

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

VULPİNİK ASİTLE FARKLI KEMOTERAPOTİK İLAÇLARIN
MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE SİNERJİK
ANTİKANSER ETKİLERİNİN GEN VE PROTEİN
SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI

Esmâ Kübra KAĞAN YENİÇERİ

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ALTAY

KİMYA
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2024
Her Hakkı Saklıdır.

ÖZET

Doktora Tezi

VULPİNİK ASİTLE FARKLI KEMOTERAPÖTİK İLAÇLARIN MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE SİNERJİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN GEN VE PROTEİN SEVİYESİNDE ARAŞTIRILMASI

Esma Kübra KAĞAN YENİÇERİ

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ALTAY
İkinci Danışman: Prof. Dr. Harun BUDAK

Bu tez çalışmasında vulpinik asit ile farklı kemoterapötik ilaçların (sisplatin, dosetaksel, doksorubisin ve mitoksantron) insan meme kanseri hücre hatları (MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-453) üzerindeki sinerjik antikanser etkilerinin gen ve protein seviyelerinde araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, ilk aşamada vulpinik asit ile her bir kemoterapötik ilacın yukarıda bahsi geçen hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri doz ve zaman bağımlı olarak XTT yöntemiyle incelendi ve buradan elde edilen absorbans değerleri CompSyn programına işlenerek vulpink asidin her bir kemoterapötik ilaç ile kombinasyon indeks (CI) değeri belirlendi. CI değerleri, vulpinik asidin doksorubisin ve mitoksantron ile MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücreleri üzerinde sinerjik etki, MCF-7 hücrelerinde ise antagonist etki sergilediğini gösterdi. İkinci aşamada, sinerjik etki görülen hücre hatlarındaki ROS miktarı, mitokondriyal membran potansiyeli, multikaspaz aktivitesi, hücre döngüsü, apoptosis ve PI3K/AKT sinyal yolağındaki değişimler flow sitometrik analizler ile incelendi. Sonuçlar, her iki hücre hattında da ROS miktarında, mitokondriyal membrane depolarizasyonunda ve multikaspaz aktivitesinde artış olduğunu, hücre döngülerini G0/G1 fazında yakaladığını, hücreleri apoptoza yönlendirdiğini ve ayrıca PI3K/AKT sinyal yolağını bloke ettiğini gösterdi. Üçüncü aşamada, flow sitometri analiz sonuçlarını moleküler seviyede doğrulamak için apoptotik yolak markır proteinleri BAX, BCL2, P53, Kaspaz-3, Kleaved kaspaz-3, Sitokrom-c'nin, ve PI3K/AKT sinyal yolağının markır proteinleri olan PI3K, mTOR ve AKT'nin protein ve gen seviyelerindeki kantitatif değişimleri Western blot ve Real Time PCR (qPCR) analizleri ile incelendi. Elde edilen veriler hücrelerde apoptotik etkilerin hem gen hem de protein seviyesinde gerçekleştiğini, PI3K/AKT sinyal yolağındaki baskılanmanın ise protein seviyesinde olduğunu gösterdi. Son aşamada, yara iyileştirme yöntemiyle gerçekleştirilen migrasyon testleri sonucunda her iki hücre hattında da uygulanan kombinasyonların önemli derecede antimigratif etki sergilediğini göstermiştir. Sonuç olarak, tüm bu veriler vulpinik asit ile doksorubisin ve mitoksantron'un meme kanseri hücre hatlarında *in vitro* sinerjik etki gösteren kombinasyonlarının meme kanseri tedavisinde bir sonraki aşama olan *in vivo* çalışmalara kapı aralamıştır.

2024, 129 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antikanser, Meme kanseri, PI3K/AKT, Sinerjik etki, Vulpinik asit

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF SYNERGISTIC ANTICANCER EFFECTS OF VULPINIC ACID AND DIFFERENT CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS ON BREAST CANCER CELL LINES AT GENE AND PROTEIN LEVELS

Esma Kübra KAĞAN YENİÇERİ

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet ALTAY
Second Supervisor: Prof. Dr. Harun BUDAK

This thesis was conducted to analyze the synergistic anticancer effect of different chemotherapeutic drugs (cisplatin, docetaxel, doxorubicin, and mitoxantrone) on human breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, and MDA-MB-453) at the gene and protein levels. In the first step, the cytotoxic effects of vulpinic acid and each of the chemotherapeutic drugs on the above-mentioned cell lines were investigated in a dose- and time-dependent manner. The absorbance values obtained here were then processed in the CompSyn program and the combination index (CI) value of vulpinic acid with each chemotherapeutic drug was determined. The CI values showed that vulpinic acid had a synergistic effect with doxorubicin and mitoxantrone on MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells, and an antagonistic effect on MCF-7 cells. In the second phase, changes in ROS levels, mitochondrial membrane potential, multi-caspase activity, cell cycle, apoptosis and PI3K/AKT signalling pathway were examined by flow cytometric analysis in cell lines in which the compounds showed synergistic effects. The results showed that there was an increase in the amount of ROS, mitochondrial membrane depolarization, multicaspase activity and apoptotic cell rate in both cell lines, as well as G0/G1 cell cycle arrest and PI3K/AKT pathway blockade. In the third step, to confirm the results of the flow cytometry analysis at the molecular level, quantitative changes in marker proteins of the apoptotic pathway (BAX, BCL2, P53, Caspase-3, Cleaved caspase-3, Cytochrome-c) and the PI3K/AKT signaling pathway (PI3K, mTOR and AKT) were examined at the protein and gene levels by Western blot and real-time PCR (qPCR). The data obtained showed that apoptotic effects in cells occurred at both the gene and protein levels, while the suppression of the PI3K/AKT signaling pathway occurred at the protein levels. Finally, as a result of migration tests using the wound healing method, it was found that the combinations of compounds applied to both cell lines had significant anti-migratory effects. As a result, these data have opened the door to *in vivo* studies of combinations of vulpinic acid with doxorubicin and mitoxantrone, which show synergistic effects *in vitro* on breast cancer cell lines.

2024, 129 Pages

Keywords: Anticancer, Breast cancer, Combination, PI3K/AKT, Synergistic effect, Vulpinic acid

TEŞEKKÜR

Vulpinik Asitle Farklı Kemoterapotik İlaçların Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerinde Sinerjik Antikanser Etkilerinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması isimli bu çalışma YÖK 100/2000 doktora projesi kapsamında Doğal ve Bitkisel Ürünler / Kozmetik Ürünler ve TÜBİTAK alanında alınan destek ile Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalında Sayın Doç. Dr. Ahmet ALTAY danışmanlığında ve Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Sayın Prof. Dr. Harun BUDAK yardımcı danışmanlığında hazırlanarak Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne doktora tezi olarak sunulmuştur.

Çalışma süresince YÖK 100/2000 Doğal ve Bitkisel Ürünler / Kozmetik Ürünler ve TÜBİTAK 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında burs desteği sağlayan YÖK 100/2000 doktora projesi ve TÜBİTAK'a,

Çalışma boyunca benden bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen, bana her türlü yardım ve desteği sağlayarak çalışmalarımı yönlendirmemde büyük emeği olan değerli danışmanım Doç. Dr. Ahmet ALTAY ve yardımcı danışmanım Prof. Dr. Harun BUDAK'a,

Tez izleme sürecinde tezin gidişatına engin bilgileriyle katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL ve Sayın Doç. Dr. Hasan KILIÇGÜN hocalarıma,

Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi müdürü Sayın Doç. Dr. Kemal Volkan ÖZDOKUR'a,

Çalışmalarımın farklı aşamalarında yardımcı olan Sayın Arş. Gör. Şükran GÜNAYDIN ve Dr. Şeyda Nur KALIN'a,

Hem yüksek lisans hem de doktora sürecim boyunca her konuda her zaman desteğini esirgemeyen akademik olarak da örnek aldığım Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BİLGİ'ye,

Maddi manevi tüm güçlüklerle karşı her zaman yanımda olan, haklarını asla ödeyemeyeceğimi bildiğim, bu günlere gelmemde en büyük paya sahip olan, sabırla, sorgulamadan beni dinleyip, ne olursa olsun desteklerini hissettiren sevgili annem Hatice KAĞAN' a ve her zaman okumam için elinden gelen desteğin fazlasını yapmaya çalışan, her koşulda ve her zaman yanımda olan sevgili babam Ahmet KAĞAN' a, ve yine her zaman beni dinleyip yönlendiren, yol göstericilerim sevgili ablam Tuba YENİÇERİ ve canım kardeşim İsmail Bilge KAĞAN'a,

Gerek çalışmalarımda gerekse sosyal hayatımda karşılaştığım tüm olumlu veya olumsuz olaylarda her daim yanıbaşımdaya olan, zorlu geçen birçok süreçte ve birlikte çıktığımız yolda şimdiye kadar hiç elimi bırakmayan, hayatım boyunca da bırakmayacağını bildiğim, neşesi ve desteğiyle hep yanı başımda olan eşim Dr. Üzeyir YENİÇERİ' ye teşekkür ederim.

Vatanın bölünmez bütünlüğü uğruna canlarından vazgeçen, sayelerinde huzur ve güven ortamında bu tezi oluşturabildiğim aziz şehitlerimize ve Türk ordusuna minnettarım.

Esma Kübra KAĞAN YENİÇERİ

Ocak, 2024

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	32
2.1. Amaç	36
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	38
3.1. Materyal	38
3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler	38
3.2. Yöntem	41
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	41
3.2.1.1. Hücre Açma ve Büyütme İşlemleri.....	41
3.2.1.2. Hücre Bölme ve Hücre Dondurma İşlemleri	41
3.2.1.3. Hücre Sayımı.....	42
3.2.2. Kemoterapi İlaçlarının (Sisplatin, Doksorubisin, Dosetaksel ve Mitaksantron) ve Vulpinik Asitin Uygun Kombinasyonlarının Hazırlanması.....	43
3.2.3. Hücre Proliferasyonu Testi (XTT Testi)	43
3.2.4. Kombinasyon İndeks Çalışmaları.....	44
3.2.5. Flow Sitometri Çalışmaları.....	45
3.2.5.1. Apoptosis (Annexin V-FITC/PI)	45
3.2.5.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (MMP)	46
3.2.5.3. Multikaspaz Aktivite Testi.....	46
3.2.5.4. Oksidatif Stres	47
3.2.5.5. Hücre Döngüsü (Cell Cycle).....	48
3.2.5.6. PI3K/AKT Sinyal Yolağı.....	48
3.2.6. Kantitatif Protein Ekspresyon (Western Blot) Çalışmaları	49

3.2.6.1. Jelin Yüklmesi.....	49
3.2.6.2. Jeldeki Proteinin Membrana Transferi (Blotlama), Bloklama ve Görüntüleme Basamakları.....	49
3.2.7. Kantitatif Gen Ekspresyon (Real-Time PCR) Çalışmaları.....	50
3.2.7.1. Total RNA İzasyonu	50
3.2.7.2. RNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi	51
3.2.7.3. cDNA kütüphanesinin hazırlanması	52
3.2.7.4. Primer Dizaynı	53
3.2.7.5. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Analizi	60
3.2.8. Migrasyon Çalışması	61
3.2.9. İstatistiksel Analizler	61
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	63
4.1. Vulpinik Asit ve Kemoterapötik İlaçların Doz-Zaman Bağımlı Antiproliferasyon Çalışmaları	63
4.2. Kemoterapötik İlaçların Vulpinik Asit ile Kombinasyon İndeks Değerlerinin Belirlenmesi	66
4.3. Flow Sitometri Çalışmaları	69
4.3.1. Apoptozis (Annexin V/FITC-PI).....	69
4.3.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli.....	72
4.3.3. Multikaspaz Aktivitesi.....	75
4.3.4. Reaktif Oksijen Türleri.....	77
4.3.5. Hücre Döngüsü	79
4.3.6. PI3K/AKT Sinyal Yolağı	81
4.4. Kantitatif Protein Ekspresyon Analiz (Western Blot) Çalışmaları	84
4.5. Kantitatif Gen Ekspresyonu (q-PCR) Çalışmaları	93
4.6. Migrasyon Analizi Çalışmaları	98
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	101
6. ÖNERİLER.....	112
KAYNAKLAR	113

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kanserin kazanılmış yetenekleri. (Hanahan ve Weinberg, 2011 'den uyarlanmıştır).....	2
Şekil 1.2. Tümör gelişimi basit modeli (Siddiqui, Sanna, Ahmad, Sechi, ve Mukhtar, 2015 'den uyarlanmıştır).....	3
Şekil 1.3. Hücresel apoptoz mekanizması (KEGGPATHWAY, 2023).....	6
Şekil 1.4. Hücre ölüm çeşitleri. (Galluzzi vd., 2018'den uyarlanmıştır).	7
Şekil 1.5. 2020 Globocan kanser insidansı (Globocan, 2023).	8
Şekil 1.6. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı (ATCC, 2023).....	10
Şekil 1.7. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı (ATCC, 2023).	10
Şekil 1.8. MDA-MB-453 insan meme kanseri hücre hattı (ATCC, 2023).	11
Şekil 1.9. Serbest radikallerin etkileri.	13
Şekil 1.10. Oksidatif stresi düzenleyen araçlar, koruyucu mekanizmalar ve oksidatif denge (Moloney ve Cotter, 2018'den revize edilmiştir).....	17
Şekil 1.11. PI3K-AKT sinyal yolağı (KEGGPATHWAY, 2023).	19
Şekil 1.12. PI3K-AKT sinyal yolağı aşağı akış sistemi (www.medikaynak.com'dan alınmıştır.)	20
Şekil 1.13. Sisplatin yapısı (Dasari ve Tchounwou, 2014).	22
Şekil 1.14. Doksorubisin yapısı (Sikora vd., 2022).	23
Şekil 1.15. Dosetaksel yapısı (www.genome.jp,2023).	24
Şekil 1.16. Mitoksantron yapısı (Goryacheva vd., 2023).....	24
Şekil 1.17. Vulpinik asit yapısı (VulpinicAcid, 2023).....	29
Şekil 3. 1. Hücre sayımının yapıldığı Thoma Lamı	42
Şekil 3. 2. Kombinasyon İndeksi değeri aralıkları ve hücreler üzerindeki etkileri (Chou ve Talalay'dan esinlenerek hazırlanmıştır).	45
Şekil 3. 3. Primer dizaynında kullanılan NCBI ana sayfası.	54
Şekil 3. 4. Primer dizaynı için ilgili genin bilgilerinin yer aldığı seçim sayfası.	55
Şekil 3. 5. İlgili gen sekansına ait bilgilerin olduğu NCBI sayfasının üst tarafı.	55
Şekil 3. 6. İlgili gene ait mRNA bilgilerin olduğu NCBI sayfasının alt tarafı.....	56
Şekil 3. 7. İlgili gen sekansının bulunduğu NCBI sayfası.	56
Şekil 3. 8. İlgili sekansın FASTA formatı.....	57
Şekil 3. 9. Primer dizaynı için kullanılan veri tabanı sayfası.	57
Şekil 3.10. Primer bilgilerinin girildiği veri tabanı sayfası.	58

