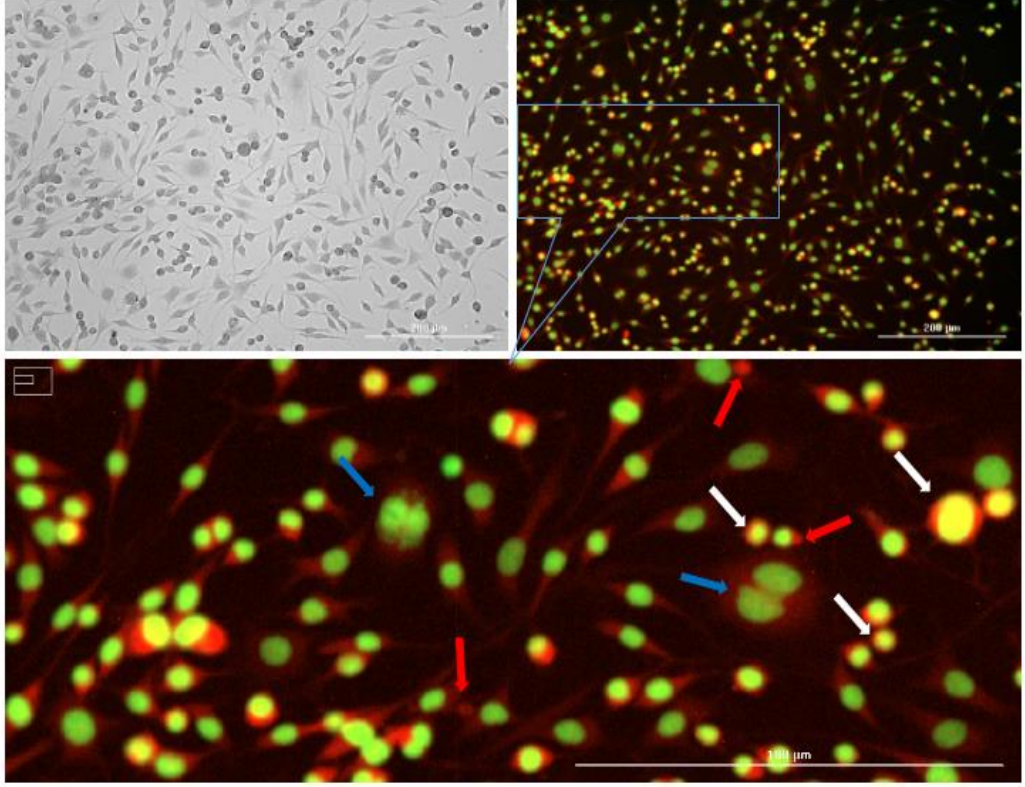
Şekil 3.19. 300 µM Karmustinle muamele edilmiş C6 hücrelerinin AO/PI boyama sonucu apoptozun mikroskopik tespiti (10X): Apoptoz (beyaz ok), Nekrozis (kırmızı ok), Karyoreksis (mavi ok).

PCA' nın 3.8 mM konsantrasyonu ile muamele sonucunda C6 hücrelerinde membran kabarcıklaşması ve kromatin yoğunlaşması tespit edilmiştir (Şekil 3.20). Apoptotik ve nekrotik etkilerin indüklendiği gözlemlenmiştir.



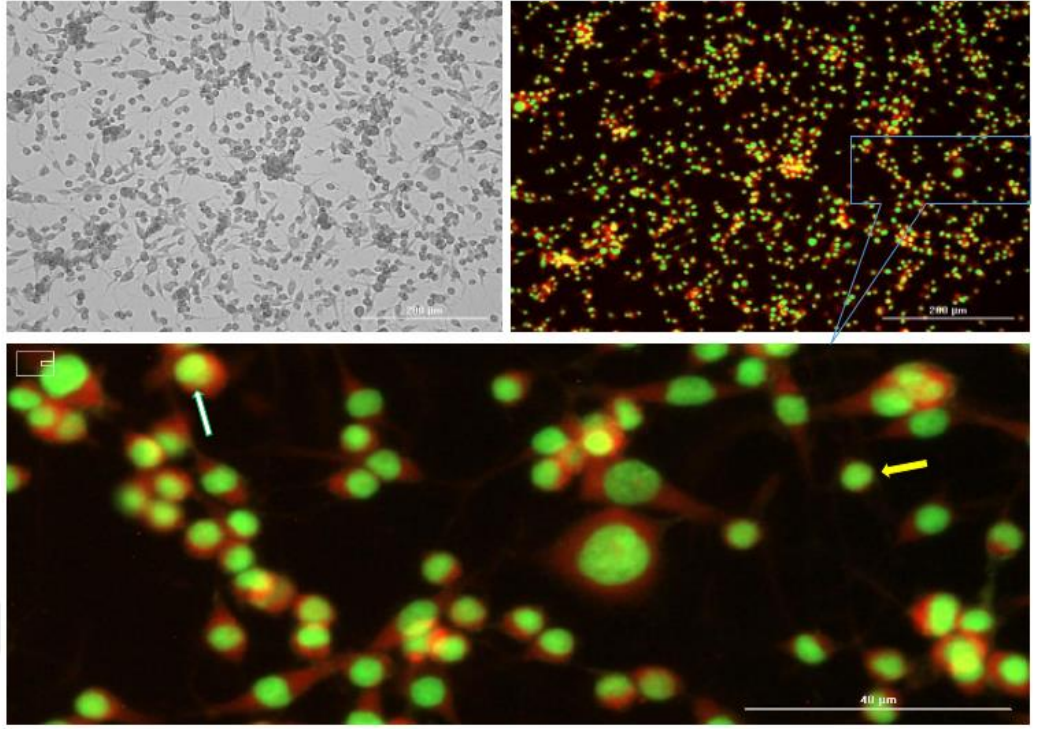
Şekil 3.20. 3.8 mM PCA ile muamele edilmiş C6 hücrelerinde apoptozun mikroskopik tespiti (10X): Apoptoz (beyaz ok), Karyoreksis (mavi ok).

PCA' nın 5 mM yüksek konsantrasyonu ile muamele edilmiş C6 hücrelerinin çekirdeklerinde parçalanma, kırmızı renkli nekrotik hücreler ve turuncu renkli hücrelerin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.21.).



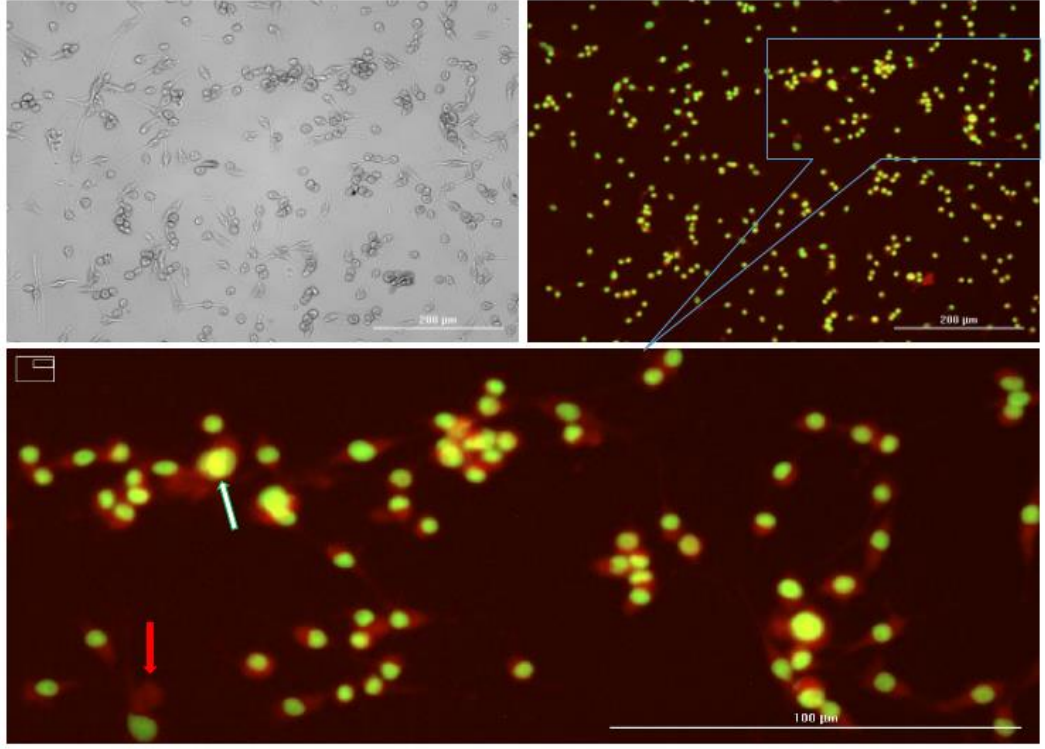
Şekil 3.21. 5 mM PCA ile muamele edilmiş C6 hücrelerinde apoptozun mikroskopik tespiti (10X).Apoptoz (beyaz ok), Nekrozis (kırmızı ok) Karyoreksis (mavi ok).

C6 hücrelerine sadece sitokin ortamı ile muamele edilmiş M1-1 kontrol grubunda yeşil renkli sağlıklı hücrelerle beraber aynı zamanda kırmızıya boyanmış apoptotik hücreler gözlemlenmiştir (Şekil 3.22).