Şekil 3.11. Veri tabanının ilgili gen için önerdiği primer dizisi sayfası.	58
Şekil 3.12. Primer dizaynının kontrol edildiği BLAST sayfası.	59
Şekil 3.13. Dizayn edilen primerlerin BLAST sonuç sayfası.	59
Şekil 4.1. MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerinde uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyon çalışmaları.	68
Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının 48 saatlik apoptotik etkileri. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (5-0,1 µM), VA+MIX-1 (5-0,1 µM), VA+MIX-2 (10-0,5 µM), VA+MIX-3 (25-1 µM)'dir.	70
Şekil 4.3.MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik apoptoz etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 µM), VA+DOX-2 (75-1 µM), VA+DOX-3 (150-10 µM), VA+MIX-1 (25-0,05 µM), VA+MIX-2 (75-0,5 µM)'dir.	71
Şekil 4.4. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatları üzerinde vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının apoptoz sonuçları.	71
Şekil 4.5.MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişimlerin etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX (5-0,1 µM), VA+MIX-1 (5-0,1 µM), VA+MIX-2 (10-0,5 µM), VA+MIX-3 (25-1 µM)'dir.	73
Şekil 4.6.MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişimlerin etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 µM), VA+DOX-3 (150-10 µM), VA+MIX-1 (25-0,05 µM), VA+MIX-2 (75-0,5 µM), VA+MIX-3 (150-5 µM)'dir.	74
Şekil 4.7.MDA-MB-453 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerine vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri.	74
Şekil 4.8.MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik multikaspaz aktivitesine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX (5-0,1 µM), VA+MIX-1 (5-0,1 µM), VA+MIX-2 (10-0,5 µM)'dir.	75
Şekil 4.9.MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik multikaspaz aktivitesine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 µM), VA+DOX-2 (75-1 µM), VA+MIX-1 (25-0,05 µM), VA+MIX-2 (75-0,5 µM)'dir.....	76
Şekil 4.10.MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının multikaspaz aktiviteleri üzerindeki etkileri.	77
Şekil 4.11.MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik reaktif oksijen türleri üzerine etkisi. Grafiklerin üzerinde	

bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M), VA+MIX-3 (25-1 μ M)'dir.	78
Şekil 4.12. MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik reaktif oksijen türleri üzerine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M), VA+DOX-2 (75-1 μ M), VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (75-0,5 μ M), VA+MIX-2 (150-5 μ M)'dir.	79
Şekil 4.13. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının ROS üzerine etkileri.	79
Şekil 4.14. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dir.	80
Şekil 4.15. MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M), VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-3 (150-5 μ M)'dir.	81
Şekil 4.16. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının hücre döngüsü üzerine etkileri.	81
Şekil 4.17. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolağı ekspresyon grafikleri. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dir.	82
Şekil 4.18. MDA-MB-453 hücre hattı üzerinde uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolağı ekspresyon grafikleri. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M), VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-3 (150-5 μ M)'dir.	83
Şekil 4.19. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine etkileri.	84
Şekil 4.20. VA+DOX kombinasyonunun MDA-MB-231 hücreleri üzerinde apoptotik yolak kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyon VA+DOX-1 (5-0,1 μ M)'dir.	85
Şekil 4.21. VA+DOX kombinasyonunun MDA-MB-231 hücreleri üzerinde PI3K/AKT yolağı kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyon; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M)'dir.	85
Şekil 4.22. VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde apoptotik yolak kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dir.	87
Şekil 4.23. VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde PI3K/AKT yolağı kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan	

konsantrasyonlar sırasıyla; VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dir.....	88
Şekil 4.24. VA+DOX kombinasyonunun MDA-MB-453 hücreleri üzerinde apoptotik yolak kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyon; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M)'dir.	89
Şekil 4.25. VA+DOX kombinasyonunun MDA-MB-453 hücreleri üzerinde PI3K/AKT yolağı kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyon; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M)'dir.	89
Şekil 4.26. VA+MIX kombinasyonunun sinerjik etki gösteren konsantrasyonunda MDA-MB-453 hücreleri üzerinde kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (75-0,5 μ M)'dir.	91
Şekil 4.27. VA+MIX kombinasyonunun MDA-MB-453 hücreleri üzerinde PI3K/AKT yolağı kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (75-0,5 μ M)'dir.	92
Şekil 4.28. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının apoptotik yolak üzerindeki kantitatif protein ekspresyon etkisi.	92
Şekil 4.29. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolağı üzerindeki kantitatif protein ekspresyon etkisi.....	93
Şekil 4.30. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücre hattında apoptotik yolak genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dir.	95
Şekil 4.31. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücre hattında PI3K/AKT yolak genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dir.	95
Şekil 4.32. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-453 hücre hattında apoptotik yolak genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX (25-0,1 μ M), VA+MIX-1 (VM-1, 25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (VM-2 75-0,5 μ M)'dir.....	97
Şekil 4.33. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücre hattında PI3K/AKT yolak genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX (25-0,1 μ M), VA+MIX-1 (VM-1, 25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (VM-2 75-0,5 μ M)'dir.....	97

Şekil 4.34. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının apoptotik yolak üzerindeki kantitatif gen ekspresyon etkisi.	98
Şekil 4.35. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolağı üzerindeki kantitatif gen ekspresyon etkisi.	98
Şekil 4.36.VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki 0-24 ve 48 saatlik migrasyon etkisi.	99
Şekil 4.37.VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-453 hücre hattı üzerindeki 0-24 ve 48 saatlik migrasyon etkisi.	100



TABLolar LİSTESİ

Sayfa

Tablo3.1.Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	38
Tablo3.2.Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar	39
Tablo3.3.Tez Dahilinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	40
Tablo3.4.MDA-MB-231 Hücre Hattı için Belirlenen CI Dozunda VA+Kemoterapötik İlaç Uygulaması Sonucu Elde Edilen RNA'ların Saflık ve Konsantrasyon Değerleri	52
Tablo3.5.MDA-MB-453 Hücre Hattı için Belirlenen CI Dozunda VA+Kemoterapötik İlaç Uygulaması Sonucu Elde Edilen RNA'ların Saflık ve Konsantrasyon Değerleri	52
Tablo3.6.MDA-MB-231 Hücre Hattı için Belirlenen CI Değerindeki VA+Kemoterapötik ilaç Uygulaması Sonucu Elde Edilen cDNA'ların Saflık ve Konsantrasyon Değerleri	53
Tablo3.7.MDA-MB-453 Hücre Hattı için Belirlenen CI Değerindeki VA+Kemoterapötik ilaç Uygulaması Sonucu Elde Edilen cDNA'ların Saflık ve Konsantrasyon Değerleri	53
Tablo 3.8. Dizayn Edilen Primerlerin Listesi.....	60
Tablo 3.9. Quantitect SYBR Green PCR Protokolü	61
Tablo 4.1. MCF-7 hücre hattı üzerine Sisplatin, Doksorubisin, Dosetaksel, Mitoksantron ve Vulpinik Asitin 24, 48 ve 72 saatlik inhibisyon değerleri.....	63
Tablo 4.2. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine Doksorubisin, Mitoksantron ve Vulpinik Asitin 24 ve 48 saatlik inhibisyon değerleri.....	64
Tablo 4.3. MDA-MB-453 hücre hattı üzerine doksorubisin, mitoksantron ve vulpinik asitin 24 ve 48 saatlik inhibisyon değerleri.....	65
Tablo 4.4. MCF-7 hücre hattı üzerinde VA+DOX ve VA+MIX'in CI değerleri.....	66
Tablo 4.5. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX konsantrasyon ve CI değerleri.....	67
Tablo 4.6. MDA-MB-453 üzerine VA+DOX ve VA+MIX konsantrasyon ve CI değerleri	67

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Mikrogram/ Mililitre
μM	Mikromolar
μm	Mikrometre
mg	Miligram
g/mol	Gram/Mol
g (RCF)	Göreceli santrifüj kuvveti
h	Saat
dk	Dakika
s	Saniye
KDa	Kilodalton
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
SD	Standart sapma

Kısaltmalar

BRCA 1	Meme kanseri tip 1
BRCA 2	Meme kanseri tip 2
CO ₂	Karbondioksit
DMSO	Dimetil sülfoksit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	Östrojen reseptörü
PR	Progesteron reseptör
HER2	İnsan epitel reseptörü 2
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali
OH [•]	Hidroksil radikali
PTEN	Fosfataz tensin homologu
ROS	Reaktif oksijen türleri
TP53/P53	Tumor protein p53
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
AKT	Protein kinaz B
RTK	Reseptör tirozin kinaz
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat
PI4,5P2/ PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
mTORC	Memeli rapamisin hedefi kompleksi
FOXO	Forkhead box O
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
SOD	Süperoksit dismutaz
VA	Vulpinik asit
CİS	Sisplatin
DOC	Dosetaksel
DOX	Doksorubisin
MIX	Mitaksantron

1. GİRİŞ

Kanser

Kanser, doku veya organlardaki hücrelerin kontrolsüz olarak büyümesi sonucu ortaya çıkan kötü huylu tümörlerdir (Courtney vd., 2015). Kanserde; kanserli hücreler bulundukları dokulardan köken alarak organizma içerisinde başka bölgelere yayılması ve invazyonu ile karakterize bir hastalıktır (Scotting ve Howard, 2013). Kanser, giderek artan bir sağlık problemi olmasının yanı sıra toplumlarda sosyoekonomik yüke, bireylerde ise ciddi maddi ve manevi kayıplara yol açmaktadır. Dünya sağlık örgütünün 2018 verilerine göre 9.6 milyon ölümle sonuçlanan kanser vakaları, dünya çapında artık ilk sırada yer alan ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Aynı zamanda 2018 verileri göz önünde bulundurularak, 2038 yılına kadar 22 milyon insanda kanser hastalığı görüleceği ve bu hastalığa yakalananların %60'ının ölümle sonuçlanacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, 2020'de dünya çapında 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10,0 milyon kanser ölümü meydana geldiği Dünya Sağlık Örgütü tarafından kayıt altına alınmıştır (WHO, 2023). Meme kanseri insidansına bakıldığında ise Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) Globocan 2018 verilerine göre, meme kanserinin 2018'de 620 bin ölüme neden olduğu ve kaydedilen tüm kanser türlerinin %11,6'sı olan 2,08 milyon yeni vaka daha tespit edildiği bildirilmiştir (Bray vd., 2018).

Kanser Oluşum Nedenleri ve Kanserın Özellikleri

Kanser tanıdan tedaviye oldukça karmaşık bir süreci kapsamaktadır. Hem içsel hem dış faktörlerin çeşitli etkileri sonucunda kanserleşmenin meydana geldiği bilinmektedir (Courtney vd., 2015). Her ne kadar kanser hücrelerinin esas özelliğinin kontrolsüz çoğalma olduğu bilinse de bunun dışında birçok farklı biyolojik özellikleri de bulunmaktadır. Kanserli hücreleri normal hücrelerden ayıran başlıca özellikler;

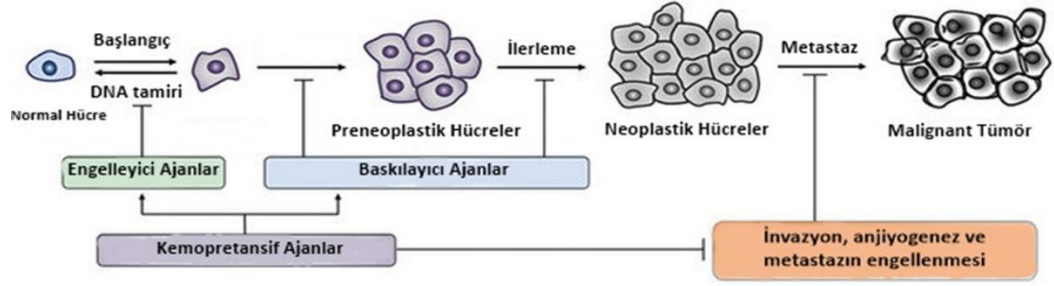
- Hücre kültürlerinde kontak inhibisyonundan kaçabilme,
- Bölünebilmek için dış uyaranlara gereksinim göstermeme,
- Çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık,
- Apoptozisten kaçabilme,
- Anjiyogenezi (tomurcuklanma yolu ile yeni damarların oluşması, gelişmesi) uyandırabilme,

- Metastaz yapabilme,
- Bağımsızlık sisteminden kaçabilme... şeklinde sıralanabilir (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. Kanserın kazanılmış yetenekleri. (Hanahan ve Weinberg, 2011 'den uyarlanmıştır).

Karsinogenezis olarak da bilinen kanser oluşum süreci; başlangıç evresi (initiation), gelişme evresi (promotion) ve ilerleme evresi (progression) olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır. Hücrelerin karsinogenik etkene maruz kaldığı ve kanserli hücrelerin oluştuğu ilk basamak başlangıç evresidir. Hücrelerdeki bu değişim geri dönülemez olur ve hücreler tümör oluşmadan uzun bir süre bu aşamada kalır. Kanser hücrelerinin çoğalmaya başladıkları ve klinik/patolojik olarak belirlenebildikleri oluşumlara yol açtıkları ikinci basamak ise gelişme evresidir. Tümör oluşumun gerçekleştiği, oluşan tümörün bulunduğu organın tamamına yayıldığı veya metastaz yaptığı üçüncü basamak ilerleme evresidir (Şekil 1.2).



Şekil 1. 2. Tümör gelişimi basit modeli (Siddiqui, Sanna, Ahmad, Sechi, ve Mukhtar, 2015 'den uyarlanmıştır).

Organizmada dokularda hücre sayısı ve işlevleri kontrol mekanizmaları tarafından oldukça sıkı bir şekilde kontrole tabi tutulurlar. Bu dokularda normal büyüme ve ölen hücrelerin yerine yeni hücrelerin yapılması temel hedeftir. İşlev gösteren normal hücrelerle ölü hücreler arasında bir denge mevcuttur. Bu dengenin kaybı ile kanserleşme başlar. Kanserleşmenin büyük bir çoğunluğu genetik değişiklikten kaynaklanmaktadır. Çeşitli mutasyonlar sonucu meydana gelen bu genetik değişikliklerle ilişkili üç ana gen türü vardır;

Onkogenler: Hücrelerin normal büyümesini düzenler. Onkogenlerde meydana gelen mutasyon sonucu hücreler kanserleşme ve sınırsız büyüme yeteneğini kazanırlar.

Tümör Baskılayıcı genler: Hasarlı veya kanserli hücrelerin anormal büyüme ve üremesini belirleyen ve bu hata, kusur düzeltilene kadar üremelerini durduran genlerdir. Bu genlerin mutasyona uğraması ve görevlerinin bozulması ile kanser oluşabilir.

DNA Onarım genleri: DNA'daki hatasız eşleşme ve olası DNA hasarlarının tamirinden sorumludurlar. Ancak bu genlerin düzgün çalışmaması sonucunda DNA'da oluşabilecek hatalar yeni hücrelere aktarılır ve böylece hasarlı hücreler meydana gelir (Scotting ve Howard, 2013).

Şekil 1.2'de görüldüğü üzere hücreler çeşitli sebeplerle kanserleşme sürecine girdiklerinde en önemli özellikleri olan kontrolsüz çoğalma sonucu tümörleşmeye başlar. Organizmada bulundukları dokularda hızla büyümeye devam eden bu kanserli hücrelerin bulundukları dokuyu tamamen istila etmesi sonrasında yeni damar yolları oluşturarak (anjyogenez) beslenmelerini devam ettirmelerinin yanı sıra yeni dokulara göçü de mümkündür. Metastaz olarak da bilinen bu durum kanserli hücrelerin yeni dokularda da hızla çoğalmasını sürdürerek dokuları kullanılamaz hale getirebilirler. Kanser tedavi

yöntemleri tüm bu süreçlerin oluşumunu ve sürdürülmesini engellemek için uygulanan tedavilerdir. Tedavide kullanılan ilaçların temel amacı kanserli hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarını engelleyerek onları programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptoza yönlendirmektir (Green ve Llambi, 2015).

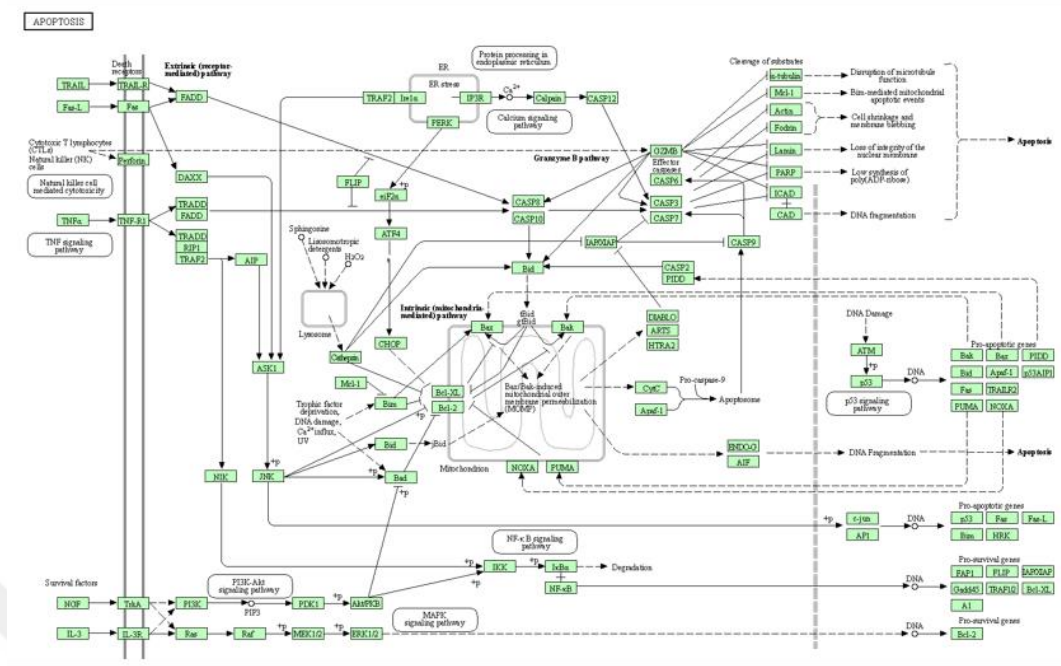
Hücre ölümü, biyolojik bir hücrenin işlevlerini yerine getirmeyi bırakması olayıdır. Bu, programlı hücre ölümünde olduğu gibi, eski hücrelerin ölmesi ve yerlerine yenilerinin gelmesi şeklindeki doğal sürecin bir sonucu olabileceği gibi, hastalıklar, lokalize yaralanmalar veya hücrelerin parçası olduğu organizmanın ölümü gibi faktörlerden de kaynaklanabilir. Hücrelerin bilinen on iki farklı ölüm şekli vardır. Bunlar içerisinde mekanizması detaylı bir şekilde açıklanmış olan ve en iyi bilinenler; apoptoz, nekroz ve otofajidir (Green ve Llambi, 2015; Yan, Elbadawi, ve Efferth, 2020).

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, hücre büyümesi ve çoğalmasının önemli bir düzenleyicisidir. Apoptozun uyarılması, ilerleyen bir dizi hücresel biyokimyasal ve morfolojik değişiklik ile karakterizedir. Hücresel apoptoz çeşitli iç ve dış sinyaller aracılığıyla hücrelerin ölümüne yönelimini sağlayan sinyal yollarından birini oluşturmaktadır. Organizma içerisinde görevi ve işlevi sona eren hücreler apoptoza yönlendirilerek ortadan kaldırılır. Hücresel döngünün normal bir parçası olan bu süreç sayesinde hücre içi denge korunabilmektedir. Ancak kanser hücrelerinde bu durum oldukça farklıdır. Kanserli hücreler ölümden kaçma özellikleri sayesinde organizma içerisinde sınırsız bir şekilde çoğalabilmektedir. Bu durum kanser tedavisinde önüne geçilmeye çalışılan temel sorunu oluşturmaktadır.

Apoptoz mekanizmaları, enerjiye bağlı bir dizi moleküler olayı içeren oldukça karmaşık bir sistemdir (Şekil 1.3). Bugüne kadar yapılan araştırmalar iki ana apoptotik yol olduğunu göstermektedir: ekstrinsik veya ölüm reseptörü yolu ve intrinsik veya mitokondriyal yol. Apoptoz hem içsel hem de dışsal faktörler tarafından aktive edilebilen bir süreçtir. İçsel aktivasyon sonucu başlayan süreçte; sağlıklı hücreler mitokondriyal zarında bulunan Bcl-2 adlı bir protein içerir. Mitokondri, enerji üretiminin gerçekleştiği organellerdir. Sağlıklı koşullar altında Bcl-2 apoptozu önler. Bununla birlikte, iç hasar durumunda (örneğin, yanlış katlanmış proteinler, kusurlu genler, vb.) Bax adı verilen ikinci bir protein, Bcl-2'nin koruyucu etkilerini ortadan kaldırır ve mitokondriyal membranda delikler açar. Mitokondrinin içindeki bir protein olan sitokrom-c, kaspaz-9'u aktive eden bir dizi reaksiyonu başlatmak için artık kırılmış olan mitokondriyal zardan

dışarıya çıkar. Kaspaz-9 bir başlatıcı enzimdir. Bu esnada hücre küçülmeye başlar, kromatin ve çekirdek yoğunlaşır ve hücre zarı boyunca blebler oluşur. Blebler hücre yüzeyindeki çıkıntılardır. Blebbing apoptotik bir yol değil, apoptoz sürecinin bir özelliğidir. Kaspaz-9, her ikisi de infazcı proteinler olan kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi bölerek aktive eder. Kaspaz-3 ve kaspaz-7 membranı, kromozomları ve hücredeki diğer çeşitli proteinleri parçalayıp yok eder. Hücre iskeleti çöker ve hücre apoptotik cisimcikler adı verilen küçük kapalı birimlere ayrılır. Yutma proteinleri aynı anda hücre dışı ortama salınır. Fagositik hücreler (başka bir hücreyi yutabilen herhangi bir hücre, makrofajlar) hücre yüzeylerindeki reseptörlere bağlanan yutma proteinlerine yanıt verir. Fagositler daha sonra apoptotik cisimlere göç eder ve onları yutar. Böylelikle apoptoz süreci hücre için tamamlanmış olur. Apoptoz, geride çok az veya hiç hücre kalıntısı bırakmayan nispeten temiz bir süreçtir (Elmore, 2007).

Dışsal faktörler tarafından başlatılan apoptoz sürecinde ise; hücre dışı ortamdan gelen proteinler, apoptoza uğrayacak hücrenin yüzeyindeki reseptörlere bağlanır. Aktive olan reseptörler, hücre içi ortamda bulunan ve bir başlatıcı enzim olan kaspaz-8'i aktive eden ölüm reseptörleri ve proteinleri kümesi olan ölüm indükleyici sinyal kompleksine (DISC) bir sinyal gönderir. Kaspaz-8, yürütücü proteinleri parçalayıp aktive ettiğinde apoptoz normal şekilde devam eder. Hücre küçülür, blebler oluşur, organeller parçalanır, apoptotik cisimler ortaya çıkar ve fagositoz başlar. Apoptoz, hücre dışı ortam hücreye hayatta kalma sinyalleri göndermeyi bıraktığında da başlatılır. Hayatta kalma sinyallerinin eksikliği, Bax proteininin Bcl-2'yi devre dışı bırakmasına neden olur ve apoptoz normal şekilde devam eder (Elmore, 2007).

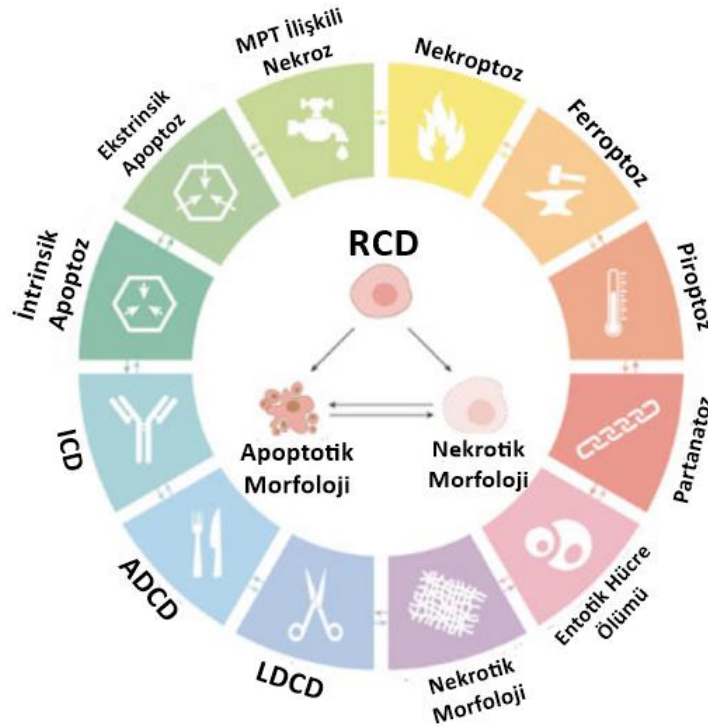


Şekil 1. 3. Hücresel apoptoz mekanizması (KEGGPATHWAY, 2023).

Bilinen bir başka ölüm şekli de Nekroz'dur. Nekroz, canlı dokudaki hücrelerin otoliz yoluyla erken ölümüyle sonuçlanan bir hücre hasarı şeklidir. Nekroz, hücre bileşenlerinin düzensiz sindirimiyle sonuçlanan enfeksiyon veya travma gibi hücre veya doku dışındaki faktörlerden kaynaklanır. Buna karşılık apoptoz, doğal olarak meydana gelen programlanmış ve hedeflenmiş bir hücre ölüm nedenidir. Apoptoz genellikle organizmaya faydalı etkiler sağlarken, nekroz neredeyse her zaman zararlıdır ve ölümcül olabilir (Kanduc vd., 2002).

Nekroza bağlı hücre ölüm apoptotik sinyal iletim yolunu takip etmez, bunun yerine çeşitli reseptörler aktive olur ve hücre zarı bütünlüğünün kaybına ve hücre ölümü ürünlerinin hücre dışı boşluğa kontrolsüz bir şekilde salınmasına neden olur (Proskuryakov, Konoplyannikov, ve Gabai, 2003). Bu durum, çevre dokuda lökositleri ve ölü hücreleri fagositoz yoluyla ortadan kaldıran yakındaki fagositleri çeken enflamatuvar bir yanıt başlatır. Bununla birlikte, lökositler tarafından salınan mikrobiyal zararlı maddeler çevre dokularda ikincil hasar meydana getirir (Rock ve Kono, 2008). Bu ikincil hasar iyileşme sürecini engeller. Böylece, tedavi edilmeyen nekroz, hücre ölümünün gerçekleştiği yerde veya yakınında çürüyen ölü doku ve hücre kalıntılarının birikmesine neden olur. Klasik bir örnek kangrendir. Apoptozun aksine nekrozda hücre şişerek hücre içi organellerini dışarıya aktarır (Galluzzi ve Kroemer, 2008).

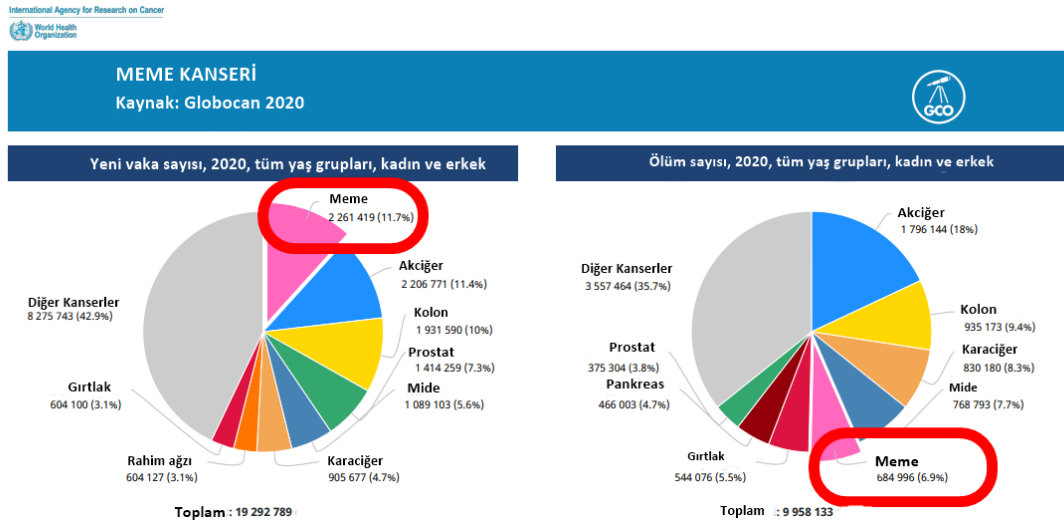
Bir diğer hücre ölüm şekli de otofajidir. Otofaji veya otofagositoz ismi ile de bilinen bu ölüm şeklinde hücre kendi kendisini yok eder ve lizozoma bağlı düzenlenmiş bir mekanizma aracılığıyla gereksiz veya işlevsiz bileşenleri ortadan kaldıran bir süreçtir (Klionsky, 2008). Başlangıçta açlığa karşı korunmak için indüklenen ilkel bir bozunma yolu olarak karakterize edilmesine rağmen, otofajinin açlık çekmeyen hücrelerin homeostazında da önemli bir rol oynadığı giderek daha açık hale gelmiştir. Otofajideki kusurlar, nörodejenerasyon ve kanser dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir ve bu hastalıklar için potansiyel bir tedavi olarak otofajiyi modüle etmeye olan ilgi hızla artmıştır (Djajadikerta vd., 2020; Levy, Towers, ve Thorburn, 2017). Hastalıkta otofaji, besin eksikliği olan belirli hücrel stres durumlarında güçlü bir şekilde indüklenebilen önemli bir fizyolojik yanıttır ayrıca strese karşı uyarlanabilir bir yanıt olmasının yanı sıra ve hücrenin hayatta kalmasını da teşvik etmiştir; ancak diğer durumlarda, hücre ölümünü ve morbiditeyi teşvik ettiği görülmektedir. Aşırı açlık durumunda, hücrel bileşenlerin parçalanması, hücrel enerji seviyelerini koruyarak hücrel hayatta kalmayı teşvik eder (Djajadikerta vd., 2020).



Şekil 1. 4. Hücre ölüm çeşitleri. (Galluzzi vd., 2018'den uyarlanmıştır).

Meme Kanseri Mevcut İnsidansı ve Gelecek Tahminleri

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanserdir ve akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (DeSantis vd.,2019; Sung vd., 2021). Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınlanan verilerine göre, 2020 yılı içerisinde meme kanseri teşhisi konan 2,1 milyon kadının olduğu, bu teşhis konulan hastalar içerisindeki ölüm oranının ise yaklaşık 685.000 olduğu belirtilmiştir. 2020'nin sonu itibariyle de son 5 yılda meme kanseri teşhisi konan 7,8 milyon kadının hayatta kaldığı belirtilmiştir. Dünyanın hemen hemen her ülkesinde kadınlarda ergenlikten sonra tüm yaş gruplarında görülebilen meme kanserinin özellikle ilerleyen yaşlarda görülme ihtimali ciddi oranda artmaktadır (WHO, 2021). Mevcut oranda, vaka sayısının 3,05 milyona yükselmesi ve ölüm oranının ise 2040 yılına kadar 6,99 milyona çıkması beklenmektedir (Ferlay vd., 2020). Her geçen gün gittikçe artan ölüm insidansı, bu hastalığın tedavisini daha da elzem hale getirmektedir. Bu sebeple, kanserin erken tanı, tarama, tedavi, beslenme, önleyici/koruyucu müdahalelerin geliştirilmesi ve uygulanabilmesi adına birçok bilimsel çalışma yapılmakta ve kanserle mücadele önemli bir ilgi alanı olmaktadır.



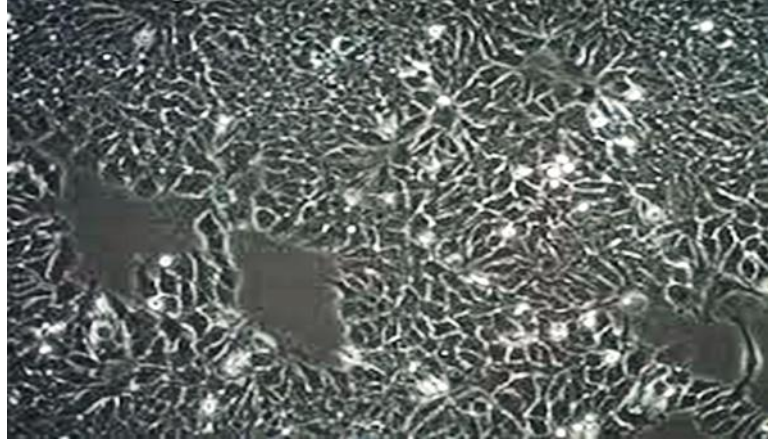
Şekil 1. 5. 2020 Globocan kanser insidansı (Globocan, 2023).

Meme Kanseri Hücre Hatlarının Sınıflandırılması

Meme kanserleri değişken morfolojik ve biyolojik özellikler göstermektedir ve bu nedenle farklı davranışlar sergileyerek tedavilere farklı yanıtlar vermektedir. Kanseri sınıflandırılması, olası onkolojik karar verme ve hastalığın doğru teşhisinin yanı sıra tümör davranışının da tahmin edilebilirliğini sağlayabilmek için oldukça önemlidir (Temel, 2015; Sing, Gupta and Pathak, 2020).

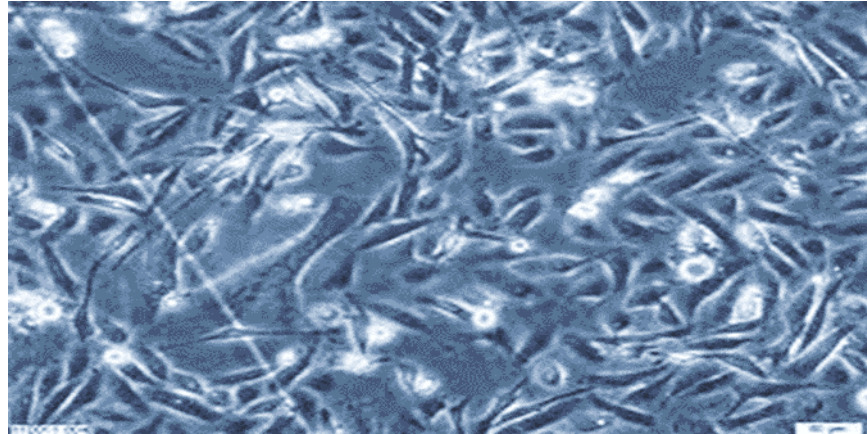
Meme kanserleri temelde iki olguya göre sınıflandırılır: (1) Tümörün türü ve derecesinin ne kadar kötü olduğu (tiplendirme ve derecelendirme), Tümörün evre derecesinin ne kadar yaygın olduğu, durumlarına göre değerlendirilmektedir. Meme kanserlerinin tiplendirilmesi ve derecelendirilmesi, WHO tümör sınıflandırmasında ayrıntılı olarak açıklanan histolojik alt tiplere ve derecelendirmeye dayanmaktadır. Meme kanserlerinin evrelemesi, tümör boyutu, nodal durum ve metastaza (TNM evrelemesi) dayanır. Meme kanserlerinin rutin değerlendirmesi ayrıca reseptör farklılıklarına göre de değişmektedir. Östrojen reseptörü (ER α), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonuna göre de sınıflandırma yapılmaktadır (Tsang ve Gary, 2020).

İsmi Michigan Cancer Foundation'dan (MCF) alan MCF-7 hücre hattı, ER (+) tümörler için bir model olarak kullanılmaktadır. MCF-7, metastatik adenokarsinomlu 69 yaşındaki beyaz bir kadın hastanın meme dokusundan izole edilen epitel hücreleridir. MCF-7, östrojen reseptörü alfa'ya (ER- α) sahip olan nadir meme kanseri tiplerinden biri olmakla beraber agresif yapıya sahip değildir. Bu hücre hattı *in vivo* ortamda tek katmanlı bir şekilde çoğalma sergiler. MCF-7 hücre hattı östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, HER2 büyüme reseptörü negatif hücre hattıdır (Comşa, Cimpean, ve Raica, 2015; Horie, Urano, Ikeda, ve Inoue, 2003).