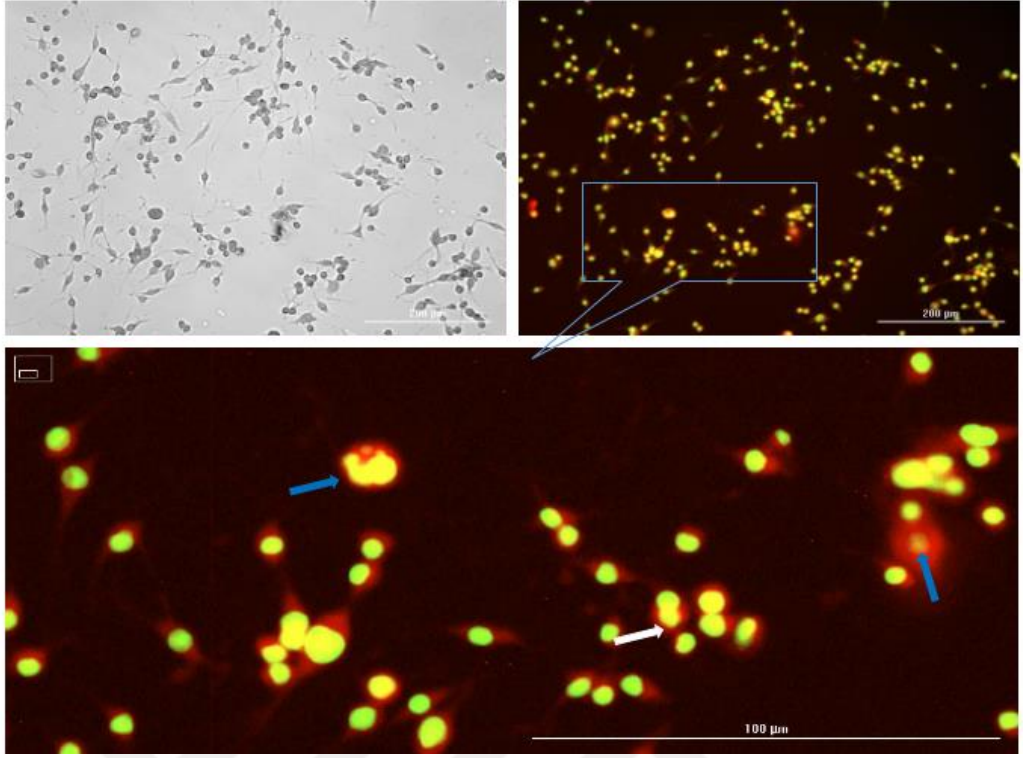
Şekil 3.22. C6 hücrelerinde M1 kontrol grubunun AO/PI çift boyama sonucu apoptozun mikroskopik tespiti (10X): Apoptoz (beyaz ok), Sağlıklı hücre (sarı ok).

M1-1 sitokin ortamı ile beraber 3.8 mM PCA konsantrasyonu ile muamele edilmiş hücrelerde hem sitokin, hem de PCA kaynaklı apoptotik etkiler hücre çekirdeklerinin çoğunlukla turuncu renkli ve kısmen kırmızı renkli nekrotik hücre oluşumuna neden olmuştur. Tek başına 3.8 mM PCA etkisine oranla hücreler daha fazla apoptoza uğramış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.23).



Şekil 3.23. C6 hücrelerine M1 + 3.8 mM PCA muamelesi sonucu apoptozun mikroskopik tespiti (10X): Apoptoz (beyaz ok), Nekrozis (kırmızı ok).

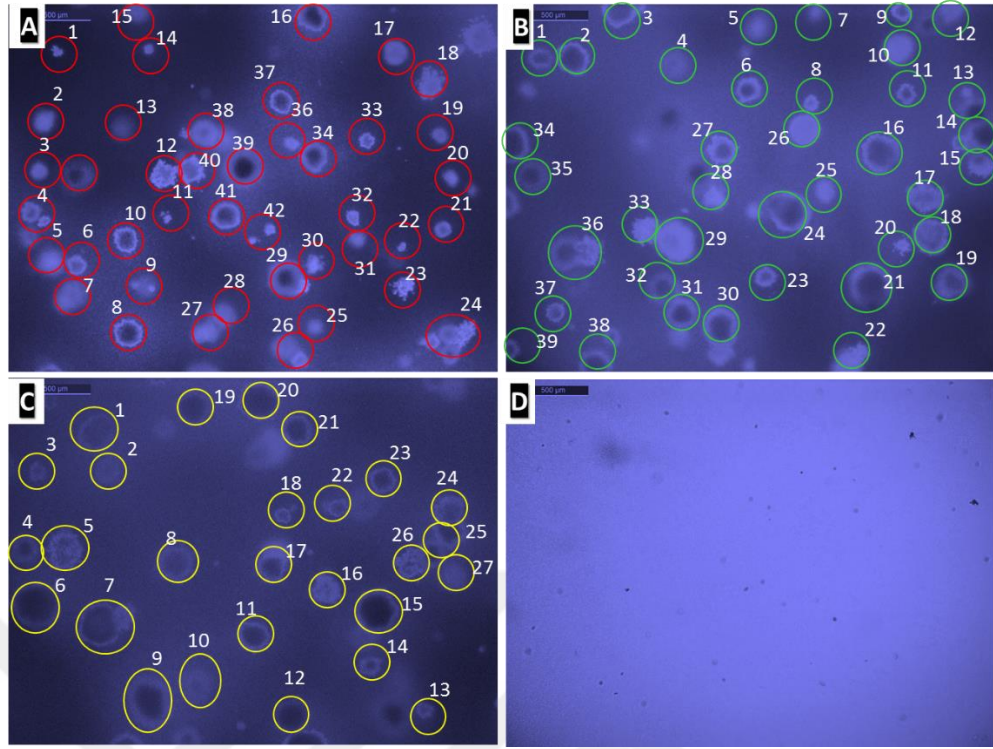
M1 sitokin ortamı ile beraber 5 mM PCA' nın yüksek konsantrasyonu ile muamele edilmiş hücrelerde apoptotik etkinin artmış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. C6 hücrelerine M1+5 mM PCA muamelesi sonucu apoptozun mikroskopik tespiti (10X): Apoptoz (beyaz ok), Karyoreksis(mavi ok).

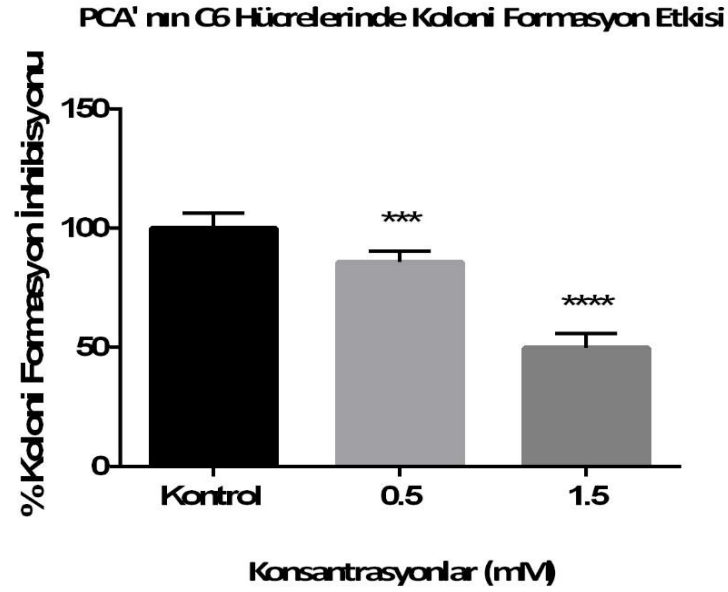
3.8. PCA' nın C6 Glioma Hücrelerinde Koloni Formasyonu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Tez çalışmamızda, C6 glioma hücrelerinin koloni oluşturmak yeteneğini değerlendirmek için koloni formasyon analizi yapılmıştır. Bu yöntemde hücreler yüksek çözünürlüklü agaroz içerisinde 6 kuyucuklu plakalara 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Daha sonra hücrelere PCA konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 14 günlük bekleme sonunda koloni oluşumları kristal viyole boyası ile boyanarak inverted mikroskop altında Leica LAS Görüntü Analizi programı ile fotoğraflanmıştır ve oluşmuş koloniler sayılarak deney grupları arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir (Şekil 3.25.). Her gruptan en az 6 fotoğraf alınmıştır. Veriler, GraphPad Prism 6.0 kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 3.25. PCA' nın C6 hücrelerinde 14. günde koloni oluşumu üzerindeki etkileri (10X): A- Kontrol; B-0,5 mM PCA; C-1,5 mM PCA; D- 3.8 mM PCA.

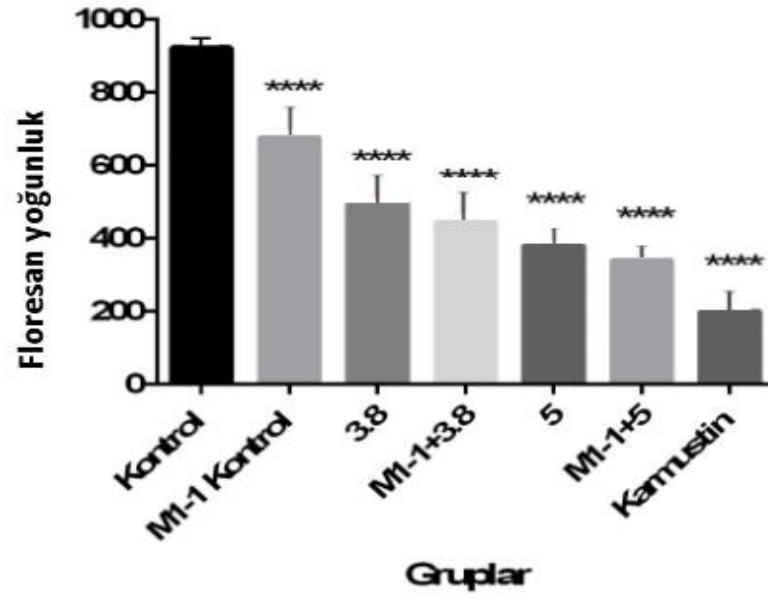
Şekil 3.25' de gösterildiği gibi kontrol grubuna göre PCA' nın 0,5 mM konsantrasyonunda koloni oluşumunda kısmen azalma gözlemlenmiştir. 1.5 mM PCA grubunda ise koloni oluşumunda önemli derecede azalmalar gözlemlenmiştir. 3.8 mM PCA grubunda ise koloni oluşumu gözlemlenmemiş olup canlı hücre sayısının da çok azaldığı görülmüştür. Her grupta oluşan kolonilerin toplamı sayılmış ve elde edilen sonuçlar Microsoft Office Excel programında % canlılık olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. GraphPad Prism 6.0 kullanılarak çizilen grafik ve analiz sonuçları Şekil 3.26' da verilmiştir. C6 hücrelerinde PCA ile 14 günlük inkübasyon sonunda koloni oluşumunu azaltıcı etkisi, kontrol grubuna göre, 0.5 mM PCA grubunda **** $p < 0,0001$; 1.5 mM PCA grubunda da *** $p < 0,001$ olarak istatistiksel anlamlılık bulunmuştur.