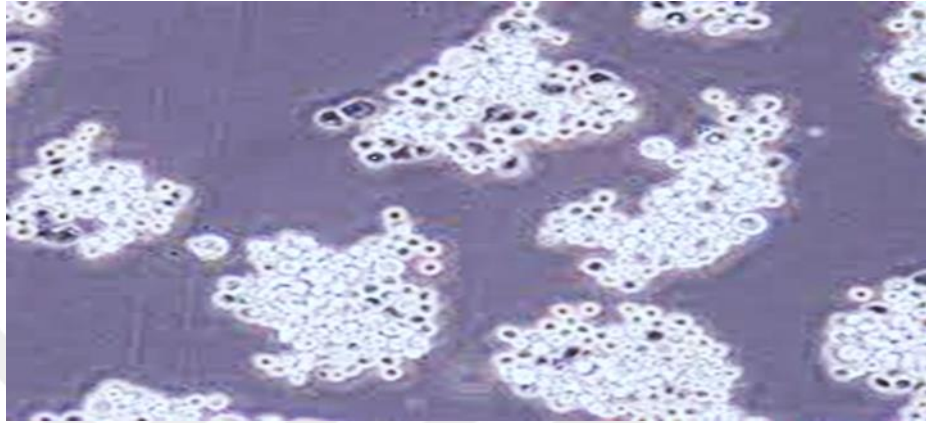
Şekil 1. 6. MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı (ATCC, 2023).

MDA-MB-231 hücre hattı, ER, PR ve HER 2 (-) meme kanseri için bir model olarak kullanılır (Rochefort H, vd., 2003). MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı 1973 yılında M. D. Anderson Kanser Merkezi'nde 51 yaşında, beyaz, kadın bir adenokarsinom hastasının meme dokusundan izole edilen epitel hücreleridir. Epitel benzeri morfolojiye sahip olan MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri fenotipik olarak iğ şeklindeki hücreler olarak görünür. İn vitro olarak, MDA-MB-231 hücre hattı invaziv bir fenotipe sahiptir. MDA-MB-231 hücre hattı östrojen, progesteron ve HER2 büyüme reseptörleri negatif olan hücre hattıdır. Bu hücre hattı MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre hattına göre daha agresif bir yapıdadır (Nohara, Wang, ve Spiegel, 1998).



Şekil 1. 7. MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattı (ATCC, 2023).

MDA-MB-453 insan meme kanseri hücre hattı, 1976 yılında metastatik meme kanseri olan bir kadın hastadan elde edilmiştir. Bu hücre hattı östrojen ve progesteron negatif, HER2 pozitif meme kanseri için bir model olarak kullanılır. MDA-MB-453 hücre hattı fenotipik olarak globüler kümeleşen tek katmanlı bir yapıya sahip hücre hattıdır (Layosa vd., 2021; Vranic, Gatalica, ve Wang, 2011).



Şekil 1. 8. MDA-MB-453 insan meme kanseri hücre hattı (ATCC, 2023).

Meme Kanseri Nedenleri

Tüm kanserlerde karsinogenez yani kanser oluşum süreci birtakım içsel ve dışsal etkiler nedeniyle meydana gelmektedir. İçsel (İntrinsik) etkiler incelendiğinde, karsinogenez oluşumunun temelinde hücre DNA'sında meydana gelen çok sayıdaki mutasyonlar olduğu bilinmektedir. (Stratton, M. R. vd., 2009). En sık mutasyona uğrayan genler arasında ise; MYC, PIK3CA, FGFR1, PTEN, ERBB2, GATA3 ve p53 gelmektedir (Pritchard vd., 2016).

Mutasyonların yanı sıra hücre döngüsü sırasında da hücrelerde anormallikler meydana gelebilmektedir. Hücre döngüsü, bir hücrenin iki bölünme arasında meydana getirdiği aşamaların tümüne verilen isimdir. Hücre döngüsü sonucu yeni hücreler meydana gelmekte, ayrıca döngü aşamalarında oluşabilen/oluşan hataların giderilmesi de farklı kontrol noktaları ile düzenli ve sıkı bir şekilde takip edilmektedir. Bu kontrol noktaları, hücrede bulunan herhangi bir mutasyon, farklılaşma veya DNA hasarının tespitinden sorumludur. Hücrede belirlenen bu kusurların yeni hücreye aktarılmasında için belirlenen hatalar düzeltilene kadar hücre G1 veya G2 fazlarında tutulmaktadır. CDK kısaltmasıyla bilinen siklin bağımlı kinazlar hücre döngüsünün anahtar proteindir. CDK'larda oluşan bir mutasyonlu hücre, kontrol noktalarında tutulmadan devam etmesi sonucunda 2 yeni

mutasyonlu hücre meydana getirir. Genomun gardiyanı olarak da bilinen p53, tümör baskılayıcı bir proteindir. Aynı zamanda p53, hücre döngüsündeki kontrol noktalarında tutulmalardan, DNA tamirinden, hücre senesens ve apoptoz gibi mekanizmalarda da görev almaktadır. Meydana gelen tüm bu değişimler içsel etkileri oluşturmaktadır (Silva, Quintas, Gonçaves, ve Fresco, 2022).

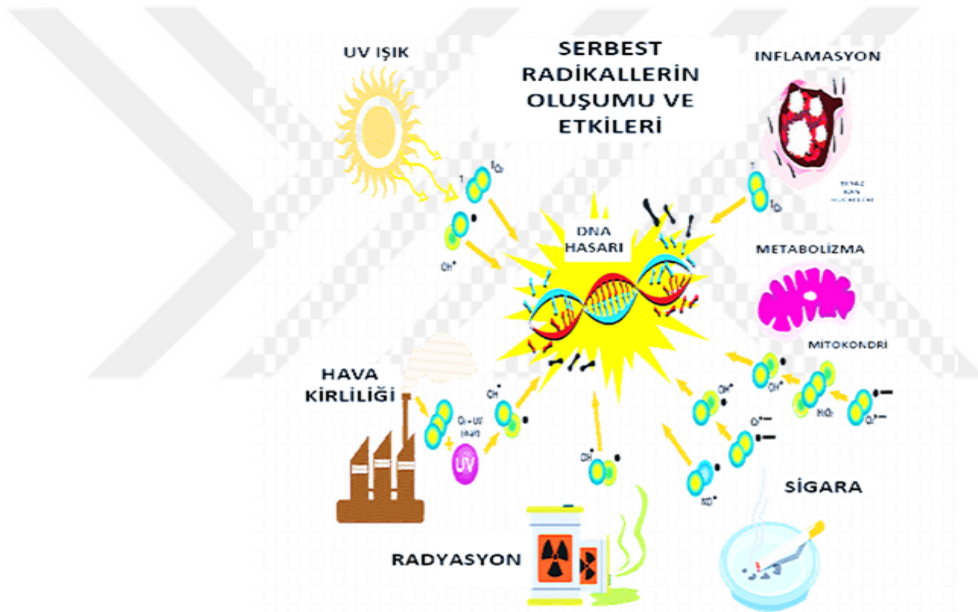
Aile Öyküsü / Genetik Eğilim; Pek çok kanserde olduğu gibi meme kanserinde de genetik eğilim hastalığa yakalanma riskinde önemli bir yer tutar. Meme kanserinde aile öyküsü bulunan kişilerde kansere yakalanma oranı yaklaşık %10'dur (Shiovitz ve Korde, 2015). Aile öyküsü bulunan bireylerde birinci derece akrabalık söz konusu ise bu bireylerde erken başlangıçlı (35 yaşından önce) meme kanseri görülme olasılığı oldukça yüksektir (Harbeck vd., 2019).

Ekstrinsik Faktörler ise; başta beslenme, yaşam tarzı, çeşitli zararlı ışınlar ve enfeksiyon gibi vücuda dış yollardan etkisi olan çevresel faktörlerin tümüdür. Sigara, alkol, yanlış beslenme, arsenik gibi bazı ağır metallerin vücuda alınımı, asbestos, radon vb faktörler zaman içerisinde hücrelerde genetik birtakım değişikliklere sebep olmaktadır (Vineis ve Wild, 2014). Bu gibi çevresel faktörlerin organizmada zamanla meydana getirdiği tümörleşmeler pek çok kanser türünün temelini oluşturmaktadır (Rappaport, 2012).

Rektif Oksijen Türleri (ROS)

ROS; oksijenin kısmi indirgenmiş metbolitleri olarak tanımlanmaktadır. İnsan vücudunda doğal süreçler içerisinde sürekli olarak serbest radikaller meydana gelir. Serbest radikaller; belirli bir düzeyin üzerine çıktığında kararsız kimyasal yapıları nedeniyle sağlıklı hücrelere zarar vererek kanser, diyabet, alzheimer, kalp hastalıkları gibi çeşitli hastalıklara yakalanma riskini artırır. Serbest radikallerin artışı ile gelişen bu durum, oksidatif stres olarak da adlandırılır. ROS'nin en önemli özelliği güçlü oksitleme işlevine sahip olmasıdır. Reaktif Oksijen Türleri radikal olanlar ve radikal olmayanlar olarak temelde iki sınıfa ayrılmaktadır. Radikal olanlar başlıca süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$), nitrik oksit (NO), alkoksil radikalleri ($RO^{\cdot}$) ve peroksil radikalleri iken radikal olmayanlar ise hidrojen peroksit (H_2O_2), organik hidroperoksitler ve hipoklorit'tir (Ayhancı ve Gültekin, 2008). ROS organizmada hücre proliferasyonu, farklılaşmayı, hayatta kalmayı ve hatta apoptoz süreçlerini düzenleyebilir. Ancak oldukça aktif olan ROS'lar, hücre içi lipitleri, proteinleri ve deoksiribonükleik asidi okside edebilir,

bulunduğu hücre ve dokulara saldırabilir ve böylece hasarlı biyolojik moleküllerin birikmesine yol açar (Ray, Huang, ve Tsuji, 2012). Organizmada gerçekleşen çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ROS'ların miktarı canlılar için çok önemlidir. ROS miktarındaki artış canlı için pek çok hastalığın başlangıcını oluşturabilir. ROS ile antioksidan sistem arasında bir denge mevcuttur ve bu dengenin ROS lehine bozulması sonucunda birçok hastalığın temeli atılmış olur (Thannickal ve Fanburg, 2000). Metabolizmada meydana gelen bir seri iletim ve üretim sonucunda organizma canlılığını sürdürebilmektedir. Metabolik olarak aktif olan hücrelerde ROS üretimi de artmaktadır. Artan ROS'u dengeleyebilmek için organizma, gerekli miktarda antioksidanları üretmektedir.



Şekil 1. 9. Serbest radikallerin etkileri.

Süperoksit (O_2^-) Radikali; Reaktif oksijen türlerinden olan süperoksit, doğada yaygın olarak meydana gelen moleküler oksijen (O_2)'nin tek elektronlu indirgenmesinin ürünü olarak özellikle önemlidir (Sawyer ve Valentine, 1981) . Normal hücresel koşullar altında süperoksit anyonları enzimatik olarak kolayca hidrojen peroksitlere dönüştürülür. Süperoksit radikali oldukça aktif bir radikaldır ve organizmada önemli hasarlara sebep olduğu bilinmektedir (Rapoport, Hanukoglu, ve Sklan, 1994) .

Hidrojen Peroksit (H_2O_2); H_2O_2 bir serbest radikal olmamasına rağmen, hücrelerde üretilen hidroksil radikallerinin ana kaynağı olan Fenton Reaksiyonu ile demir veya bakır gibi bir geçiş katyonunun varlığında en reaktif serbest radikal olan hidroksil radikalının ana katkı sağlayıcısıdır. Hidrojen peroksit reaktif bir oksijen türüdür ve oksijen-oksijen

tek bağına sahip bir bileşik olan en basit peroksittir. Hidrojen peroksit insan vücudu da dahil olmak üzere biyolojik sistemlerde bulunur. Hidrojen peroksiti kullanan veya ayrıştıran enzimler peroksidazlar olarak sınıflandırılır. Kimyasal açıdan H_2O_2 zayıf reaktiftir: hafif bir oksitleyici veya hafif bir indirgeyici ajan olarak hareket edebilir, ancak lipidler, DNA ve proteinler de dahil olmak üzere çoğu biyolojik molekülü kolayca oksitlemez (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Hampton ve Orrenius, 1997). H_2O_2 'nin tehlikesi büyük ölçüde, ultraviyole ışığa maruz kalması sonucu gelişigüzel reaktif hidroksil radikaline dönüşmesinden kaynaklanmaktadır (Ueda, Saito, Shimazu, ve Ozawa, 1996).

Hidroksil (OH $\cdot$) Radikali; Reaktif oksijen türlerindendir. Hidroksil radikali, her türlü biyolojik makromolekül ile çok reaktif olduğundan ve hücre metabolizması tarafından yenilenemeyen ürünler ürettiğinden, kısmen indirgenmiş oksijen türlerinin toksisitesinde baş aktör olarak kabul edilir. Hücre içi metabolizmaya ek olarak, düşük dalga boylu elektromanyetik radyasyon (örn. gama ışınları) vücuttaki suyu bölerek bu radikali oluşturabilir. Bu korkunç derecede reaktif radikal, bir kez üretildikten sonra yanında ne varsa ona saldırır. Hidroksil radikali olduğu yerde reaksiyona girerek genellikle serbest radikal zincir reaksiyonlarını yaydığı için *in vivo* ömrü yok denecek kadar azdır. Singlet oksijen, peroksi nitratlar ve nitrik oksit hücrelerde sürekli olarak üretilen diğer serbest radikallerdir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Kanser ve ROS İlişkisi

Organizmadaki ROS miktarı normal hücre döngüsü süreci de dahil olmak üzere birçok sürecin düzenlenmesinde önemli bir etkidir. Hücresel proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalma ve apoptoz gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesinde ROS rol oynar (Ray vd., 2012). ROS miktarı olması gereken miktarın üzerine çıktığında, yüksek ROS seviyeleri tümör oluşumunu başlatabilir hatta tümörün ilerlemesine neden olabilir (Canli vd., 2017). Aşırı ROS, gen mutasyonlarına neden olur ve p53 gibi tümör baskılayıcı genleri inhibe ederek kanserin başlamasına yol açar (Jackson, 1994). Ayrıca, yüksek ROS seviyelerinin, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) yoluyla tümör invazyonunu ve metastazını indüklediği de bilinmektedir (Jiang vd., 2017).

Yüksek ROS seviyelerinin onkogenik olduğu, DNA, protein ve lipitlere zarar verdiği, genetik düzensizliği ve tümörigenezi teşvik ettiği düşünülmektedir (Liou ve Storz, 2010;

K. Roy vd., 2015). Antioksidan savunmanın ana işlevi aşırı ROS birikimini önlemek ve indirgeme-oksidasyon (redoks) dengesini korumaktır (Gorrini, Harris, ve Mak, 2013). ROS üretimi, kanserde genomik kararsızlığa ve DNA hasarına katkıda bulunur; bu da ilaç tedavisine direnç ve yüksek nüks insidansı gibi önemli etkilere sahiptir (Pelicano, Carney, ve Huang, 2004). Bununla birlikte, kanserlerdeki toksik seviyelerde ROS üretimi anti-tümörijeniktir ve oksidatif stresin artmasına ve tümör hücresi ölümünün indüklenmesine neden olur (Nogueira vd., 2008; Storz, 2005; Trachootham vd., 2006). Bu nedenle, ROS'u ortadan kaldırmak veya ROS üretimini artırmak için kullanılan tedaviler, oldukça zorlu bir kavram olmasına rağmen potansiyel olarak etkili kanser tedavilerinde yer alabilir.

ROS'un savunma mekanizmalarının bir parçası olarak fagositik hücrelerde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca hücre sinyalizasyonu ve düzenlenmesi, sinyal kaskadlarının aktivasyonu ve apoptoz gibi fonksiyonlarda (tüm hücre tiplerinde) daha geniş bir role sahip olduğu da bilinmektedir (Wang vd., 2021).

Büyüme faktörleri ve K-Ras tarafından uyarılan yolların kanserde MAPK1/ERK2 'yi aktive ettiği ve bunun hücre proliferasyonunun artmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Khavari ve Rinn, 2007). H_2O_2 meme tümör hücrelerinde östrojen metabolizmasının bir yan ürünü olarak üretilir ve ERK sinyal yolunun aktivasyonundan sorumludur, bu da proliferasyonun artmasına (Irani vd., 1997; Reddy ve Glaros, 2007) ve pro-survival PI3K/Akt sinyal yolunun aktivasyonuna neden olur (Burdick vd., 2003; Park, Na, Kim, Cha, ve Surh, 2009). ERK'nin proliferasyon dışında başka rolleri de vardır. Meme, lösemi, melanom ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde hücre sağkalımı, bulunduğu dokudan bağımsız büyüme ve hareketlilikte rolü vardır (McCubrey vd., 2007; Steelman vd., 2008). Hücre sağkalımında ROS fonksiyonunun düzenlenmesi hücreye özgüdür (Chan vd., 2008; Lee vd., 2005).

Akt yolu, apoptotik Bad, Bax, Bim ve Foxo transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere hedef proteinlerinin fosforilasyonu ve inaktivasyonu yoluyla hücre sağkalımında işlev görür (Brunet vd., 1999; Pastorino, Tafani, ve Farber, 1999; Qi, Wildey, ve Howe, 2006). Epitelyal büyüme faktörü kaynaklı H_2O_2 üretiminin yumurtalık kanserinde Akt'yi aktive ettiği gösterilmiştir (Liu vd., 2006). H_2O_2 , PI3K/Akt sinyalizasyonunun negatif düzenleyicileri olan PTEN ve PTP1B fosfatazlarını oksitleyerek ve inaktive ederek etki eder ve hücre sağkalımına neden olur (Salmeen vd., 2003). PTEN'in inaktivasyonu meme,

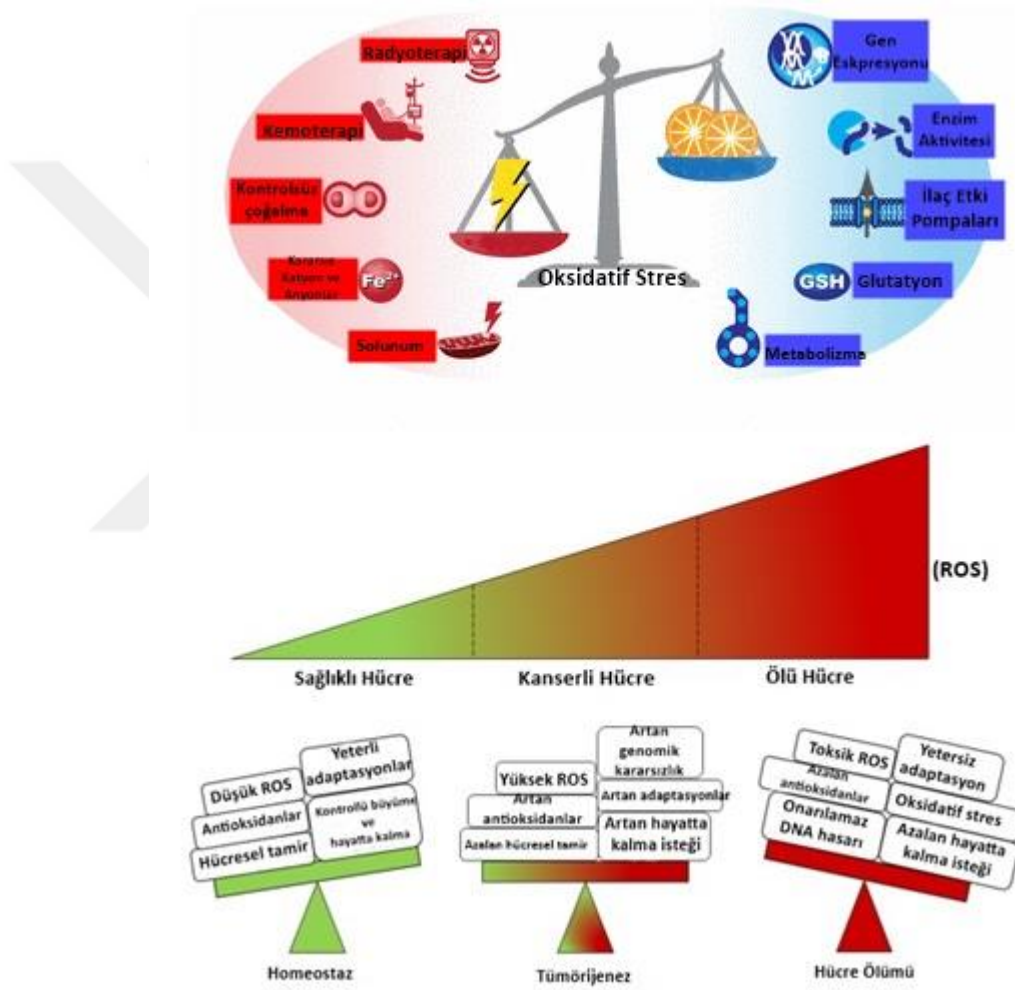
endometrial kanserler, glioblastomlar, melanom ve prostat kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde sıklıkla görülmektedir (H. Wu, Goel, ve Haluska, 2003).

Hücrelerdeki toksik ROS seviyelerinin hücre döngüsünün durmasına, apoptozise ve yaşlanmaya neden olduğu bilinmektedir (Moon vd., 2010). ROS'un aşırı üretimi, Bcl-2 protein ailesi ve sitokrom c dahil olmak üzere apoptotik efektörlerin aktivitesini de etkileyebilir (Groeger, Quiney, ve Cotter, 2009). Mitokondriyal ETC'den artan $O_2^{\cdot-}$ üretimi mitokondriyal membrana zarar vererek sitokrom c'nin membrandan sitozole salınmasına ve translokasyonuna neden olur ve bu da kaspazdan bağımsız ve kaspaza bağlı sitozolik sinyal olaylarını tetikler (Gerasimenko vd., 2002; Ryter vd., 2007). Sitokrom c, apoptotik protein aktive edici faktör 1 (Apaf-1) ile bir kompleks oluşturur ve pro-kaspaz 9'un aktivasyonu ile kaspaz-3 ve 7'nin bölünmesini indükler (Susin vd., 1999). Mitokondriden sitokrom c'nin önemli ölçüde salınması sonucunda, mitokondriyal ETC bozulacak ve hasar görecektir, ardından ROS üretiminin daha da artmasına neden olacaktır (Chen ve Lesnefsky, 2006). Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-w ve Bcl-xL) ve apoptotik (Bad, Bak, Bax, Bid ve Bim) üyeleri, mitokondriyal membran permeabilizasyonu ve apoptotik sinyalizasyonda önemli rollere sahiptir (Kelekar ve Thompson, 1998). ROS kaynaklı apoptoz, GSH seviyelerinin azalması ve redoks dengesinin bozulması ile ilişkilidir (Merad-Boudia vd., 1998). Azalan GSH seviyeleri, ROS'un indüklediği GSH oksidasyonunun bir sonucudur ve yüksek ROS üretimini artırır (D'Alessio vd., 2003).

ROS'un anti-tümörijenik sinyalizasyonu, ROS seviyelerinin toksik seviyelere yükselmesi ve antioksidan sistem kapasitesinin tükenmesi ile programlanmış hücre ölümüne neden olarak kanserde bir terapi olarak hedeflenebilir. Kemoterapi kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve ROS üretimini artırarak onarılamaz hasara ve hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Kullanılan kemoterapi ilaçlarına örnek olarak antrasiklinler, sisplatin, bleomisin, arsenik trioksit verilebilir. Tümör hücrelerinde ROS üretiminin engellenmesi, pro-tümörijenik sinyallerin baskılanmasıyla sonuçlanabilir. ROS seviyelerindeki azalma, hücre sağkalımının ve çoğalmasının azalmasına, daha az metabolik adaptasyona ve daha düşük DNA hasarı ve genetik istikrarsızlık seviyelerine yol açacaktır (Pelicano vd., 2004).

Antioksidanlarla tedavinin kanserde ROS üretimini süpürücü sistemler aracılığıyla azalttığı düşünülmektedir. Çalışmalar, antioksidan SOD3'ün aşırı ekspresyonunun *in vivo*

meme kanseri metastazını azalttığını ve antioksidanların kanser tedavisinde ROS'un azaltılmasında rol oynadığını göstermiştir (Teoh-Fitzgerald vd., 2014). Bununla birlikte, antioksidanlar kanser insidansının artmasıyla da ilişkilendirilmiştir. A ve E vitamini ve ayrıca karoten kanser riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Klein vd., 2012; Omenn vd., 1996). Bu karışık sonuçlar, kanser tedavisinde antioksidanların karmaşıklığını göstermektedir.



Şekil 1. 10. Oksidatif stresi düzenleyen araçlar, koruyucu mekanizmalar ve oksidatif denge (Moloney ve Cotter, 2018’den revize edilmiştir).

ROS’lar bu nedenlerle kanser, alzheimer, sepsis, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde yer almıştır. ROS miktarının sağlıklı hücrelerde denge halinde olması beklenirken kanserli hücrelerde bu dengenin ROS lehine olması, kanserli hücrelerin apoptoza yönelimini artıracaktır. Kanser hücrelerinin apoptoza yöneliminin önemli olduğu kadar hücrelerin proliferasyon, büyüme ve yaşamsal

faaliyetlerini sürdürmeye devam etmesini sağlayan PI3K/AKT sinyal yolağının da inhibe edilmesi oldukça önemlidir.

PI3K/mTOR/AKT Sinyal Yolağı

PI3K/mTOR/AKT sinyal yolağı, hücre proliferasyon, büyüme, yaşamsal faaliyetlerini sürdürme ve apoptoz süreçlerinde önemli görev yapmaktadır (Mogi vd., 2008; Nicholson ve Anderson, 2002).

PI3K'nın aktive edilebileceği üç farklı yol vardır (Nicholson ve Anderson, 2002):

- G proteinleri tarafından aktive edilebilirler,
- Reseptör tirozin kinazlar tarafından aktive edilebilirler,
- Küçük GTPa tarafından aktive edilebilirler,

PI3K (Fosfoinositid-3 Kinaz veya Fosfatidilinasitol-3 Kinaz), kinaz ailesine mensup bir proteindir. Kinazlar, lipid moleküllerini fosforile eden enzimlerdir. Lipidlerin fosforilasyonunu yaparak bu yapılara madde giriş-çıkışının gerçekleştirilmesini sağlarlar. Kinazlar fosfatlama görevi yaparlar ve bu sayede bu yolda bir seri aktivasyon işlemi gerçekleştirilir. İşlevlerine göre PI3K'lar 3 farklı sınıfa ayrılmaktadırlar (Costa, Han, ve Gradishar, 2018; Vanhaesebroeck, Guillermet-Guibert, Graupera, ve Bilanges, 2010).

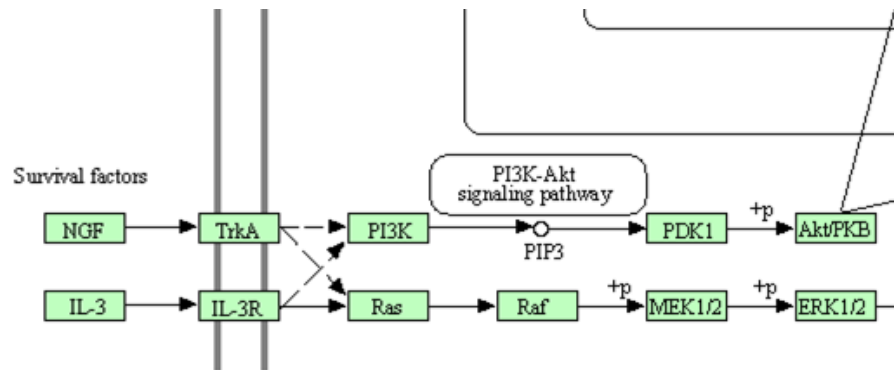
- **1.Sınıf PI3K'lar;** katalitik bir alt birimi olan p110 ve düzenleyici bir alt birim olan p85'den oluşmaktadır. PI3K yolunun aktive/deaktive olmasından sorumludurlar.
- **2.Sınıf PI3K'lar;** görevleri fosfatidilinositoller 4 fosfata kadar fosfatlayabilmektir ancak bu görevinin dışında literatürde pek bir bilgi bulunmamaktadır.
- **3.Sınıf PI3K'lar;** oldukça spesifikler sadece yapısal olarak fosfatidilinositollerle reaksiyona girerler.

PI3K'nın sınıflarının her birinin substratları birbirinden farklıdır çünkü her birinin yolağı üzerindeki görevleri birbirinden farklıdır. PI3K, kendi içerisinde 2 alt birimden meydana gelir. İlki katalitik alt birim p110 ikincisi ise düzenleyici alt birim olan p85'tir. PI3K, hücre yüzeyinde bulunan Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK) aracılığıyla aktifleştirilirler. Hücre membranında bulunan RTK'ların bir araya gelmesiyle hücre içinde

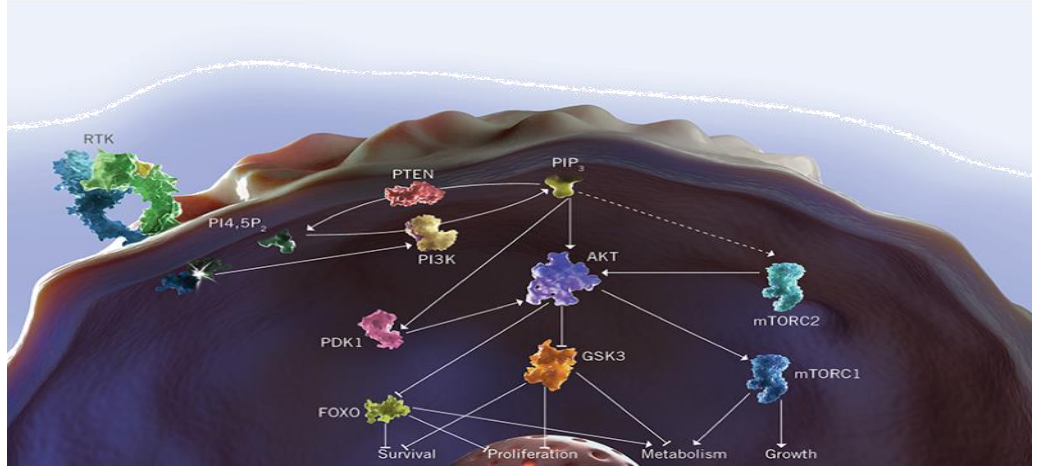
PIP2(fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat), meydana gelir. PIP2, ortamda bulunan PI3K'lar tarafından fosfatlanarak PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat)'ı meydana getirir. PIP3'ler de yolağın en önemli bileşenlerinden olan AKT (Protein Kinaz B)'yi aktive eder (Costa vd., 2018; Nicholson ve Anderson, 2002; Vanhaesebroeck vd., 2010).

Yolakta en önemli noktaları AKT ve mTOR oluşturmaktadır. PI3K/ AKT/ mTOR yolağının kavşak noktası olarak nitelendirilen AKT'nin rolü, yolağın çalışıp çalışmadığını belirlemektir. AKT; metabolizma, apoptoz, hücre döngüsü kontrolü, anjiyogenez, farklılaşma ve hücre büyümesi ve proliferasyonu dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçle ilgili çoklu sinyal yollarında yer alır. Memelilerde üç Akt izoformu (Akt1/PKC α , Akt2/PKB β ve Akt3/PKB γ) mevcuttur. Bu izoformlar yüksek derecede homoloji sergilerler, ancak düzenleyici fosforilasyon bölgelerinin lokalizasyonunda biraz farklılık gösterirler. Çünkü her bir AKT formu, üç farklı sınıfta yer alan PI3K'lar ile etkileşime girerek, farklı görevler sergilerler.

- Akt1, organizmada birçok dokuda bulunan ve büyüme, hayatta kalma, embriyonik gelişim ve adiposit farklılaşmasında baskın bir role sahip olduğu düşünülen baskın izoformdur.
- Akt2, glikoz homeostazının düzenlenmesi ile ilişkilidir ve insüline yanıt veren dokularda eksprese edilen baskın bir diğer izoformdur.
- Akt3 beyin dokusunda bol miktarda bulunur. AKT'nin aktivasyonu hem plazma zarına translokasyonunu hem de sırasıyla PDK1 ve TORC2 kompleksi tarafından fosforilasyonu gerektiren düzenleyici bir mekanizmaya bağlıdır (Cantrell, 2001; Huck ve Mochalkin, 2017).



Şekil 1. 11. PI3K-AKT sinyal yolağı (KEGGPATHWAY, 2023).



Şekil 1. 12. PI3K-AKT sinyal yolağı aşağı akış sistematığı (www.medikaynak.com'dan alınmıştır.)

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun önemli bir diğer hedef proteini de mTOR'dur. Yolağın düzenleyicisi olan mTOR, besin düzeyini kontrol etmenin yanı sıra hücre döngüsü esnasında G1 fazından S fazına geçişi de sağlamaktadır. Besin düzeyinde bir yetersizlik söz konusu olduğunda mTOR aktivitesi baskılanmaktadır (Bader vd., 2005; Costa vd., 2018).

PI3K/AKT/mTOR yolağı translasyonel kontroldür. Aşırı bölünmek isteyen kanser hücreleri için bu yolun aşırı aktivasyonu, kanserli hücrelerin çoğalmaları için gereklidir. Bu nedenle bu yolağın inhibe edilmesi kanser çalışmaları için elzemdir.

Kanser ve Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanserdir ve akciğer kanserinden sonra kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (DeSantis vd., 2019; Sung vd., 2021). Bu sebepler, kanserin erken tanı, tarama, tedavi, beslenme, önleyici/koruyucu müdahalelerin geliştirilmesi ve uygulanabilmesi adına birçok bilimsel çalışma yapılmakta ve kanserle mücadele önemli bir ilgi alanı olmaktadır. Kanser, tanıdan tedaviye kadar olan süreçte oldukça zorlu ve masraflı bir hastalıktır. Uygulanan tedavi/tedaviler genellikle pek çok ciddi yan etkiyi de tetiklemektedir. Kanser, uzun süren tedavi ve bakım süreci gerektirdiğinden kişiler hem ekonomik hem de psikolojik olarak olumsuz etkilenmektedir.