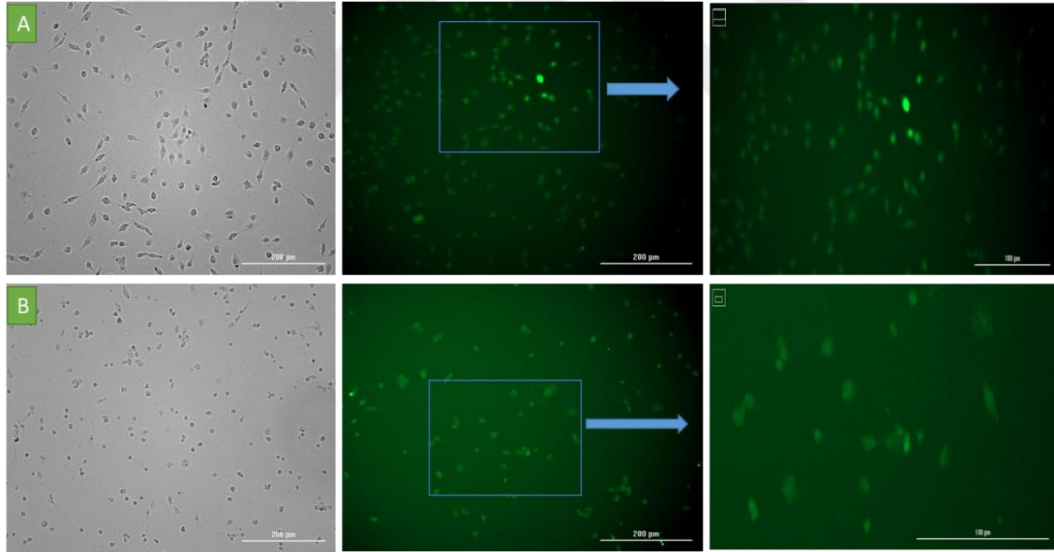
Şekil 3.26. PCA' nın C6 hücreleri üzerinde % koloni formasyon değerleri ve istatistiksel analizi: (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, $n=6$).

3.9. Çoğalan Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) İle İmmünofloresan İncelemenin Değerlendirilmesi

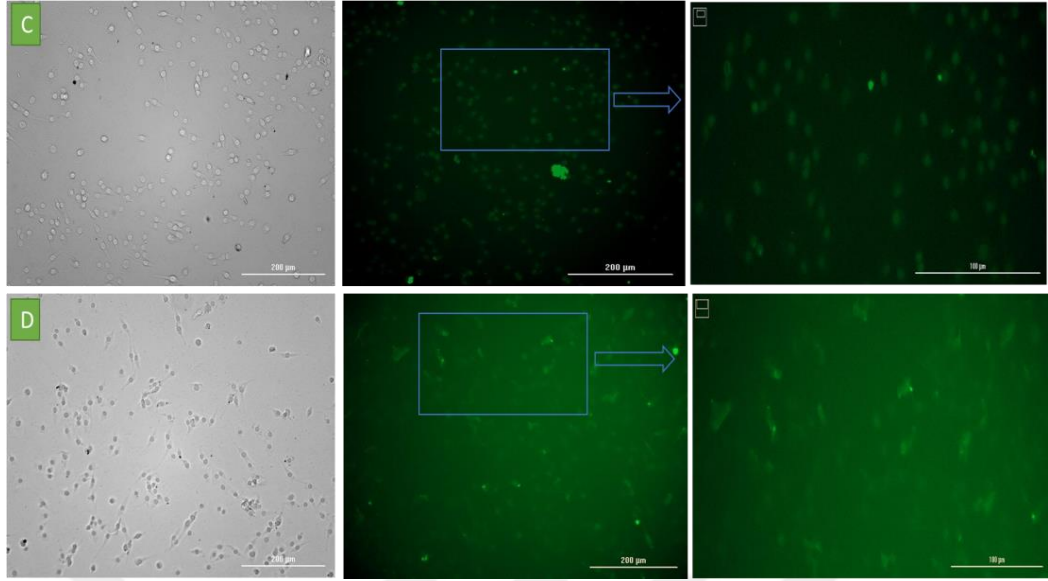
Protokatesuik asitin C6 hücre proliferasyonu üzerine etkileri anti-PCNA primer antibadi (PC10, Mouse mAb Cell Signalling Technology, 2586) kullanılarak her gruptan en az 25 fotoğraf üzerinden incelenmiştir. Şekil 3.27' de görüldüğü gibi deney grupları arasında PCNA işaretli hücrelerin floresan yoğunluk oranlarına ait değerler istatistiksel olarak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kontrol grubuna oranla hem PCA' nın hem tek başına C6 hücrelerine uygulandığı gruplarda, hem de M1-1 sitokin ortamı uygulanan grupların artan konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunun anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir.



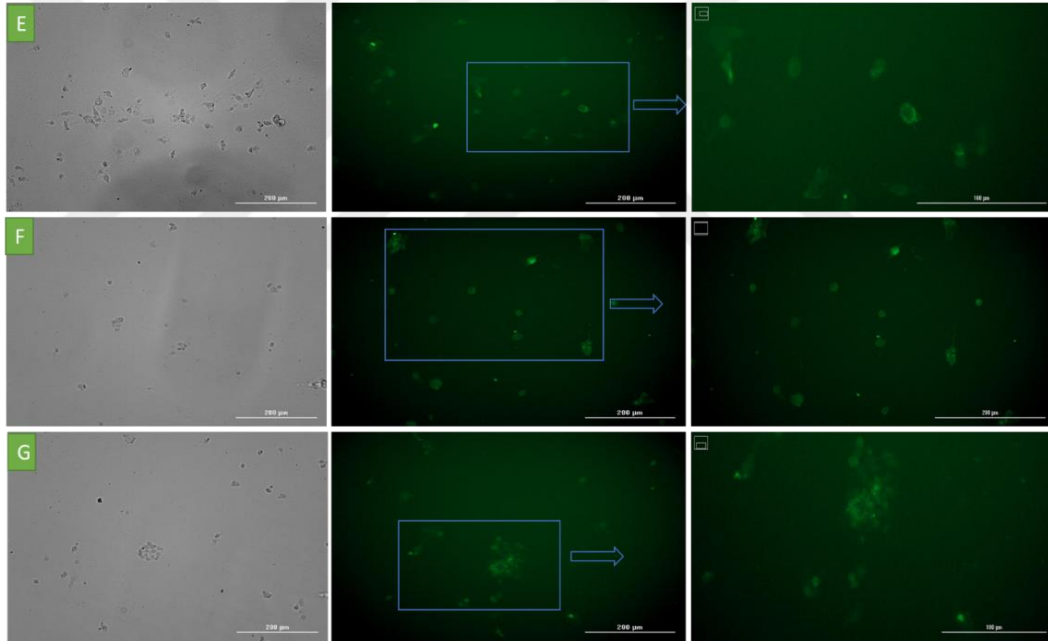
Şekil 3.27. PCA' nın C6 hücre proliferasyonu üzerine PCNA ekspresyonunun istatistiksel olarak değerlendirilmesi grafiği: ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$, $p < 0.0001^{****}$, Ort $\pm$ Standart Sapma, n=25).



Şekil 3.28. C6 (A) Kontrol ve (B) pozitif kontrol (Karmustin) gruplarının PCNA ekspresyonu görüntüleri (10X)



Şekil 3.29. (C) 3.8 mM PCA, (D) 5 mM PCA gruplarında PCNA ekspresyonu görüntüleri (10X)

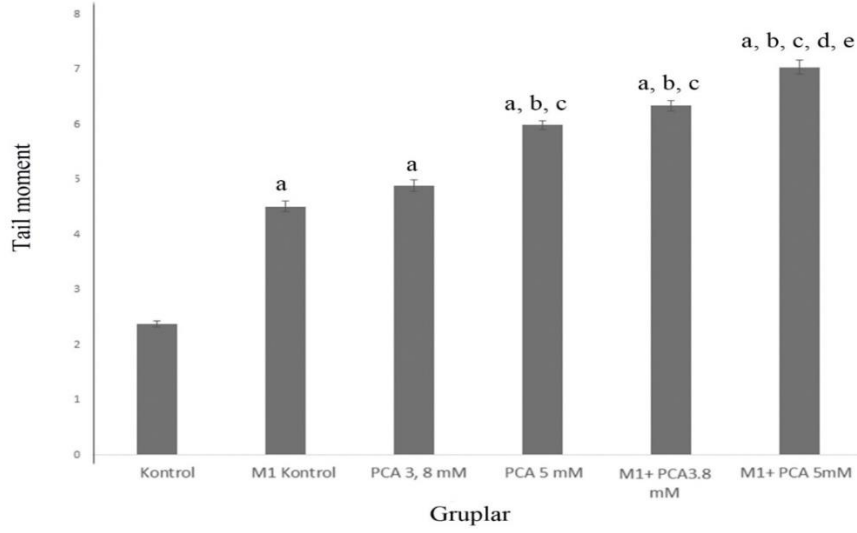


Şekil 3.30. (E) M1-1 kontrol, (F) M1-1 + 3.8 mM PCA, (G) M1-1 + 5 mM PCA gruplarında PCNA ekspresyon görüntüleri (10X)

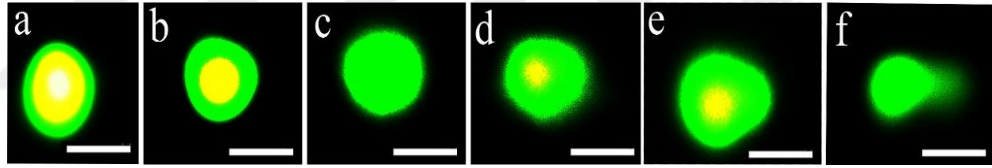
3.10. Tek Hücre Jel Elektrophorezi (SCGE) Bulguları

SCGE bulgularına göre, DNA hasarı kontrol grubuna göre M1 kontrol ve PCA uygulanan gruplarda istatistiksel açıdan anlamlıdır ve dikkate değer seviyede artış göztermiştir. **Şekil 3.31'** de gösterildiği gibi PCA' nın 3.8 ve 5 mM konsantrasyonları DNA hasarını önemli ölçüde arttırmış, M1-1 kontrol grubu ise PCA gruplarına oranla DNA hasarına daha az neden olmuş ve aynı zamanda M1-1'in PCA ile beraber uygulandığı gruplarda C6 hücrelerine tek başına PCA uygulanan gruplara oranla DNA

hasarını daha fazla arttırdığı gözlemlenmiştir. SCGE analizi için Leica LAS Görüntü Analizi programı ile gruplardan alınan fotoğraflar şekil 3.32’da gösterilmiştir.