Kanser tedavi uygulamaları hastaya, kanserin türüne ve evresine bağlı olarak değişiklik göstermekte olsa da üç genel başlık altında toplanabilir:

- 1) Cerrahi Operasyon: Tümörlerin vücuttan çıkarılabilir olmasına bağlı olarak uygulanan bir yöntemdir. Hastaya ve tümörün durumuna bakılarak tümörün bazen bir kısmı veya tamamı alınabilmekte, ayrıca operasyon öncesi veya sonrası kemoterapi ya da radyoterapi de uygulanabilmektedir (Siegel vd., 2012).
- 2) Radyoterapi: Yüksek enerjili ışınlar verilerek kanserli hücreleri küçültme ve yok etmeyi hedefleyen radyasyon tedavisi de bir diğer yöntemdir. Kemoterapi ile beraber de uygulanabilmektedir (Zeman, 2016).
- 3) Kemoterapi: Kemoterapötik ilaçlar kullanılarak uygulanan tedavi yöntemidir. Oral yolla veya damardan ilaç verilerek ilacın hem kanserli hücrelere hem de metastatik hücrelere ulaşması sağlanabilmektedir (DeVita Jr ve Chu, 2008). Kanser tipine ve evresine göre hastalığı tedavi etmek, tümörün yayılımını önlemek, büyümesini yavaşlatmak, başladığı organdan vücudun diğer kısımlarına metastaz yapan kanser hücrelerini inhibe etmek amacıyla kemoterapi uygulanır ve bazı durumlarda kemoterapi tek tedavi seçeneğidir (DeVita Jr ve Chu, 2008).

Bu tedavilere ek olarak uygulanan diğer tedaviler ise şu şekildedir;

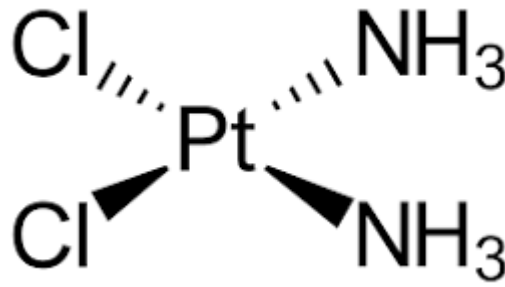
- Hormonal Terapi: Tedavide hormonların kullanıldığı bir başka yöntemdir. Genellikle meme veya prostat kanseri tedavilerinde kullanılmaktadır (Drăgănescu ve Carmocan, 2017).
- Kök Hücre Tedavisi: Kemik iliği transplantasyonu olarak da bilinen bu yöntem daha çok lösemi hastalarında kullanılmaktadır (Abraham ve Staffurth, 2016).
- İmmünoterapi: Son yıllarda uygulanan bir tedavi yöntemidir. Hastaların kendi immün sistem hücrelerini kanser hücreleri ile savaşabilir şekilde eğitmek amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir (Rosenberg, Yang, ve Restifo, 2004).

Kemoterapötik İlaçlar

Günümüzde çeşitli kanser hastalarında en yaygın kullanılan kemoterapi ilaçları arasında sisplatin, doksorubisin, dosetaksel ve mitaksantron bulunmaktadır. Sisplatin, kanseri tedavi etmek için kemoterapide kullanılan bir ilaçtır. Molekül Dünya Sağlık Örgütü'nün Temel İlaçlar Listesi'nde yer almaktadır.

Sisplatin, hızlı bir şekilde enzimatik değişime uğrayarak aktif olmayan metabolitlerine dönüşebilmektedir ve hücreler içerisinde DNA çift zincirinde çapraz bağlanma

yapmaktadır. Trans konumunda iken etkisiz halde olan molekül, içinde bulunan platin'in, iki farklı pozisyonda DNA'ya bağlanıp DNA replikasyonunu bloke eder ve böylece hücreleri apoptosise yönlendirerek çoğalmalarını durdurur. Fakat bazı durumlarda kanserli hücreler apoptosisin engellenmesi ve DNA onarımının artması gibi yollara başvurarak sisplatine direnç gösterebilmektedir bu gibi durumlarda, paclitaxel adlı ilaç ile birlikte kombinasyon tedavisi önerilir. Başlıca yan etkileri koku duyarlılığı, halsizlik ve iştahsızlıktır (Aldossary, 2019). Sisplatin, cerrahi müdahale ve/veya radyoterapi gibi lokal tedavilere cevap vermeyen tranzisyonel hücre mesane kanseri olan hastalarda tek ajan olarak kullanılmaktadır. Bu ilaca veya diğer platin içeren bileşiklere karşı ciddi hassasiyeti olduğu belirlenen hastalarda, böbrek yetmezliği veya işitme kaybı olan hastalarda, omurilik baskılaması (miyelosüpresyon) olan hastalarda, sisplatin kullanılmamaktadır (Aldossary, 2019).



Şekil 1. 13. Sisplatin yapısı (Dasari ve Tchounwou, 2014).

Doksorubisin'in etki mekanizması karmaşık olmakla beraber DNA ile etkileştiği düşünülmektedir (Rossi, 2006). Hücrede transkripsiyon esnasında DNA'nın açılmasını sağlayan Topoizomeraz II enziminin ilerlemesi engellenir. Doksorubisin, DNA transkripsiyonu esnasında topoizomeraz II'nin DNA'yı kesmesinin ardından meydana gelen topoizomeraz-DNA kompleksini stabilize ederek DNA ikili sarmalının tekrar birleşmesini engeller ve böylece DNA eşleşmesini durdurur (Thorn vd., 2011). Doksorubisin'in akut yan etkileri arasında; mide bulanması, kusma ve kalp düzensizliğinin yanı sıra nötropenia (akyuvarlarda azalma) ve kellik de görülebilmektedir. Kümülatif doksorubisin dozu 550 mg/m²'ye ulaştığında kardiyak yan etkiler (kalp yetmezliği, kardiyomiyopati ve ölüm) önemli miktarda arttığı, ancak bu kardiotoksisitenin mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonda dozla orantılı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (Epstein, 2007). Doksorubisin kardiotoksisitesi mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonda dozla orantılı bir azalma ile karakterizedir. Doksorubisin ve

(Emami vd., 2021). Kemoterapi esnasında kanserli hücrelerin öldürülmesinin yanı sıra ilacın tüm vücuda kan yoluyla taşınması neticesinde büyümeye ve bölünmeye devam eden sağlıklı hücreleri de olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Ancak uygulanan tedaviler genellikle pek çok ciddi yan etkiye de sebep olabilmektedir. Literatürde kemoterapinin neden olduğu bazı yan etkilerin zaman geçtikçe ortaya çıkabileceği ve yan etkilerin görülmesinde bireyden bireye farklılıklar olduğu belirtilmektedir (Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2011). Kemoterapi ile tedavi, hastaların bünyelerinde; deri bütünlüğünde bozulma, saç dökülmesi, anemi, trombositopeni, nötropeni, stomatit, diyare, kabızlık, bulantı-kusma, iştahsızlık, ağrı, anksiyete ve depresyon gibi yaşam kalitesini negatif yönde etkileyen problemlere sebep olur (Bektaş ve Akdemir, 2009; Onal vd., 2020).

Bu nedenlerden dolayı yeni kemoterapötik çalışmalarda yan etkisi az olan, aynı zamanda yüksek antikanser potansiyele sahip, kanser hücreleri üzerinde spesifik antikanser etki gösterebilecek ajanların belirlenmesi ve geliştirilmesi önem kazanmıştır (Atashzar vd., 2020; Supuran, 2016).

Meme Kanseri Tedavisinde Doğal Ürün Yaklaşımı

Kanserin çağımız hastalıklarından biri olması ve her geçen gün kanser teşhisinin de artması dolayısıyla bilim insanları yan etkisi daha az olan kemoterapötik ajanlar keşfetme ve geliştirmeye önem vermektedir (Temel, 2015). Mevcut kullanımda olan antikanser ilaçlarının %60'ından fazlası; bitki, bakteri, mantar veya deniz organizmaları gibi doğal kaynaklardan elde edilen ürünlerden geliştirilmiştir (Mondal vd., 2012).

1981 ve 2014 yılları arasında dünya çapında 136 antikanser ilacı kullanıma sunulmuştur ve bunların neredeyse %83'ü ya bitkisel bileşikler ya da bunların türevleri olduğu bilinmektedir (Amaral vd., 2019). Vinkristin, vinblastin, paklitaksel ve dosetaksel dahil olmak üzere bir dizi antikanser ilacı meme kanserinin tedavisi için halihazırda kullanılmaktadır (Zyad vd., 2018). Bitkiler, geçmişten günümüze insanoğlunun sağlık ihtiyaçlarına hizmet eden geleneksel Çin ilaçları gibi geleneksel tıp sistemlerinin temelini oluşturmuştur. Gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerdeki nüfusun büyük bir kısmı, birincil sağlık sorunlarını tedavi etmek için bitkisel ilaçlara güvenmektedir. Geleneksel tıbbi bitkilerden elde edilen ilaçlar, maliyet etkinlikleri, bollukları ve yan etkilerinin az olması veya hiç olmaması gibi sebeplerden dolayı oldukça popüler bir hal almıştır. Son yıllarda, geleneksel olarak kullanılan tıbbi bitkilerden ilaç benzeri maddeleri bulmak için

bitki araştırmalarında küresel çapta önemli bir artış söz konusudur. Ayrıca, kurkumin, resveratrol, kersetin gibi doğal olarak oluşan birkaç bitki bazlı bileşik, umut verici antikanser etkiler göstermiştir ve adjuvan kemoterapötik ajan olarak ilgi kazanmaya devam etmektedir. Ayrıca, doğal olarak oluşan bileşikler, sağlıklı hücrelere daha az toksisiteye neden olur ve bazı durumlarda anormal veya hastalıklı hücrelere karşı seçici toksisite gösterir (Yuan vd., 2016). Bugün pazarlanan çok sayıda ilacın yapısal olarak doğal bir şekilde oluşan bileşiklerin yapısına benzemesinin nedeni bu olabilir. Birçok araştırımcı, mevcut ilaçların antikanser aktivitesini arttırdığı için bitkisel bileşiklerin terapötik bir modalitede kullanılabileceğini öne sürmüştür (Yuan vd., 2016). Bitkilerin tüm bu özelliklerinin yanı sıra son yıllarda tıbbi bitkiler olarak sınıflandırılan bitkilerin özellikle kanser çalışmalarında tek başına kullanımından ziyade halihazırda kemoterapi ilacı olarak kullanılan birçok ilaç ile birlikte kombine halde uygulamaları artış göstermektedir. Sinerjik etki olarak adlandırılan bu durum kemoterapötik ajanların olumsuz yan etkilerini oldukça minimize ettiği de yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (M. Roy vd., 2011; Yu vd., 2007).

Ünlü bir antikanser bitki sekonder metaboliti olan kurkumin, kanser hücrelerini ilaçlara karşı daha canlı hale getiren kemoterapötik ilaçlardan siklofosfamid ve paklitaksel ile birlikte uygulandığında meme kanseri belirteçlerinin ekspresyonunu *in vivo* ve *in vitro* olarak aşağı regüle ettiği bilinmektedir (M. Roy vd., 2011; Zhan vd., 2014). Benzer şekilde, ginsenositlerin bir metaboliti olan 20S-protopanaxadiol, tamoksifen ile kombinasyon halinde kullanıldığında östrojenik gen ekspresyonuna müdahale ederek MCF-7 hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca, bu kombinasyon tamoksifenin sitotoksitesini ER'den bağımsız bir şekilde asinerjik olarak da iyileştirmiştir (Yu vd., 2007). Bu ve benzeri nedenlerle, bitkisel bileşiklerin sinerjistik terapidaki faydaları dikkate değerdir ve bu durum, meme kanseri tedavisinde kemoterapötik ilaç direncinin ve toksisite gibi problemlerin üstesinden gelmeye yardımcı olabilir. Bununla birlikte, sentetik antikanser ilaçların uzun süreli kullanımı, bu ilaçların normal hücrelerdeki toksik etkisinden kaynaklanan çeşitli sağlık riskleri veya yan etkileri ile bağlantılıdır.

Bitkisel bileşiklerle kemoprevensiyon büyük ilgi görmektedir. Kanser kontrolü ve yönetimi için ucuz, kolaylıkla uygulanabilen, kabul edilebilir ve erişilebilir bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Singh, Gupta, ve Pathak, 2020). Bitkisel ilaçlar meme kanseri

ve ilişkili terapötik toksisite yönetiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bitkisel ürünlerin ve kemoterapinin birlikte kullanımı, meme kanserini tedavi etmenin etkili ve uygun maliyetli bir yolu olabileceği düşünülmektedir. Bu tür adjuvan tedavinin, ilaç toksisitesini azaltan, ilaç direncini baskılayan ve tedavinin kalitesini arttıran hızlı ilaç etkisi sağlayan sinerjistik bir antikanser etkisi ürettiği kanıtlanmıştır (Montemurro, Nuzzolese, ve Ponzzone, 2020). Vinblastin, vinkristin, taksoller vb. gibi bitki kaynaklı antikanser ilaçlar, şu anda meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlara benzer şekilde bir potansiyel göstermiştir ve bunların büyük bir kısmı preklinik veya klinik deneylerdedir. Son on yılda, *in vivo* ve *in vitro* meme kanseri modellerinde cesaret verici antikanser aktivite gösteren çok sayıda fitokimyasal tanımlanmıştır (Dhyani vd., 2022; González-Burgos ve Gómez-Serranillos, 2021).

Doğal ürünler, doğada kendiliğinden yetişmesi ve kolay ulaşılabilir olması, birçok doğal ürünün halk arasında yüzyıllardır çeşitli tedavilerde kullanılması ve nispeten güvenilir olmasıyla avantaj sağlamaktadır. Yukarıda belirtildiği gibi pek çok biyolojik aktivite sergiledikleri bilinmektedir ancak, hâlâ yeterince araştırılmamış pek çok doğal kaynak bulunmaktadır. Bunlar arasında özellikle son yıllarda kanser tedavisinde yeni kemoterapötik ajan olarak kullanılabileceği yönünde sınırlı sayıda çalışma bulunmasına rağmen likenler de bu gruba dahil edilmektedir (Ozgencli vd., 2018).

Likenler ve Liken Asitleri

Mantarların ve alglerin simbiyotik birlikteliğinden meydana gelmiş, morfolojik ve fizyolojik birlikler, liken olarak tanımlanmaktadır (Kalın, 2022). Likenler Dünya üzerinde pek çok farklı iklim şartlarında ve tüm karasal habitatlarda yaşayabildikleri için genel liken simbiyozu çok başarılıdır (Nash, 1996). Liken maddeleri, primer metabolitler (intraselüler) ve sekonder metabolitler (ekstraselüler) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Likenlerde büyük oranda organik bileşikler bulunmaktadır. Bu organik bileşiklerin büyük bir bölümünü, mantar hücresi içerisinde veya hiflerin yüzeyinde depolanan sekonder metabolitler oluşturmaktadır. Bilinen liken bileşikleri; amino asit türevleri, şeker alkolleri, alifatik asitler, makrolitik laktonlar, monosiklik aromatik bileşikler, kininler, kromonlar, ksantonlar, dibenzofuranlar, depsidler, depsidonlar, depsonlar, terpenoidler, steroidler, karotenoidler ve difenil eterler dahil olmak üzere birçok bileşik sınıfını içermektedir (Calcott vd., 2018). Bu bileşikler genelde suda çözünmezken, organik çözücülerle ekstre edilebilirler (Nash, 1996). Sekonder metabolitler; antiviral,

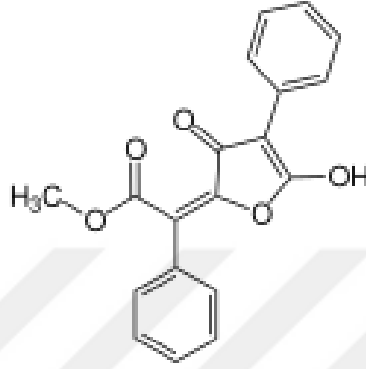
antibakteriyel, antifungal, antiprotozoal, antiherbivor, mutajen, antioksidan, antitümör, anti-ülserojenik, ateş düşürücü ve anti-inflamatuar gibi önemli birçok biyolojik etkilere sahiptirler (Mitrović vd., 2011). Bugüne kadar, 1000'den fazla liken sekonder metaboliti rapor edilmiştir (Calcott vd., 2018). Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de tıbbi açıdan önemli, farmasötik özelliği olan bitkiler halk arasında yüzyıllardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Baytop, 1999). Bilinen etnobotanik bitkilerin yanı sıra likenler de bu amaçla kullanılmaktadır. Bu kapsamda liken sekonder metabolitlerinin büyük çoğunluğunun henüz keşfedilmemiş olması, keşfedilen ve içeriği belirlenen liken asitlerinin de oldukça önemli biyolojik aktivite sergilemeleri kemoterapötik ajan olabilme olasılığını her geçen gün artırmaktadır. Literatürde bulunan birçok çalışma liken asitleri içerisinde kimyasal olarak içeriği en iyi bilinen ve liken sekonder metabolitleri içinden üzerinde en fazla çalışılan usnik asittir. Yapılan çalışmalar neticesinde usnik asitin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser gibi birçok biyolojik aktivite sergilediği belirlenmiştir (Koc vd., 2021).