Şekil 3.31. SCGE analiz sonuç grafiği: a. Kontrol grubuna göre, b. M1 Kontrol grubuna göre, c. PCA 3.8 mM grubuna göre, d. PCA 5 mM e. M1+PCA 3.8 mM grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı ($P<0.05$) farklılıkları ifade etmektedir ($n=50$).



Şekil 3.32. SCGE analiziinin temsili Görüntü: a:Kontrol; b:M1-1 Kontrol; c:PCA 3.8;mM; d:PCA 5mM; e:M1-1+PCA 3.8mM; f: M1-1+PCA 5mM işaret bar:10um

Tablo 3.4. SCGE analiz sonuçları (Ortalama± Standart sapma)

Deney Grupları	Tail Moment
Kontrol	2,37 ± 0,057
M1-1 Kontrol	4,51 ± 0,093
PCA 3.8 mM	4,88 ± 0,101
PCA 5 mM	5,99 ± 0,078
M1-1 + PCA 3.8 mM	6,34 ± 0,100
M1 -1+ PCA 5 mM	7,03 ± 0,129

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser insan ölümüne neden olacak hastalıklar sırasında ön sıralarda yer almaktadır. Günümüzde kanser hastalarının sayısında her geçen gün artış olması ve kesin bir tedavisi olmamasına rağmen tıpta ve teknolojiye ilerlemeler ve yeni nesil tedavi yöntemleri umutvericidir. Glioblastoma multiforme, hızlı yayılma özelliğine sahip ve hastaların kısa bir sürede ölümü ile sonuçlanan primer bir beyin tümörüdür (Taylor vd.,2019). Hastalık tanısı konulduktan sonraki sağkalım süresi genellikle 1 yıldan azdır ve hastaların en fazla % 10' u 2 yıla kadar yaşamaktadır. Yıllar önce başlayan kanser tedavisinin bulunması yönünde araştırmalar günümüzde de devam etmektedir ve birçok farklı kanser türlerinin tedavisinde önemli adımların olmasına rağmen glioblastoma multiformenin tedavi süreci yıllardır değişmemekte ve cerrahi müdahale ile başlayarak ardından radyoterapi ve kemoterapi ile izlenmektedir (Yılmaz vd.,2012).

Kanser tedavisinde araştırılan önemli kaynaklardan biri de bitkisel kaynaklı ilaçlardır. Çalışmamızda kullanılan protokatesuik asit doğada bulunan ve günlük yediğimiz besinlerle vücumuza aldığımız bir bitkisel maddedir. Yapılan farklı çalışmalarda, PCA' nın antioksidan (Liu vd.,2008), anti-ateroskleroz, anti-inflamatuar (Wang vd.,2011) ve kemopreventif etkiler (Kawamori vd.,1994) gibi farklı biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalar, PCA' nın farklı kanser hücreleri üzerinde (karaciğer, mide, prostat, meme, lösemi) güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğunu açıklanmıştır (Tseng vd.,2000; Yip vd.,2006; Yin vd.,2009; Anter vd.,2011; Lin vd.,2011). Ayrıca, önceki çalışmalar protokatesuik asidin sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki göstermediğini göstermiş (Lin vd., 2007). Aynı zamanda, *in vitro* gen ekspresyonu ve *in vivo* metastaz modelleri, PCA' nın hücrelerin göçünü engellediğini ve matris bozulmasını azaltarak metastazı azalttığını göstermiştir (Lin vd.,2011). Bütün bu çalışmaların yanı sıra PCA' nın antidiyabetik, antiseptik, analjezik, antineoplastik, anti-apoptotik, anti-ülser, antispazmodik, antihiperlipidemik, antibakteriyel, anti-astmatik ve nöroprotektif aktivite gibi çeşitli farmakolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Luo vd., 2015; Khan vd., 2015; Dhanshree vd., 2017; De vd., 2018).

Yapılan bütün bu çalışmaları göz önünde bulundurarak, bu çalışmada PCA' nın C6 sıçan glioma hücreleri üzerinde anti-proliferatif, anti-apoptotik, hücre göçü ve

migrasyonu, koloni oluşumu ve DNA hasarı gibi etkileri konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hem normal kültür hem de inflamasyon ortamında incelenmiştir.

Çalışmamızda PCA' nın 0,625-10 mM aralıktaki konsantrasyonlarının C6 hücrelerinde hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisi WST-1 hücre canlılık testi ile araştırılmıştır. PCA' nın 24, 48 ve 72 saatteki IC₅₀ değerleri sırasıyla 1.7 mM, 2.8 mM ve 3.8 mM olarak belirlenmiştir. Emine İnan ve Pınar Öztopcu Vatan (2019) yaptıkları çalışmada MTT yöntemiyle C6 hücrelerinde PCA' nın IC₅₀ değerinin 24 saatte 2.79 mM, 48 saatte 1.84 mM olduğunu belirlemişler. Her iki çalışmada aynı hücre hattı kullanılmasına rağmen IC₅₀ değerlerindeki farklılıklar kullanılan yöntemler, hücre sayısı ve pasaj sayısına bağlı olabilmektedir.

Protokatesuik asitin farklı hücre hatlarında etkileri araştırılmıştır. Araştırmalar sonucunda farklı hücre hatlarında PCA' nın farklı konsantrasyonlarının etkili olduğu belirlenmiştir: İnsan lösemi hücre hattı (HL-60) üzerinde yapılan iki farklı çalışma protokatesuik asitin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin seçilen sitotoksiste yöntemlerinden dolayı farklı sonuçlanmasını doğrulamaktadır (Tseng vd.,2000; Anter vd.,2011). Tseng ve arkadaşları HL-60 hücreleri üzerinde protokatesuik asitin 24 saatte 0.5 mM, 48 saatte ise 0.2 mM konsantrasyonlarında hücre çoğalmasında azalmalar gözlemlenmiş ve WST-8 yöntemiyle 72 saatte IC₅₀ değerini 12.72 mM belirlenmiştir. Aynı zamanda Anter ve arkadaşları aynı saatte tripan mavisi yöntemi sonucu IC₅₀ değerini 4.54 mM olarak belirlemişler.

Guan ve arkadaşları (2006) PC12 hücre hattında MTT yöntemi ile PCA' nın 0.3 mM -1.2 mM aralıktaki konsantrasyonlarının 24 saatteki hücre canlılığına etkisini araştırmışlar. Bu konsantrasyon aralığındaki PCA PC12 hücrelerinin canlılığını biraz arttırdığı belirlenmiş ve hücre morfolojisinde herhangi bir değişikliğin olmadığı gözlemlenmiştir (Guan vd.,2006).

İnsan gastrik karsinom (AGS) hücreleriyle yapılan 3 farklı çalışmada PCA' nın etkileri araştırılmıştır (Lin vd.,2007; Ho vd.,2010; Lin vd.,2011). Lin ve arkadaşları (2007) PCA' nın AGS mide kanseri hücreleri için 24 saatteki IC₅₀ değerini MTT yöntemiyle 7.3 mM, Ho ve arkadaşları (2010) aynı şekilde MTT yöntemiyle 48 saatteki IC₅₀ değerini 4 Mm belirlemişler. Lin ve arkadaşları (2011) diğer çalışmada yine 0,1; 0,5; 1,0 ve 2,0 mM PCA konsantrasyonlarını 24 saat süreyle AGS hücrelerine

uygulanarak yapmışlardır. Hücre canlılığı tripan mavisi yöntemi kullanılarak incelenmiş ve 2 mM PCA konsantrasyonunun AGS hücre canlılığını kontrole oranla %70 azalttığı belirlenmiştir (Lin vd.,2011).

Bu sonuçlar AGS hücrelerinin C6 hücrelerine oranla PCA' ya karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda WST-1 sitotoksosite tarama sonucu elde edilen etkili konsantrasyonlar belirlendikten sonra xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sisteminde PCA' nın C6 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri 72. saate kadar gözlemlenmiş ve 72. saatteki IC_{50} değerinin 3.8 mM olduğu belirlenmiştir. PCA' nın C6 hücre hattında RTCA DP' de yapılmış başka bir analizi bulunmamaktadır. Ancak A549 ve H1299 hücreleri ile yapılan çalışmada PCA' nın 10 μ M konsantrasyonda hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri RTCA DP' de araştırılmış ve her iki hücre hattında hücre çoğalmasını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Yang vd.,2021).

Bu çalışmada THP-1 insan monosit hücrelerinin M0 makrofaja farklılaşması için 100 ng/mL PMA konsantrasyonu (24 saat inkübasyonla ve 48 saatlik dinlenme süresiyle) ve M0 makrofajın M1 polarize makrofaja farklılaşması için de 20 ng/mL IFN- γ ve 1 μ g/mL LPS konsantrasyonları (24 saat inkübasyon ve 48 saatlik dinlenme süresiyle) kullanılmıştır.

Yapılan bazı çalışmalarda THP-1 hücreleri için PMA konsantrasyonları 10 ng/mL her 3 günde bir taze ortam eklenmek şartıyla 6 gün inkübasyonla (Aldo vd., 2013), 10 ng/ mL 48 saat inkübasyonla (DeCoursey vd., 1996), 20 ng/mL 24 saat inkübasyonla (Sieve vd., 2018), 30 ng/mL 24 saat inkübasyonla (Bongiovanni vd., 2015), 100 ng/mL 48 saat inkübasyonla (Maeß vd., 2014), 100 ng/mL 24 saat inkübasyonla (Engür, 2020) ve 500 ng/mL 96 saat inkübasyonla (Sueki vd., 2014) olduğu belirlenmiştir. Daha önceden yaptığımız laboratuvar çalışma sonuçlarımıza göre bu tez çalışmasında kullanmış olduğumuz PMA konsantrasyonu, bu çalışmalarda kullanılan konsantrasyon arasındadır.

M0 makrofajın M1 polarize alt türe farklılaşması için kullanılan IFN- γ ve LPS konsantrasyonları yapılan bazı çalışmalarla belirlenmiştir. M0 makrofaja 20 ng/mL IFN- γ ve 20 ng/mL LPS 24 saat inkübasyon süresiyle (Engür, 2020), 25 ng/mL IFN- γ ve 150 ng/mL LPS ile 24 saat inkübasyon süresiyle (Yeung vd., 2015), 20 ng ml IFN- γ

ve 10 pg/ml LPS 24 saat inkübasyon süresiyle (Genin vd., 2015) ve 20 ng/ml IFN- γ + 1 mg/ml LPS ile 24 saatlik inkübasyon süresiyle (Chanput vd., 2013) M1 makrofaja farklılaştığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda M1 makrofaja farklılaştırılmasından sonra elde edilen sitokin ortamında C6 hücrelerine PCA' nın C6 hücre canlılığı üzerine 24 ve 48. saatteki etkileri WST-1 sitotoksitesite yöntemiyle incelenmiştir. PCA' nın 0.5, 1.5, 3.8, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarının sırasıyla C6 hücrelerinde canlılığın azalttığı belirlenmiştir ($p>0.05$, **** $p<0.0001$). Literatürlerde buna benzer çalışma bulunmamaktadır.

IL-1 β kansere bağlı inflamatuvar bir sitokindir. TNF- α makrofajlar tarafından üretilen bir çok inflamatuvar hastalığın tedavisinde kullanılan bir sitokindir (Gürek vd., 2014).

Çalışmamızda M1 makrofajlara farklılaşmasını doğrulamak amacıyla TNF- α ve IL-1 β genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir. THP-1 kontrol grubuna oranla 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen M1 makrofajlarda (IL-1 β 43000, TNF- α 10200), 48 saatlik dinlenme sonrası elde edilen M1 polarize makrofajlarda (IL-1 β 10900000, TNF- α 492.5) anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalar TNF- α ve IL-1 β gen ekspresyon düzeylerinde elde ettiğimiz sonuçları doğrulamaktadır. Huang ve arkadaşları (2019) yaptıkları bir çalışmada M1 makrofajların TNF- α ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını belirlemişler (Huang vd.,2019). Yapılan bir başka çalışmada ise M1 makrofajlarının TNF- α ve IL-1 β ekspresyonlarının önemli kaynağı olduğu belirlenmiştir (Moganti vd., 2017).

Holen ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmada endotelial hücre oluşumu (anjiogenez) ile sitokin üretimi arasında tesir orantı olduğu ve bu nedenle IL-1 β ile TNF- α üretiminin engellenmesi yoluyla yeni kan damarlarının oluşumu da engellenmiş ve sonuç olarak beslenemeyen ve oksijensiz kalan tümörün ölümü gerçekleştirilmiştir (Holen vd., 2016).

Çalışmamızda C6 hücrelerinin göç etme yeteneği üzerindeki protokateşuik asitin konsantrasyonlarının etkileri çizik (scratch) testi ve xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sisteminde migrasyon analizi ile araştırılmıştır. Çizik testinde PCA' nın 0.5, 1.5

ve 3.8 ve 5 mM konsantrasyonları, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sisteminde ise 3.8 ve 5 mM konsantrasyonları ile C6 glioma hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonuçları incelenmiştir. Sonuç olarak yara iyileştirici analizde protokateşuik asitin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak çizik bölgesinin kapanmasını, yani hücre migrasyonunu önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir ($p<0,001$). xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi sisteminde ise kontrol grubuna oranla protokateşuik asit konsantrasyonlarının hücre migrasyonu engellediği ve M1 inflamasyon ortamında protokateşuik asitin migrasyonu azaltıcı etkisini düşük PCA konsantrasyonunda daha fazla olacak şekilde baskıladığı belirlenmiştir ($p<0.0001$).

Benzer şekilde Yang ve arkadaşları (2021) protokateşuik asitin A549 ve H1299 hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkisini Boyden odası analizi kullanarak araştırmışlar. Protokateşuik asitin 10 μ M konsantrasyonu kullanılmış ve bu konsantrasyonun her iki hücre hattının migrasyonunu ortadan kaldırdığı belirlenmiştir (Yang vd., 2021).

Başka bir çalışma Liu ve arkadaşları (2019) tarafından insan bronşiyal ASM hücre hattında TGF- β 1 kaynaklı artan migrasyonuna protokateşuik asitin etkileri hücre göçü transwell® kültür kapları kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak 24 saat boyunca TGF- β 1 maruz kalan ASM hücrelerinde, kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artan hücre göçü ve bununla birlikte, PCA ön tedavisi, TGF- β 1 grubu ile karşılaştırıldığında, TGF- β 1 ile indüklenen ASM hücre göçünü büyük ölçüde bastırdığı belirlenmiştir (Liu vd., 2019).

Kang ve arkadaşları (2013) insan beyni mikrovasküler endotel hücre hattını (HBMEC) farklı konsantrasyonlarda protokateşuik asit ile (0.3, 1, 3, 9 ve 27 mM) 24 saat inkübe ederek artan proliferasyonla birlikte, protokateşuik asitin ayrıca bir çizik yara iyileşme testi ile endotel hücre göçünü de arttırdığını belirlemişler (Kang vd., 2013).

Koloni formasyonu analizi ile çalışmamızda protokateşuik asitin C6 hücrelerinin kooni oluşumuna etkileri incelenmiştir ve 0.5, 1.5 ve 3.8 mM konsantrasyonları kullanılmıştır. Sonuç olarak protokteşuik asitin artan konsantrasyonlarında kontrol grubuna oranla oluşan kolonilerin sayında azalmalar gözlemlenmiş ve hatta 3.8 mM konsantrasyonunda tamamen koloni oluşumu engellendiği belirlenmiştir.

Protokatesuik asitin koloni formasyonu üzerinde etkilerini OVCAR-3, SKOV-3 ve A2780 insan yumurtalık kanseri hücre hatlarıyla yapılan çalışmada incelenmiştir. PCA' nın 5 µM konsantrasyonunda üç yumurtalık kanseri hücresinde 10 µM'da daha düşük sayıda koloni oluşumu olduğunu ve bunun da PCA aracılı antiproliferasyon etkinin nedeni olduğunu belirlenmiştir (Xie vd., 2018). TGF-β1 maruz kalan ASM hücrelerinde, protokatesuik asitin TGF-β1 ile indüklenen koloni oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Lui vd., 2019).

Programlanmış hücre ölümünün veya apoptozun inaktivasyonu, kanser gelişiminin merkezinde yer alır. Apoptotik tepkilerin bu şekilde devre dışı bırakılması, hem tedavi direncine hem de birçok tümörde apoptozun yaygın tedavi rejimlerine yanıt olarak kanser hücrelerinin ölümü için ana mekanizma olmadığı gözlemine önemli bir katkıda bulunabilir. Bu nedenle kanser tedavisi için araştırılan ilaçların en önemli özelliği apoptotik hücre ölümüne neden olabilmesidir. Apoptoz farklı hasarlar sonucunda hücrelerin küçülmesine ve zamanla programlanmış hücre ölümüne neden olur ve etraftaki sağlıklı hücrelerin kötü etkilenmesini engeller. Kanserli hücreler apoptotik etkilerden kaçınma gibi özelliğe sahiptirler. Bu nedenle kanser tedavisi için kullanılması düşünülen ilaçların hücre proliferasyonuna etkileri belirlenmeli ve bunun ardından hangi hücre ölüm tipini aktive ettiği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızda protokatesuik asitin C6 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri akridin oranj/propüdyum iyodür (AO/PI) çift boyama yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak kontrol grubuna oranla PCA' nın artan konsantrasyonlarında apoptotik etkinin arttığı ve aynı zamanda inflamasyon ortamının da PCA' nın apoptotik etkilerini önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir ($p < 0,001$). Ancak nekrotik etkide anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir.

Benzer şekilde İnan ve Vatan (2019) yaptıkları çalışmada hücre ölümü belirleme kiti kullanarak C6 hücreleri üzerinde protokatesuik asitin apoptotik ve/veya nekrotik etkilerini belirlemek için 2; 2,5 ve 3 mM konsantrasyonlarını 24 saat süre ile ve 1,5, 2 ve 2,5 mM konsantrasyonlarını 48 saat süre ile uygulanmıştır. Zamana ve konsantrasyona bağlı olarak protokatesuik asitin artan konsantrasyonlarında apoptotik etkinin arttığı ve nekrotik etkide anlamlılık gözlemlenmemiştir (İnan ve Vatan, 2019). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla bu çalışmadaki sonuçlar paralellik göstermektedir.

HL-60 hücre hattı protokateşuik asitin 1.62–25.95 mM aralıktaki konsantrasyonlarına 5 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra protokateşuik asidin yüksek konsantrasyonlarının tedavi edilen HL-60 hücreleri için DNA'nın internükleozomal parçalanmasına neden olduğu belirlenmiştir ki bu da apoptozun spesifik özelliğidir (Anter vd., 2011).

Protokateşuik asitin 1, 2, 4 ve μ 8 mol/L çok düşük konsantrasyonları ile 48 saat boyunca insan meme (MCF7), akciğer (A549), servikal (HeLa), karaciğer (HepG2) ve prostat (LNCaP) kanserli hücrelerine muamele edilmiş ve bütün hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak apoptotik etkide artış gözlemlenmiştir (Yin vd., 2009).