Son yıllarda usnik asitin yanı sıra evernik asit, difrakteik asit, lekoranik asit ve vulpinik asit gibi içeriği belirlenen ve üzerinde çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları sürdürülen liken asitleri de bulunmaktadır (Kalın, Altay, ve Budak, 2022). Liken asitlerinin bilinen biyolojik aktiviteleri; Sitotoksik aktivite (Solárová vd., 2020), antiviral, antibakteriyel ve antifungal aktivite (Kosanić vd., 2013; Molnár ve Farkas, 2010), antioksidan aktivite (Molnár ve Farkas, 2010), antitümör aktivite (Günaydın vd.; Kalın vd., 2022; Nguyen vd., 2019) olarak literatürde yer almaktadır.

Vulpinik Asit

Likenlerden elde edilen bir sekonder metabolit de vulpinik asittir. Vulpinik asit ilk olarak 1831 yılında Bebert tarafından izole edilmiştir (Bebert, 1831). Huneck ve Yoshimura’nın yaptığı çalışmada parlak sarı görünümlü olan vulpinik asitin, çok yüksek miktarlarda *Letharia vulpine* yiyen ren geyikleri üzerinde toksik etki sergilediğini belirtmişlerdir (Huneck vd., 1996). Zehirli olarak bilinen *Letharia vulpine*’den izole edilen Vulpinik asit, diğer sekonder metabolitler arasında antibiyotik etkiye sahip olan 60 sekonder metabolitten biridir (Karamanoğlu, 1971). Yapılan bir başka çalışmada ise vulpinik asitin antimikrobiyal etki gösterdiği gram negatif ve gram pozitif bakteriler kullanılarak belirlenmiştir (Osmanağaoğlu, Yıldız, ve Saçılık, 2000). *Letharia vulpina*’dan elde edilen vulpinik asitin aynı zamanda en iyi mavi ışığı emdiği ve yansıttığı kaydedilmiştir

(Phinney, Gauslaa, ve Solhaug, 2019). Vulpinik asit, *Letharia vulpina*'dan izole edilen, $C_{19}H_{14}O_5$ molekül yapısına sahip olan bir liken asitidir ve son yıllarda yapılan çalışmalarla vulpinik asitin (VA) antimikrobiyal (Lauterwein, vd. 1995), antidiyabetik (Demir vd., 2022), antikanser (Kalın vd., 2022; Kılıç, Aras, ve Cansaran-Duman, 2018) gibi birçok biyolojik aktivite sergilediği gösterilmiştir (Bhattacharyya vd., 2016).



Şekil 1. 17. Vulpinik asit yapısı (VulpinicAcid, 2023).

Doğal Ürün- İlaç Kombinasyonları

Pek çok ilaç gibi antibiyotikler de ihtiyaca yönelik yıllarca kullanımları gerçekleştirilen ve başarıyla tedavi sürecini sonuçlandıran ilaç gruplarından biridir. Ancak zaman içerisinde patojen bakterilerde meydana gelen değişimler sonucu antibiyotiklere karşı bir direnç oluşumu gözlenmiştir. Bu direnç oluşumu sonucunda tedaviyi devam ettirmek adına ya yeni ilaç üretimi ya da mevcut ilaçların farklı dozlarda bir araya getirilmesiyle direncin kırılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Antibiyotiklerle yapılan kombinasyon çalışmalarında her bir ilacın farklı hedef moleküle bağlanmasını amaçlar ve bu sayede daha geniş etki alanına ulaşılmasına olanak sağlar. Kombinasyonlarda sinerjistik etki; farklı hedefleri farklı yollardan ya da aynı yoldan, aynı hedefi farklı yollardan inhibe ederek meydana gelir. Kombinasyonların kullanımının yaygınlaşması; ilaçların sinerjik etkisi, ilaç direncinin gelişimini engellemesi ve toksik etkiyi azaltması gibi farklı özelliklere sahip olması nedeniyledir (Aktaş, 2014).

Antibiyotik direncinde olduğu gibi kanser tedavilerinde de kullanılan kemoterapötik ilaçlara karşı kanser hücreleri direnç gösterebilmektedir. Bu nedenle son yıllarda kanser tedavisinde kemoterapötik ilaçların kombinasyonlarına yönelik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (Ayhancı ve Gültekin, 2008). Günümüzde tedavisi devam eden hastalara tedaviyi kısaltabilmek adına ilaç-ilaç kombinasyonları (Sisplatin+Doksetel;

Sisplatin+Doksorubisin kombinasyonları) uygulanmaktadır (Guo vd., 2019; Terada vd., 2019). Ancak kullanılan ilaçların sentetik olması nedeniyle hastalar üzerindeki yan etkilerin azalmaması, bu tür kombinasyonların dezavantajını oluşturmaktadır. İlaç-ilaç kombinasyon çalışmalarında ilaçlardan birinin doğal ürünlerden seçilmesi ile olası yan etkileri minimuma ineceği ve bunun da bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Bu bağlamda son yıllarda ilaç+doğal ürün kombinasyon çalışmaları hız kazanmıştır. Tekin 2021, yapmış olduğu yüksek lisans tez çalışmasında, Olea europea yaprak özütünün (OLE) kemoterapi ilacı olan 5- Fluorourasil (5-FU) ve sisplatin ile kombine olarak kullanılmasıyla gastrik kanser (mide kanseri) AGS hücrelerinin canlılığı ve ölümü üzerine, tümör hücrelerinin agresifliğini baskılamasına, tümör büyüklüğü ve hücrelerde gelişen tedavi direncinin kırılması ve bu süreçlerde görev alan epigenetik mekanizmalar üzerine etkilerini araştırmıştır. Elde ettiği kombinasyon sonuçları; OLE'nin hücre proliferasyonunu azalttığı, hücreleri apoptotik yolla öldürdüğü ve kemoterapötikler ile birlikte EMT ve CSC belirteçlerini inhibe ederek tümörün agresifliğini baskıladığı, aynı zamanda MDR genlerinin ekspresyon seviyelerini düşürerek ilaç direncini önlediğini tespit etmiştir. Aynı zamanda OLE'nin tek başına ve kemoterapötikler ile birlikte uygulandığında tümör boyutunda küçülme görüldüğü ve angiogenезin baskılandığı rapor edilmiştir (Tekin, 2021).

Vargas ve ark., yaptıkları çalışmada doksorubisin (Doxo) ve resveretrol (Rsv) kombinasyon dozlarının MCF-7 hücre hattı üzerinde tetiklediği hücresel mekanizmaları incelemişlerdir. Çalışma sonucunda Rsv tarafından modüle edildiği tahmin edilen yedi varsayılan gen bulmuşlardır: CCND1, CDH1, ESR1, HSP90AA1, MAPK3, PTPN11 ve RPS6KB1. Bu yedi genden altısının kanser hücrelerinde Rsv tarafından modüle edildiği deneysel olarak kanıtlanmıştır ve MCF7 hücrelerindeki 6 genden 4'ü Rsv tarafından modüle edilmiştir. Sonuç olarak, akut Rsv, Doxo direncinde rol oynayan genlerin ve mekanizmaların modülasyonu yoluyla meme kanserinde Doxo'nun uzun vadeli toksisitesini potansiyel olarak güçlendirmiştir. Rasyonel otofaji inhibisyonu, hayvan modellerinde daha fazla test edilmesi gereken bir strateji olan Rsv+Doxo'nun etkilerini güçlendirdiği sonucuna varmışlardır (Vargas vd., 2020).

Calaf ve ark., (2018) kurkumin ve paklitaksel ile yaptıkları çalışmada insan meme kanseri hücre hatlarında (MDA-MB-231 ve MCF-10F) kurkumin ve paklitakselin tek başına ve kombinasyon halinde neden olduğu hücre ölümünü değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri

sonuçlar, kurkumin ve paklitakselin apoptoz ve nekrozu indüklediğini göstermiştir; bu durum kaspaz-3/7 aktivitesi, Annexin V, poli (ADP-riboz) polimeraz-1 aktivasyonu ve kaspaz-3, nükleer faktör NF-κB transkripsiyon faktörü ve çoğalan hücre nükleer antijeninin protein ekspresyonu gibi birçok yöntemle gösterilmiştir. Kurkumin ve paklitaksel kombinasyonu MCF-10F ile karşılaştırıldığında malign MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz üzerinde azaltıcı bir etkiye sahip olduğunu belirlemiştir. Kurkumin ve paklitaksel ile kombine tedavinin, meme kanseri hücre hatlarında tek başına her iki maddeye kıyasla daha yüksek düzeyde apoptoz ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Calaf, Ponce-Cusi, ve Carrión, 2018).

İki veya daha fazla ilacı birleştiren bir tedavi olan kombinasyon tedavisi, kanser tedavisi için yeni bir stratejidir. Fitokimyasallar ve kemoterapötiklerin kombinasyonu, monoterapiye kıyasla etkinliği artırır, bunun nedeni ilaç kombinasyonlarının optimum etkilere ulaşmak için sinerjik veya eklemeli bir şekilde anahtar yolları hedeflemesidir (Mokhtari vd., 2017). Bu kapsamda son yıllarda doğal ürün ve ilaç kombinasyon çalışmaları oldukça artış göstermiştir. Temel hedef kanserli hücrelerin ölümünü saplayarak ortadan kaldırılması, aynı zamanda kanserli olmayan hücrelerin de minimum zarar ile bu süreci tamamlayabilmesidir. Doğal ürünlerden elde dilen sekonder metabolitler bu bağlamda oldukça rağbet görmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

Son yıllarda tıbbi ve aromatik bitkilerin bünyelerinde bulunan sekonder metabolitlerin onarıcı ve tedavi edici özelliklerinden dolayı bitki temelli ürünler kullanılarak alternatif tedavi oluşturulmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Emsen vd., 2018). Liken asitleri olarak da bilinen liken sekonder metabolitlerinin yapılan çalışmalar neticesinde birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Bilinen biyolojik aktiviteler; antiviral, antibakteriyel, analjezik, antipiretik ve antikanser aktiviteleri gibi önemli biyolojik etkilerdir. Özellikle çağımız hastalıklarından olan kanser için yapılan antikanser çalışmaları için eşsiz birer kaynak olan liken asitlerinin yukarıda belirlenen biyolojik aktivitelerinin yanı sıra sitotoksik, pro-apoptotik, antiproliferatif, antimigratif, anti-invaziv ve antioksidan özelliklerinin de olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda liken asitlerinin karsinogenez oluşumunu veya gelişimini önlemede son derece önemli bir özelliğe sahip oldukları düşünülmektedir (Calcott vd., 2018; Molnár ve Farkas, 2010).

Sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla olması ve kanser tedavisi sürecinden sonra hastada meydana gelen çeşitli yan etkilerin bir süre daha devam etmesi nedeniyle pek çok bilim insanı doğal bileşiklere yönelmiştir. Sentetik ilaçların aksine doğal bileşiklerin metabolizmaya pozitif yönde etki eden özellikleri yıllardır bilinmekte olup, ilaç etken maddesi ve gıda takviyeleri olarak kullanılmaktadır. Kısa ve uzun vadede ortaya çıkan tüm bu yan etkiler nedeniyle kemoterapötik ilaçların kullanımı hastayı hem tedavi sürecinde hem de tedavi sonrası ciddi şekilde etkilemektedir. Bu nedenle yan etkilerini daha az olduğu belirlenmiş olan tıbbi ve aromatik bitkilere yönelim günümüzde oldukça artmıştır (Sekar ve Kandavel, 2010). Kanser tedavilerinde kullanımda olan mevcut kanser ilaçlarının da sentetik olması nedeniyle var olan yan etkileri, meme kanserinin oldukça maliyetli ve sınırlı tedavisi gibi sebepler, yeni ve yan etkisi oldukça az olan hedef moleküllerin keşfi büyük önem kazanmıştır.

Vulpinik asidin kanser hücrelerinde anti-mikrobiyal, anti-proliferatif, anti-anjiyogenik ve ultraviyole ışınlarına karşı koruyucu etkileri olduğu yakın zamanda yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Kalın vd., 2022; Koparal, 2015).

Vulpinik Asit ile yapılan diğer çalışmalar ise şu şekildedir:

Son yıllarda yan etkilerinin oldukça az olması ve henüz pek çoğunun içeriğinin keşfedilmemiş olması birçok bilim insanının merakını liken sekonder metabolitleri üzerine çekmiştir. Ozgencli ve ark. (2018), yapmış oldukları çalışmada liken asitlerin (difraktaik, evernik, lobarik, lekanorik ve vulpinik asit) sıçan akciğerinden saflaştırılan mitokondriyal TrxR üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini araştırmışlardır. Elde edilen veriler uygulanan liken asitleri içerisinde özellikle lekanorik (LA) ve vulpinik asit (VA)'ın TrxR üzerinde ticari olarak kullanılan antikanser ilaçlardan sisplatin ve doksorubisin'e göre çok daha güçlü inhibitör etki sergilediğini göstermiştir (Ozgencli vd., 2018).

Cansaran-Duman ve ark. (2021) yapmış oldukları çalışmada meme kanseri ilerlemesinde vulpinik asit (VA) ve ilgili miRNA'ların rolünü değerlendirmişlerdir. Yapılan miRNA dizisinin ve biyoinformatik analizlerinin sonuçları, 12 miRNA'nın MCF-7 meme kanseri hücrelerinde VA'e spesifik olarak yanıt verdiğini göstermiştir. Bu sonuç, VA'in 12 miRNA'nın ekspresyonunu baskılayarak hücre proliferasyonunu durdurduğunu ortaya koyan ilk çalışmadır. Çalışma ayrıca VA'in FOXO-3 genini baskılayarak 12 miRNA'nın ekspresyonunu aşağı regüle edebileceğini ortaya koymuş ve miRNA hedeflerinin esas olarak apoptoz, hücre döngüsü ve MAPK yollarında rol oynadığı da belirlenmiştir (Cansaran-Duman, Yangin, ve Çolak, 2021).

Demir ve ark. (2021), yaptıkları çalışmada diyabetik komplikasyonların önlenmesinde vulpinik asit (VA), karnosik asit (CA), ve usnik asidin (UA) saflaştırılmış Aldoz redüktaz (AR) ve Sorbitol dehidrojenaz (SDH) enzimleri üzerindeki inhibitör etkilerini incelemişlerdir. Poliöl yolunun önemli enzimleri olan AR ve SDH, saflaştırıldıktan sonra VA, CA ve UA bu enzimlerin aktivitelerine karşı *in vitro* olarak çeşitli konsantrasyonlarda test edilmiştir. VA, CA ve UA'nın AR üzerindeki ki değerleri sırasıyla $1,46 \pm 0,04$, $5,13 \pm 0,25$, ve $11,71 \pm 0,27$ μM olarak bulunduğu rapor edilmiştir. Aynı örneklerin SDH için değerleri ise sırasıyla $15,32 \pm 0,34$, $145,60 \pm 2,17$, ve $213,40 \pm 2,64$ μM olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular VA, CA, ve UA'nın diyabetik komplikasyonların tedavisinde yararlı olabileceğini göstermektedir (Demir vd., 2022).

Kılıç ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada, Vulpinik Asiti (VA) insan meme kanseri (MCF-7) ve kanserli olmayan MCF-12A hücre hatları üzerine antiproliferatif ve

apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar, VA'nın hücre canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiğini ve insan meme kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklediğini göstermiştir. En yüksek büyüme azalması oranları, MCF-7 meme kanseri hücresinde 48 saat boyunca VA'nın IC₅₀ değeri kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, P53 genlerinin gen ekspresyonunun, VA ile tedaviden sonra MCF-12A hücre dizisinde 2.5 katına ulaştığını göstermiştir. Bu gözlemler, kanserli olmayan insan meme epitel hücre dizisine kıyasla VA'nın meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini desteklemektedir (Kılıç vd., 2018).

Sahin ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada HUVEC insan endotel hücre hattı üzerine VA'nın farklı konsantrasyonlarını (5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 200, ve 300 µM) uygulamışlardır. Uygulanan dozlardan 15 µM'a kadar herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı ve bu dozda da hücre canlılığının oldukça yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışma ile VA'nın H₂O₂ kaynaklı oksidatif stresi ve oksidatif strese bağlı hasarları oldukça azalttığını ve damar tıkanıklığı olarak bilinen ateroskleroz dahil pek çok hastalığın temelini oksidatif dengenin bozulması sonucu oluşan hasar olduğunu, bu sonuçların da damar tıkanıklığı tedavisinde ilaç adayı olabileceğini göstermişlerdir (Sahin vd., 2019).

Günaydın tarafından 2021 yılında yapılmış yüksek lisans tez çalışmasında, Vulpinik asit (VA), Evernik Asit (EA), Difrakteik Asit (DA) ve Lekonorik Asit (LA)'ın insan akciğer kanseri hücre hattı A549 üzerinde antikanser ajan olarak kullanılıp kullanılmayacağını ve olası antikanser etkinin tiyoredoksin redüktaz 1 (TRXR1) hedefli gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini gen ve protein seviyesinde araştırmıştır. Elde edilen bulgulara A549 hücre hattı üzerinde VA, EA ve DA'nın sitotoksik etkisi olduğu, VA ve DA'nın BAX/BCL2 oranını ve P53 gen ekspresyonunu artırdığı, migrasyonu baskıladığı, TRXR1 enzim aktivitesini inhibe ettiği ve TXN gen ekspresyon seviyesini artırdığı rapor edilmiştir (Günaydın, 2021).