Çalışmamızda protokateşuik asitin C6 hücre proliferasyonu üzerine etkileri bir proliferasyon belirteci olan çoğalan hücre çekirdek antijeni olan PCNA kullanılarak incelenmiştir. Protokateşuik asitin 3.8 ve 5 mM konsantrasyonları kullanılmıştır. Sonuç olarak, kontrol grubuna oranla hem PCA' nın normal medyumda C6 hücrelerine uygulandığı gruplarda, hem de M1-1 makrofaj sitokin ortamı uygulanan grupların artan PCA konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunun anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür. Protokateşuik asitin *in vitro* hücre kültüründe PCNA ekspresyonu üzerine yapılan bir çalışmada 1, 1.5 ve 2 mM PCA konsantrasyonlarının RSC96 sıçan nöronal Schwann hücrelerinde çoğalan hücre nükleer antijeninin (PCNA) ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir (Ju vd., 2015).

Kou ve arkadaşlarının (2006) kafeik asit fenetil esterinin *in vitro* ve *in vivo* olarak C6 glioma hücrelerinin büyümesi üzerindeki inhibitör etkisinin incelendiği çalışmada hücre proliferasyonunu belirteci olarak PCNA immünohistokimyası incelenmiştir. Sonuç olarak C6 hücrelerinde, kontrol grubuna göre PCNA pozitif hücrelerin sayısının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Kou vd.,2006).

Hirose ve arkadaşları (1995), yaptıkları *in vivo* çalışmada Fischer-344 sıçanlarında karaciğer dokusunda PCA' nın PCNA ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını belirlemişlerdir. (Hirose vd., 1995).

Çalışmamızda protokateşuik asitin C6 hücrelerinde DNA fragmentasyonuna etkileri SCGE analizi yapılarak incelenmiş ve 3.8 ve 5 mM PCA konsantrasyonlarının DNA hasarını kontrol grubuna oranla önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Aynı

zamanda M1-1 makrofaj sitokin içeren kontrol grubunda da, normal besiyeri olan kontrol grubuna göre PCA grubundan çok az farkla DNA hasarını arttırmıştır.

Protokateşuik asitin kanser hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarı üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır. Anter ve arkadaşlarının (2011) HL-60 hücreleri üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, artan konsantrasyona bağlı olarak DNA'nın fragmente olduğu bildirilmiştir (Anter, et al., 2011). Resveretrolun C6 hücrelerinde etkisini inceleyen bir başka çalışmada, tek başına konsantrasyona ve zamana bağlı hafif DNA hasarını indüklediği belirlenmiştir (Quincozes-Santos vd., 2007).

Protokateşuik asitin çeşitli kanser hücreleri üzerinde hücre çoğalmasını baskılayıcı etkilerinin araştırılması yönünde çalışmalar olmasına rağmen, C6 sıçan glioma hücreleri ile yapılmış tek bir çalışma vardır (İnan ve Vatan, 2019). Bu tez çalışması yapılmış ikinci çalışma olmaktadır. Çalışmanın sonuçlarına göre protokateşuik asit C6 hücrelerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre çoğalmasını baskılamış ve apoptotik hücre ölümünü aktive etmiştir. Aynı zamanda konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücrelerin migrasyonunu, koloni formasyonunu, immünolojik olarak ölçümlerle hücre proliferasyonunu engellediği ve DNA hasarını arttırdığı ilk defa tespit edilmiştir. Aynı zamanda THP-1 insan monosit hücrelerinden M0 ve daha sonra M0 makrofajdan farklılaştırılan M1 makrofajlardan salgılanan sitokin ortamı ile C6 hücreleri üzerine protokateşuik asitin etkilerinin incelenmesi de ilk defa uygulanmıştır. Sonuç olarak M1 makrofaj sitokin ortamı ile C6 hücrelerinde ve tek başına C6 hücrelerinde, normal kültür ortamında PCA uygulanan C6 hücrelerine göre, konsantrasyon ve zaman artışına paralel olarak hücre çoğalmasının azaldığı, immünolojik işaretlemede de proliferasyonun azaldığı, apoptozun ve DNA hasarının indüklediği belirlenmiştir. Hücre migrasyonunda ise inflamasyon ortamında PCA'nın hücre migrasyonunu arttırdığı, ancak normal kültür ortamında PCA konsantrasyon artışına paralel olarak C6 glioma hücrelerinin migrasyonunda anlamlı seviyede azalttığı gözlemlenmiştir. Bütün bunların yanı sıra protokateşuik asitin C6 hücrelerine etki mekanizmalarının hangi yönlerde olduğu ile ilişkili ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda yapılan araştırmaların birçoğunun ilk olmasıyla birlikte, elde edilen bulgular PCA'nın kanser hücreleri üzerindeki farklı etkilerinin ortaya koyulması açısından bilimsel veri oluşturmuştur. Bu verilerin ilerleyen zamanlarda farklı kanser

türleri ile ilgili olarak yapılacak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



KAYNAKÇA

- Abike, F. ve Zengeroğlu, S. (2010). PCNA Expression in Epithelial Ovarian Carcinomas. Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology, 67(4), 173-178.
- Adilay, U. (2006). Glioblastoma multiforme ve benign meningiom olgularında tümör dokusunda ölçülen çinko, demir ve kadmiyum düzeylerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- Aggarwal, B. B., Sung, B. ve Gupta, S. C. (Eds.). (2014). Inflammation and cancer (Vol. 816). Springer.
- Aktaş, D. (2005). Genetik ve kanser, Thompson&Thompson Genetics in Medicine,(Nussbaum, RL, McInnes, RR, Willard, HF). Güneş Kitabevi.
- Aldo, P. B., Craveiro, V., Guller, S., Mor, G. (2013). Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line (Vol. 70, No. 1, pp. 80-86).
- Anter, J., Romero-Jiménez, M., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Analla, M., Alonso-Moraga, A., Muñoz-Serrano, A. (2011). Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. Journal of medicinal food, 14(3), 276-283.
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. Experientia, 47(1), 22-31.
- Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food chemistry, 99(1), 191-203.
- Baserga, R. (1991). Growth regulation of the PCNA gene. J Cell Sci. 98:433-4366.
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5 (3), 154-165.
- Bazzano, L. A., Serdula, M. K. ve Liu, S. (2003). Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. Current atherosclerosis reports, 5(6), 492-499.

- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161(3839), 370-371.
- Bernstein, J. J., Goldberg, W. J., Laws, E. R., Conger, D., Morreale, V., Wood, L. R. (1990). C6 glioma cell invasion and migration of rat brain after neural homografting: ultrastructure. *Neurosurgery*, 26(4), 622-628.
- Bird, C. ve Kirstein, S. (2009). Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system. *Nature methods*, 6(8), v-vi.
- Bishayee, A. ve Dhir, N. (2009). Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Chemico-biological interactions*, 179(2-3), 131-144.
- Boatright, K. M. ve Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*, 15(6), 725-731.
- Bongiovanni, B., Mata-Espinosa, D., D'Attilio, L., Leon-Contreras, J. C., Marquez-Velasco, R., Bottasso, O., Bay, M. L. (2015). Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 95(5), 562-569.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), 597-601.
- Büttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G., Madeo, F. (2006). Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *The Journal of cell biology*, 175(4), 521-525.
- Campbell, L. M., Maxwell, P. J. ve Waugh, D. J. (2013). Rationale and means to target pro-inflammatory interleukin-8 (CXCL8) signaling in cancer. *Pharmaceuticals*, 6(8), 929-959.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer research*, 47(4), 936-942.

- Celis, J. E. ve Madsen, P. (1986). Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS letters*, 209(2), 277-283.
- Chanput, W., Mes, J. J., Savelkoul, H. F., Wichers, H. J. (2013). Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food & Function*, 4(2), 266–276.
- Chen, D. S. ve Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10.
- Chou, Y. H., Khuon, S., Herrmann, H., Goldman, R. D. (2003). Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Molecular biology of the cell*, 14(4), 1468-1478.
- Collet, B., Guitton, N., Saïkali, S., Avril, T., Pineau, C., Hamlat, A., Quillien, V. (2011). Differential analysis of glioblastoma multiforme proteome by a 2D-DIGE approach. *Proteome Science*, 9(1), 1-14.
- Cornillon, S., Foa, C., Davoust, J., Buonavista, N., Gross, J. D., Golstein, P. (1994). Programmed cell death in *Dictyostelium*. *Journal of cell science*, 107(10), 2691-2704.
- Cornillon, S., Olie, R. A. ve Golstein, P. (1998). An insertional mutagenesis approach to *Dictyostelium* cell death. *Cell Death & Differentiation*, 5(5), 416-425.
- Coussens, L. M. ve Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867.
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Danial, N. N. ve Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.

- Das, A., Banik, N. L. ve Ray, S. K. (2008). N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide induced both differentiation and apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Brain research*, 1227, 207-215.
- De, B. S., Wasewar, K. L., Dhongde, V. R., Ingle, A. A., Mondal, H. (2018). Experimental and modeling of reactive separation of protocatechuic acid. *Chemical Engineering Research and Design*, 132, 593-605.
- DeAngelis, L. M. (2001). Brain tumors. *New England journal of medicine*, 344(2), 114-123.
- DeCoursey, T. E., Kim, S. Y., Silver, M. R., Quandt, F. N. (1996). III. Ion channel expression in PMA-differentiated human THP-1 macrophages. *The Journal of membrane biology*, 152(2), 141-157.
- Degterev, A., Boyce, M. ve Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53), 8543-8567.
- Dhanshree, S., Aman, U. ve Chandrashekar, U. (2017). Neuroprotective effects of protocatechuic acid in diabetes induced neuropathic pain. *Am. J. Biochem. Mol. Biol*, 7(3), 111-117.
- Doblas, S., He, T., Saunders, D., Pearson, J., Hoyle, J., Smith, N., Towner, R. A. (2010). Glioma morphology and tumor-induced vascular alterations revealed in seven rodent glioma models by *in vivo* magnetic resonance imaging and angiography. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 32(2), 267-275.
- Dong, H. ve Markovic, S. N. (Eds.). (2018). *The basics of cancer immunotherapy*. Springer.
- Eichler, A. F. ve Loeffler, J. S. (2007). Multidisciplinary management of brain metastases. *The oncologist*, 12(7), 884-898.
- Eisenberg, T., Büttner, S., Kroemer, G., Madeo, F. (2007). The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis*, 12(5), 1011-1023.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

- Engür, S. ve Dikmen, M. (2017). The evaluation of the anti-cancer activity of ixazomib on Caco2 colon solid tumor cells, comparison with bortezomib. *Acta Clinica Belgica*, 72(6), 391-398.
- Engür, S. (2020). THP-1 kökenli makrofaj ve A549 akciğer kanseri ko-kültür modelinde epitelyal-mekanizmal değişim yolağına immünterapötik yaklaşımlar. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Epelman, S., Lavine, K. J. ve Randolph, G. J. (2014). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41(1), 21-35.
- Fernandes, J. V., Cobucci, R. N. O., Jatobá, C. A. N., De Medeiros Fernandes, T. A. A., de Azevedo, J. W. V., De Araújo, J. M. G. (2015). The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathology & Oncology Research*, 21(3), 527-534.
- Filizel, F., Ertek, S., İlvan, Ş., Calay, Z., Oruç, N., Bakır, S. (1996). Meme Karsinomlarında Proliferating Cell Nuclear Antigen'in (PCNA) Prognostik Önemi. *Türk Patoloji Dergisi*, 12-1, 50-52.
- Fulda, S. ve Debatin, K. M. (2003). Death receptor signaling in cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 3(4), 253-262.
- Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., Kroemer, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*, 16(8), 1093-1107.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation*, 14(7), 1237.
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC cancer*, 15(1), 1-14.

- Gibbons Johnson, R. M. ve Dong, H. (2017). Functional expression of programmed death-ligand 1 (B7-H1) by immune cells and tumor cells. *Frontiers in immunology*, 8, 961.
- Gieryng, A., Pszczolkowska, D., Bocian, K., Dabrowski, M., Rajan, W. D., Kloss, M., Kaminska, B. (2017). Immune microenvironment of experimental rat C6 gliomas resembles human glioblastomas. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Green, D. R. ve Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684), 626-629.
- Gross, J. L., Morrison, R. S., Eidsvoog, K., Herblin, W. F., Kornblith, P. L., Dexter, D. L. (1990). Basic fibroblast growth factor: a potential autocrine regulator of human glioma cell growth. *Journal of neuroscience research*, 27(4), 689-696.
- Guan, S., Bao, Y. M., Jiang, B., An, L. J. (2006). Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death. *European journal of pharmacology*, 538(1-3), 73-79.
- Guicciardi, M. E. ve Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, 23(6), 1625-1637.
- Güllü, H.İ. ve Akalın, İ., (2005). Metastaz Biyolojisi. *Üroonkoloji Bülteni*, 4, 16-19.
- Gürek, S., Hocaoglu, Ş., Tomruk Sütbeyaz, S., Aykaç Çebiçci, A., (2014). Tümör Nekroz Faktör- α Tedavisi ve Bruselloz: Olgu Sunumu. *J. PMR Sci* 2015, 18, 44-48.
- Han, L., Yang, Q., Ma, W., Li, J., Qu, L., Wang, M. (2018). Protocatechuic acid ameliorated palmitic-acid-induced oxidative damage in endothelial cells through activating endogenous antioxidant enzymes via an adenosine-monophosphate-activated-protein-kinase-dependent pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(40), 10400-10409.
- Herholz, K., Langen, K. J., Schiepers, C., Mountz, J. M. (2012, November). Brain tumors. In *Seminars in nuclear medicine* (Vol. 42, No. 6, pp. 356-370). WB Saunders.

- Hirose, Y., Tanaka, T., Kawamori, T., Olnishi, M., Makita, H., Mori, H., Hara, A. (1995). Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis*, 16(10), 2337-2342.
- Ho, H. H., Chang, C. S., Ho, W. C., Liao, S. Y., Wu, C. H., Wang, C. J. (2010). Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF- κ B activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2508-2516.
- Holen, I., Lefley, D.V., Francis, S.E., Rennicks, S., Bradbury, S., Coleman, R.E., Ottewell, P., (2016). IL-1 Drives Breast Cancer Growth and Bone Metastasis In Vivo. *Ontotarget*, 7 (46), 75571-75584.
- Hsu, C. C., Hsu, C. L., Tsai, S. E., Fu, T. Y. C., Yen, G. C. (2009). Protective effect of *Millettia reticulata* Benth against CCl₄-induced hepatic damage and inflammatory action in rats. *Journal of medicinal food*, 12(4), 821-828.
- Hu, L., Li, H. L., Li, W. F., Chen, J. M., Yang, J. T., Gu, J. J., Xin, L. (2017). Clinical significance of expression of proliferating cell nuclear antigen and E-cadherin in gastric carcinoma. *World journal of gastroenterology*, 23(20), 3721.
- Huang, Y., Tian, C., Li, Q., Xu, Q. (2019). TET1 knockdown inhibits *Porphyromonas gingivalis* LPS/IFN- γ -induced M1 macrophage polarization through the NF- κ B pathway in THP-1 cells. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 2023.
- Izumoto, S., Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Taki, T., Hayakawa, T. (1996). Gene expression of neural cell adhesion molecule L1 in malignant gliomas and biological significance of L1 in glioma invasion. *Cancer Research*, 56(6), 1440-1444.
- İnan, E. ve Vatan, P. Ö. (2019). Determination of Proliferative and Apoptotic Effects of Protocatechuic Acid on Glioma Cells. *International Journal of Environmental Research and Technology*, 2(3), 44-50.
- Jones, C., Perryman, L. ve Hargrave, D. (2012). Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins?. *Nature reviews Clinical oncology*, 9(7), 400-413.

- Ju, D. T., Liao, H. E., Shibu, M. A., Ho, T. J., Padma, V. V., Tsai, F. J., Huang, C. Y. (2015). Nerve regeneration potential of protocatechuic acid in RSC96 Schwann cells by induction of cellular proliferation and migration through IGF-IR-PI3K-Akt signaling. *Chin J Physiol*, 58(6), 412-9.
- Kang, Z., Zhu, H., Jiang, W., Zhang, S. (2013). Protocatechuic Acid Induces Angiogenesis through P I3 K-A kt-e NOS-VEGF Signalling Pathway. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 113(4), 221-227.
- Kawamori, T., Tanaka, T., Kojima, T., Suzui, M., Ohnishi, M., Mori, H. (1994). Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Japanese journal of cancer research*, 85(7), 686-691.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., ve Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Khan, A. K., Rashid, R., Fatima, N., Mahmood, S., Mir, S., Khan, S., Murtaza, G. (2015). Pharmacological activities of protocatechuic acid. *Acta Pol. Pharm*, 72(4), 643-650.
- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., Cavenee, W. K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 61(3), 215-225.
- Krzysztoforska, K., Mirowska-Guzel, D. ve Widy-Tyszkiewicz, E. (2019). Pharmacological effects of protocatechuic acid and its therapeutic potential in neurodegenerative diseases: Review on the basis of *in vitro* and *in vivo* studies in rodents and humans. *Nutritional neuroscience*, 22(2), 72-82.
- Kuo, H. C., Kuo, W. H., Lee, Y. J., Lin, W. L., Chou, F. P., Tseng, T. H. (2006). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer letters*, 234(2), 199-208.
- Kuribayashi, K., Mayes, P. A. ve El-Deiry, W. S. (2006). What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria; *Cancer biology & therapy*, 5(7), 763-765.

- Lampson, L. A., Lampson, M. A. ve Dunne, A. D. (1993). Exploiting the lacZ reporter gene for quantitative analysis of disseminated tumor growth within the brain: use of the lacZ gene product as a tumor antigen, for evaluation of antigenic modulation, and to facilitate image analysis of tumor growth in situ. *Cancer research*, 53(1), 176-182.
- Lane, J. D., Yonekawa, T. ve Thorburn, A. (2013). Autophagy and cell death. *Essays in biochemistry*, 55, 105-117.
- Lawrence, T. ve Fong, C. (2010). The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF- κ B. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(4), 519-523.
- Lian, Z., Niwa, K., Gao, J., Tagami, K., Mori, H., Tamaya, T. (2003). Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line. *Cancer Detection and Prevention*, 27(2), 147-154.
- Lin, H. H., Chen, J. H., Chou, F. P., Wang, C. J. (2011). Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF- κ B pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. *British journal of pharmacology*, 162(1), 237-254.
- Lin, H. H., Chen, J. H., Huang, C. C., Wang, C. J. (2007). Apoptotic effect of 3, 4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation. *International Journal of Cancer*, 120(11), 2306-2316.
- Liu, P. H., Wang, J. D. ve Keating, N. L. (2013). Expected years of life lost for six potentially preventable cancers in the United States. *Preventive medicine*, 56(5), 309-313.
- Liu, Y. D., Sun, X., Zhang, Y., Wu, H. J., Wang, H., Yang, R. (2019). Protocatechuic acid inhibits TGF- β 1-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells. *Journal of pharmacological sciences*, 139(1), 9-14.
- Liu, Y. M., Jiang, B., Bao, Y. M., An, L. J. (2008). Protocatechuic acid inhibits apoptosis by mitochondrial dysfunction in rotenone-induced PC12 cells. *Toxicology in vitro*, 22(2), 430-437.

- Luo, L., Wei, Q., Liu, L., Lin, X., Lin, C., Zheng, L. I., Zhao, J. (2015). Protocatechuic acid benefits proliferation and phenotypic maintenance of rabbit articular chondrocytes: An *in vitro* study. *Experimental and therapeutic medicine*, 9(5), 1865-1870.
- Maeß, M. B., Wittig, B., Cignarella, A., Lorkowski, S. (2014). Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *Journal of immunological methods*, 402(1-2), 76-81.
- Manicone, A. M. ve McGuire, J. K. (2008, February). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 19, No. 1, pp. 34-41). Academic Press.
- Masella, R., Santangelo, C., D'archivio, M., LiVolti, G., Giovannini, C., Galvano, F. (2012). Protocatechuic acid and human disease prevention: biological activities and molecular mechanisms. *Current medicinal chemistry*, 19(18), 2901-2917.
- Matsumoto, K., Moriuchi, T., Koji, T., Nakane, P. K. (1987). Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *The EMBO Journal*, 6(3), 637-642.
- Min, S. W., Ryu, S. N. ve Kim, D. H. (2010). Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O- β -D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *International immunopharmacology*, 10(8), 959-966.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), 2861-2873.
- Moganti, K., Li, F., Schmuttermaier, C., Riemann, S., Klüter, H., Gratchev, A., Kzhyshkowska, J. (2017). Hyperglycemia induces mixed M1/M2 cytokine profile in primary human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology*, 222(10), 952-959.
- Moldovan, G. L., Pfander, B. ve Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, 129(4), 665-679.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Multhoff, G., Molls, M. ve Radons, J. (2012). Chronic inflammation in cancer development. *Frontiers in immunology*, 2, 98.
- Noemi, E. ve Francisco, J. V. (2012). Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg*, 4(3), 62-72.
- Olive, P. L. ve Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*, 1(1), 23-29.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603.
- Plate, K. H., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A., Risau, W. (1993). Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer research*, 53(23), 5822-5827.
- Puck, T. T., Marcus, P. I. ve Cieciura, S. J. (1956). Clonal growth of mammalian cells *in vitro* growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *Journal of Experimental Medicine*, 103(2), 273-284.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.
- Quincozes-Santos, A., Andreazza, A. C., Nardin, P., Funchal, C., Gonçalves, C. A., Gottfried, C. (2007). Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology*, 28(4), 886-891.
- Reithmeier, T., Graf, E., Piroth, T., Trippel, M., Pinsker, M. O., Nikkhah, G. (2010). BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors. *BMC cancer*, 10(1), 1-8.

- Riss, T. L. ve Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and drug development technologies*, 2(1), 51-62.
- Rulseh, A. M., Keller, J., Klener, J., Šroubek, J., Dbalý, V., Syrůček, M., Vymazal, J. (2012). Long-term survival of patients suffering from glioblastoma multiforme treated with tumor-treating fields. *World journal of surgical oncology*, 10(1), 1-6.
- Sallusto, F. ve Lanzavecchia, A. (2010). Monocytes join the dendritic cell family. *Cell*, 143(3), 339-340.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C., Masella, R. (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali-istituto superiore di sanita*, 43(4), 394.
- Schlegel, J., Piontek, G., Kersting, M., Schuermann, M., Kappler, R., Scherthan, H., Mennel, H. D. (1999). The p16/Cdkn2a/Ink4a gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors. *Pathobiology*, 67(4), 202-206.
- Schweichel, J. U. ve Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7(3), 253-266.
- Sears, B. ve Ricordi, C. (2011). Anti-inflammatory nutrition as a pharmacological approach to treat obesity. *Journal of Obesity*, 2011.
- Sibenaller, Z. A., Etame, A. B., Ali, M. M., Barua, M., Braun, T. A., Casavant, T. L., Ryken, T. C. (2005). Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system. *Neurosurgical focus*, 19(4), 1-9.
- Sieve, I., Ricke-Hoch, M., Kasten, M., Battmer, K., Stapel, B., Falk, C. S., Hilfiker-Kleiner, D. (2018). A positive feedback loop between IL-1 β , LPS and NEU1 may promote atherosclerosis by enhancing a pro-inflammatory state in monocytes and macrophages. *Vascular pharmacology*, 103, 16-28.
- Slee, E. A., Adrain, C. ve Martin, S. J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 6(11), 1067-1074.
- Smith, D. C., Kalebic, T., Infante, J. R., Siu, L. L., Sullivan, D., Vlahovic, G., Kauh, J. S., Gao, F., Berger, A. J., Tirrell, S., Gupta, N., Di Bacco, A., Berg, D., Liu, G.,

- Lin, J., Hui, A. M., Thompson, J. A. (2015). Phase 1 study of ixazomib, an investigational proteasome inhibitor, in advanced non-hematologic malignancies. *Investigational New Drugs*, 33(3), 652–663.
- Spencer, J. P. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(2), 244-260.
- Sueki, A., Matsuda, K., Iwashita, C., Taira, C., Ishimine, N., Shigeto, S., Kawasaki, K., Sugano, M., Yamamoto, H., Honda, T. (2014). Epithelial-mesenchymal transition of A549 cells is enhanced by co-cultured with THP-1 macrophages under hypoxic conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(4), 804–809.
- Tabuchi, K., Honda, C. ve Nakane, P. K. (1987). Demonstration of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in glioma cells. *Neurologia medico-chirurgica*, 27(1), 1-5.
- Taylor, O. G., Brzozowski, J. S. ve Skelding, K. A. (2019). Glioblastoma multiforme: an overview of emerging therapeutic targets. *Frontiers in oncology*, 9, 963.
- Theocharis, S. E., Skopelitou, A. S., Margeli, A. P., Pavlaki, K. J., Kittas, C. (1994). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Digestive diseases and sciences*, 39(2), 245-252.
- Tseng, T. H., Kao, T. W., Chu, C. Y., Chou, F. P., Lin, W. L., Wang, C. J. (2000). Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochemical Pharmacology*, 60(3), 307-315.
- Ünal, T. (2012). Neoplazi. http://dent2.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/301_patoloji/12.pdf (Erişim Tarihi: 20.04.2021)
- Valable, S., Barbier, E. L., Bernaudin, M., Roussel, S., Segebarth, C., Petit, E., Rémy, C. (2007). *In vivo* MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage*, 37, S47-S58.

- Valable, S., Lemasson, B., Farion, R., Beaumont, M., Segebarth, C., Remy, C., Barbier, E. L. (2008). Assessment of blood volume, vessel size, and the expression of angiogenic factors in two rat glioma models: a longitudinal *in vivo* and *ex vivo* study. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo*, 21(10), 1043-1056.
- Wang, D., Wei, X., Yan, X., Jin, T., Ling, W. (2010). Protocatechuic acid, a metabolite of anthocyanins, inhibits monocyte adhesion and reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12722-12728.
- Wang, D., Zou, T., Yang, Y., Yan, X., Ling, W. (2011). Cyanidin-3-O- β -glucoside with the aid of its metabolite protocatechuic acid, reduces monocyte infiltration in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochemical pharmacology*, 82(7), 713-719.
- Wei, M., Chu, X., Jiang, L., Yang, X., Cai, Q., Zheng, C., Deng, X. (2012). Protocatechuic acid attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Inflammation*, 35(3), 1169-1178.
- Wen, P. Y. ve Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *New England Journal of Medicine*, 359(5), 492-507.
- Wolowczuk, I., Verwaerde, C., Viltart, O., Delanoye, A., Delacre, M., Pot, B., Grangette, C. (2008). Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clinical and Developmental Immunology*, 2008.
- Xie, Y. ve Chen, X. (2013). Structures required of polyphenols for inhibiting advanced glycation end products formation. *Current drug metabolism*, 14(4), 414-431.
- Xie, Y., Yang, W., Chen, X., Xiao, J. (2014). Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure–activity relationship. *Food & function*, 5(10), 2582-2589.
- Xie, Z., Guo, Z., Wang, Y., Lei, J., Yu, J. (2018). Protocatechuic acid inhibits the growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2256-2263.

- Xu, X., Lai, Y. ve Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1).
- Yang, M. H., Baek, S. H., Chinnathambi, A., Alharbi, S. A., Ahn, K. S. (2021). Identification of protocatechuic acid as a novel blocker of epithelial-to-mesenchymal transition in lung tumor cells. *Phytotherapy Research*, 35(4), 1953-1966.
- Yeung, O. W., Lo, C. M., Ling, C. C., Qi, X., Geng, W., Li, C. X., Ng, K. T., Forbes, S. J., Guan, X. Y., Poon, R. T., Fan, S. T., Man, K. (2015). Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 62(3), 607–616.
- Yılmaz, A., Altuğ, F., Düz, E., Çırak, B. (2012). Glioblastoma multiforme tedavisi seçenekleri ve yaşam sürelerine etkileri.
- Yin, M. C., Lin, C. C., Wu, H. C., Tsao, S. M., Hsu, C. K. (2009). Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14), 6468-6473.
- Yip, E. C. H., Chan, A. S. L., Pang, H., Tam, Y. K., Wong, Y. H. (2006). Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell biology and toxicology*, 22(4), 293-302.

http-1: <https://www.medicana.com.tr/haber-detay/12903/2020-yilinda-233-bin-kisiye-kanser-tanisi-konuldu>

(erişim tarihi 10.03.2020)

http-2: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

(erişim tarihi 13.05.2020)

http-3: <https://tr.vision1cyclings.com/obrazovanie/86508-molekulyarnaya-i-strukturnaya-formula-fenola.html>

(erişim tarihi 30.01.2020)

http-4: <https://doi.org/10.3390/molecules25153342>

(erişim tarihi 14.05.2020)

http-5:

https://en.wikipedia.org/wiki/Protocatechuic_acid#/media/File:Protocatechusäure.svg

(erişim tarihi 15.05.2020)

http-6: https://www.researchgate.net/figure/The-three-major-pathways-of-cell-death-Cells-can-be-directed-to-different-programmed_fig1_263888879

(erişim Tarihi: 03.04.2021)

http-7:https://www.google.com/search?q=WST-1&sxsrf=ALeKk01464OyUnD9RVHt6vXh2hux1zMVLw:1628953160827&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjhnla047DyAhVTh_0HHXpwB0IQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1366&bih=657#imgsrc=5xKdnZjk1pw19M

(erişim tarihi: 04.04.2021)

http-8:<https://med.virginia.edu/biomolecular-analysis-facility/wp-content/uploads/sites/168/2015/10/CIM-Plate-16-specs.pdf>

(erişim tarihi: 06.04.2021)

http-9: <https://www.nexcelom.com/aopi-viability/>

(erişim tarihi: 11.04.2021)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fidan BAYRAMOVA

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Geçmişi:

- 2014-2018, Bakü Devlet Üniversitesi, Biyoloji Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü
- 2003-2014, Mirze Memmedov adına Xanqervend köy okulu

Mesleki Geçmişi:

- 2018 (Eylül) -2019(Şubat) Ağdam İlçesi 8 Numaralı Orta Okulu, Biyoloji Öğretmenliği