Karaca tarafından 2021 yılında yapılmış yüksek lisans tez çalışmasında, insan karaciğer (HepG₂) kanser hücre hattında bazı liken asitlerinin (evernik, vulpinik, difraktaik, lekanorik) antikanser etkilerini ve olası etkilerin tiyoredoksin redüktaz 1 (TRXR1) hedefli olup olmadığını gen ve protein seviyesinde araştırmıştır. Elde edilen bulgulara; evernik, vulpinik ve difraktaik asitlerinin HepG₂ kanser hücreleri üzerine doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etkilerinin olduğu, migrasyonu baskıladığı, vulpinik ve difraktaik

asitlerinin apoptozu indüklediğini belirlemiştir. Ayrıca Vulpinik asidin BAX/BCL2 oranını arttırdığı, p53 geninin ekspresyonunu azalttığını, difraktaik asidin ise apoptotik yolak genlerinden sadece p53 geninin ekspresyonunu arttırdığını belirlemiştir. Vulpinik ve difraktaik asidin tiyoredoksin sistem genlerinden TXN ekspresyonunda bir değişiklik oluşturmadığını, TRXR1 geninde ise önemli bir artış oluşturduğunu, Evernik asit ise belirtilen genlerin ekspresyonlarında değişiklik oluşturmadığını, vulpinik, evernik ve difrakteik asitin TRXR1 kantitatif protein ekspresyonunu arttırdığını ve vulpinik asit ile difraktaik asidin enzim aktivitesini baskımlarken evernik asidin enzim aktivitesini arttırdığını rapor etmiştir (Karaca, 2021).

Kalın tarafından 2022 yılında tamamlanan doktora tez çalışmasında, Vulpinik asit (VA), Evernik Asit (EA), Difrakteik Asit (DA) ve Lekonorik Asit (LA)'in insan meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-453)'nda tiyoredoksin redüktaz 1 (TrxR1) hedefli antikanser etkilerini araştırmıştır. Elde edilen bulgulara; VA, EA ve DA'nın yukarıda bahsi geçen meme kanseri hücre hatları üzerinde doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etki gösterdiklerini ve ayrıca moleküler çalışmalar neticesinde de bu üç liken asidi (VA, EA, DA) 'nin antikanser etkilerini TrxR1 enziminin inhibisyonuyla sergiledikleri rapor edilmiştir (Kalin, 2022).

Vulpinik asit ile yapılan farklı biyolojik aktivite çalışmalarının yanı sıra gerçekleştirilen *in vitro* antikanser çalışmaları, onun farklı kanser hücre hatları üzerinde kayda değer bir antikanser etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, literatürde VA ile kanser tedavilerinde yaygınca kullanılan farklı kemoterapotik ilaçların çeşitli kombinasyonlarının sinerjik antikanser etkileri hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile insan meme kanseri hücre hatları (MCF-7, MDA-MB-453, ve MDA-MB-231) üzerine VA'nın kemoterapotik ilaçlar (sisplatin, mitaksantron, doksorubisin ve dosetaksel) ile farklı kombinasyonlarının sinerjik antikanser etkilerinin ilk kez belirlenecek olması tezi özgün kılmaktadır. Bu kapsamda; kimyasal içeriği belirlenmiş, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip, liken sekonder metabolitlerinden biri olan vulpinik asit, çalışmaya konu olarak seçilmiştir. Çalışma kapsamında kemoterapotik ilaç olarak kullanılan sisplatin, doksorubisin, dosetaksel, mitoksantron ve vulpinik asit ilk etapta MCF-7, MDA-MB-231 ve MA-MB-453 meme kanseri hücre hatları üzerinde doz-zaman bağımlı olarak ayrı ayrı uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda her bir

meme kanseri hücre hattı üzerine kemoterapötik ilaçlar ile vulpinik asitin kombinasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.1. Amaç

Kanser, oluşumdan tedaviye, hatta tedavi sonrası bıraktığı kısa ve uzun vadeli yan etkileri ile maddi manevi kişiler üzerinde pek çok geri dönülemez etkiler bırakan bir hastalıktır. Yıllara göre belirlenen kanser insidansları değerlendirildiğinde geçmişten günümüze kanserin mevcut senaryosu ve gelecek tahminleri göz önüne alındığında, önümüzdeki 20 yıl içerisinde yaklaşık 22 milyon kişiye kanser teşhisi konulacağı, bu sayının en az %60'lık kısmının da ölümle sonuçlanacağı tahmin edilmektedir. Globocan 2020 verilerine göre 2020 yılında toplamda 19,3 milyon kanser vakası olduğu, bu sayının 2040 yılına kadar 30,2 milyon olacağı tahmin edilmektedir. Ölüm oranlarına bakıldığında 2020 yılında 9,96 milyon olan bu sayının 2040 yılına kadar 16,3 milyon olacağı tahmin edilmektedir. Meme kanseri oranlarına bakıldığında ise tüm kanserler içerisinde en yüksek rakamlar sergilediği görülmektedir. 2020 yılında yaklaşık 2,3 milyon meme kanseri teşhisi konulduğu, 685 bin kişinin ise hayatını kaybettiği belirlenmiştir. 2040 yılına kadar meme kanseri teşhisinin 3,19 milyon olacağı, ölüm oranının ise 2040 yılına kadar 1,04 milyon olacağı tahmin edilmektedir (Ferlay vd., 2020; Globocan, 2023). Tüm bu oranlar kanserle mücadelenin önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Kanserli hücrelerin tedavilerinde temel amaç hücrelerin ilaçların etkinliği ile hücre ölümü adı verilen apoptoza yönelimlerini sağlamaktır. Hücreler apoptoza hem içsel hem de dışsal yolaklar aracılığıyla yönlenebilmektedir. Bunun yanı sıra hücre sağ kalımında rol alan yolaklardan olan PI3K/AKT/mTOR yolağının da kanserli hücreler için bloke edilmesi oldukça önemlidir. Kanser hücrelerinin en belirgin özelliği hücre sağ kalımını devam ettirip apoptozdan kaçmasıdır. Bu nedenle kanserli hücrelerin PI3K/AKT/mTOR yolağını kullanmalarını önlemek elzemdir. Son yıllarda ciddi rağbet görmeye başlayan liken sekonder metabolitleri, özellikle kemoterapötik ajan olarak kullanım alanına sahip olabileceği düşünülen ve üzerinde çalışmalara devam edilen yeni bir alandır. Vulpinik asit ile yapılan farklı biyolojik aktivite çalışmalarının yanı sıra gerçekleştirilen *in vitro* antikanser çalışmaları onun farklı kanser hücre hatları üzerinde kayda değer bir antikanser etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, literatürde VA ile kanser tedavilerinde yaygınca kullanılan farklı kemoterapötik ilaçların çeşitli kombinasyonlarının sinerjik

antikanser etkileri hakkında bir çalışma bulunmamaktadır. VA'in yukarıda bahsi geçen kemoterapötik ilaçlarla (sisplatin, doksorubisin, dosetaksel ve mitaksantron) birlikte kullanıldığında üç farklı meme kanseri hücre hattında (MCF-7, MDA-MB-453, ve MDA-MB-231) ROS miktarını, PI3K/AKT/mTOR ve apoptotik yolak markır proteinlerini moleküler seviyede nasıl etkilediği hakkında literatürde herhangi bir çalışmanın mevcut olmaması bu tez çalışmasının ortaya çıkma nedenidir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal malzemeler

Tablo 3. 1.Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Kimyasal Adı	Firma
RPMI 1640 Medium	Biological Industries
Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM)	Biological Industries
Trypsin Solution A (0.25%)	Biological Industries
L-Alanyl-L-Glutamine (Stable Glutamine) (200 mM)	Biological Industries
Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Solution	Biological Industries
Cell Proliferation Kit (XTT based)	Biological Industries
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biological Industries
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Biological Industries
Trypan Blue Boyası	Sigma-Aldrich
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Muse® Annexin V ve Dead Cell Assay Kit	Luminex
Muse® MultiCaspase Assay Kit	Luminex
Muse® Mitopotential Assay Kit	Luminex
Muse® P13K Activation Dual Detection Kit	Luminex
Muse® Cell Cycle Kit	Luminex
Muse® Oxidative Stress Kit	Luminex
PureLink™ RNA Mini Kiti	Applied Biosystems
cDNA Sentez Kiti (SuperScript™ III First-Strand Synthesis System)	Applied Biosystems
SYBR Green qPCR Master Mix	Qiagen
Primer	Oligomer
P53 Primer Antikor	ProteinTech
BAX Primer Antikor	ProteinTech
Caspase-3 Primer Antikor	ProteinTech
Cytochrome C Primer Antikor	ProteinTech
PI3K Primer Antikor	ProteinTech
mTOR Primer Antikor	ProteinTech
AKT Primer Antikor	ProteinTech
B-Aktin Primer Antikor	Santa Cruz Biotechnology

Tablo 3. 1. (Devam) Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Sekonder Antikor (Rabbit Anti-Mouse IgG-HRP)	Santa Cruz Biotechnology
Sekonder Antikor (Goat Anti-Rabbit IgG-HRP)	Santa Cruz Biotechnology
RIPA Buffer	Biological Industries
Vulpinik Asit	Cayman Chemical Company
Protein Marker	Bio-Rad
Skim Milk Powder (Yağsız süt tozu)	Bio-Rad
Clarity Max Western ECL Substrates	Bio-Rad
Clarity Western ECL Substrates	Bio-Rad
Tween 20	Sigma-Aldrich

Tablo 3. 2. Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar

MATERYAL VE CİHAZ	FİRMA
Buzdolabı (+4 / -20°C)	Haier
-80 °C dondurucu	Haier
Eppendorf Santrifüj	Isolab
CO ₂ inkübatör	Nüve
Olympus CKX41 ters faz kontrast mikroskop	Nikon Eclips Tİ-U
Vortex	WisMix Daihan VM10
ELISA plaka okuyucusu	Thermo Scientific
Su Banyosu-Çalkalayıcı	Nüve
Laminer Akış ve Biyogüvenlik Kabinleri	Bilser BLF 200
Thoma Lamı	Marienfeld
Multi pipet/ Pipet	Eppendorf
Cryotubes	Eppendorf
Blotlama (Semidry Blotter) Cihazı	Bio-Rad
15 mL ve 50 mL'lik Santrifüj Tüpleri	Sarstedt / Isolab
Flow (Akım) Sitometri Cihazı	Muse® Cell Analyzer
Hassas Terazı	Shimadzu
Nanodrop	Thermo Scientific
Otoklav	Nüve
PCR	Bio-Rad
Real-Time PCR	Qiagen

Tablo 3. 2. (Devamı) Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar

Pipet Uçları	Isolab
Serolojik Pipetler	Labsolute
T-25 Flask (Filtreli, steril)	Sarstedt
T-75 Flasklar (Filtreli, steril)	Sarstedt
Strip Tüpler	Qiagen
6 Kuyucuklu Plaka	Sarstedt
96 Kuyucuklu Plaka	Sarstedt
1,5-2 mL’lik Tüpler ve Raklar	Eppendorf
Cell Scraper (Hücre Kazıyıcı)	Sarstedt

Tablo 3. 3. Tez Dahilinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

%70’lik Etil Alkol	Saf etil alkolden 70 mL alınarak üzeri 30 mL saf su ile tamamlanarak hazırlandı.
%5’lik Bloklama Çözeltisi	5 g Skim Milk Powder (Yağsız Süt Tozu) tartıldı ve 95 mL TBST içerisinde çözündürüldü.
1X TBST Çözeltisi	10X TBS’den (konsantre) 100 mL alındı ve üzeri 900 mL dH ₂ O ile 1 L’ye tamamlandı. Üzerine 1 mL Tween-20 eklendi.
1X Transfer Çözeltisi	10X Transfer (konsantre) çözeltisinden 100 mL alındı, üzeri 900 mL saf su ile tamamlandı.
Laemni Buffer	100 µL β-merkaptoetanol ve 900 µL 4X Laemni sample buffer ile tamamlanır ve kullanılır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

MCF-7 hücreleri Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) besiyerinde çoğaltılıp işlemlerde kullanıldı. DMEM bazal besiyeri içerisine %10 FBS, %1 Penisilin/streptomisin içerecek şekilde hazırlandı. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları da içerisinde %10 FBS, %1 Penisilin/streptomisin bulunan RPMI 1640 besiyerisinde çoğaltıldı.

3.2.1.1. Hücre Açma ve Büyütme İşlemleri

Tez kapsamında kullanılan her bir hücre hattının açılması ve çoğaltılması işlemleri, yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan besiyeriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre kabini %70'lik etil alkolle temizlenerek sterilizasyonu sağlanır. -80 °C'deki stok kanser hücresi çıkarıldı ve su banyosunda eritildi. Hazırlanan besiyeri T-75 flask içerisine alındı ve üzerine stok hücre eklendi. Bir gece 37 °C %5 CO₂ inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün besiyeri değiştirildi ve hücreler %85-90 konfluensiye ulaşana kadar büyümesi takip edildi. Hücre yoğunluğuna göre her 2-3 günde bir kontrolü yapıldı ve zemini dolduran hücreler bölünerek çoğaltıldı.

3.2.1.2. Hücre Bölme ve Hücre Dondurma İşlemleri

Belirli bir yoğunluğa ulaşan hücrelerin (%85-90 konfluensiye) deneysel işlemlerde kullanılabilmesi ve çoğaltılması için hücre bölme ve sayım işlemleri gerçekleştirildi. Kabin sterilizasyonu yapıldıktan sonra hücreler kabine alındı ve eski besiyeri uzaklaştırıldı. DPBS (Ca ve Mg içermeyen) ile yıkama yapılarak flask içerisindeki safsızlıklar uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelerin üzerine Trypsin-EDTA (%0,25) eklendi ve hücrelerin zeminden ayrılması için 10-15 dakika inkübatörde bekletildi. Zeminden kalkan hücreler üzerine besiyeri ilave edildi ve 15mL'lik falkon tüpe alındı. Hücreler 5dk boyunca 13000rpm'de santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Hücreler, flasklara uygun sayıda ekildi ve yeniden inkübatöre (37 °C %5 CO₂) kaldırıldı.

Hücreleri stoklamak için 2mL'lik kriyo tüp alınır, üzerine hücre ismi, tarih, stoklama işlemini yapan kişi ismi yazılır. Flaskta büyümüş olan hücreler kaldırılıp çöktürüldükten sonra taze besiyeri (besiyeri içerisinde %5'lik DMSO bulunur) hücre peleti üzerine

eklenir ve pipetajlanarak homojenlik sağlanır. Daha sonra hücreler kriyo tüpe konulur ve bir saat kadar -20°C’de bekletildikten sonra -86°C’ye kaldırılır.

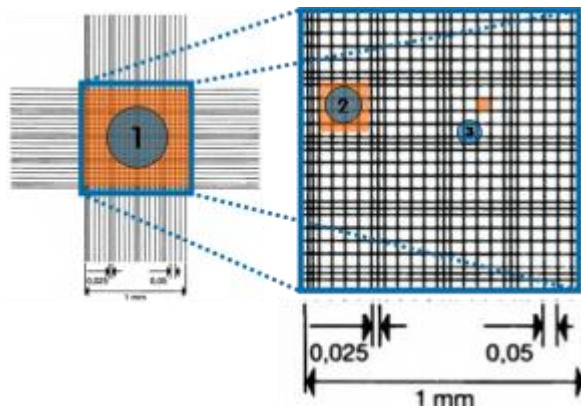
3.2.1.3. Hücre Sayımı

Hücreler, işlem öncesi sayılarak işlemin yapılacağı plate içerisine ekimi gerçekleştirilir. Bunun için flasktan alınan hücrelerin sayımı için Thoma Lamı kullanıldı. Hücre sayımı için eppendorf tüp içerisine 100 µL hücre süspansiyonu ve 100 µL tripan mavisi boyası eklenerek pipetajlandı. Cansız hücrelerin hücre bütünlüğü bozulduğu için, trypan blue boyasını içerisine alarak mavi renkte gözlenir ancak canlı hücreler bu boyayı içerisine almaz ve parlak olarak gözlenir. Bu sayede canlı ve ölü hücreler mikroskop altında ayırt edilir. Boya içeren hücre karışımından 10 µL alınarak thoma laminin üst ve alt bölmelerine aktarıldı ve şekil 3.1’deki işaretli alan içerisinde bulunan hücrelerin sayımı Invert mikroskop altında gerçekleştirildi. mL başına düşen hücre sayısı aşağıdaki gibi hesaplandı:

Hücre sayısı / mL = sayılan hücre sayısı ortalaması x seyreltme faktörü x 10^4

Seyreltme faktörü: 2 olarak alınmıştır (100 µL hücre süspansiyonu, 100 µL tripan mavisi boyası).

10^4 : mm³’deki sayım sonrası 1mL’ye karşılık gelen hücre sayısını dönüştürmek için kullanılan sabit değer.



Şekil 3. 1. Hücre sayımının yapıldığı Thoma Lamı

3.2.2. Kemoterapi İlaçlarının (Sisplatin, Doksorubisin, Dosetaksel ve Mitaksantron) ve Vulpinik Asitin Uygun Kombinasyonlarının Hazırlanması

Kanser hücre hatları üzerine uygulanacak olan vulpinik asit (VA) ve kemoterapi ilaçları (Sisplatin, Doksorubisin, Dosetaksel ve Mitaksantron) ilk etapta stok çözelti olarak dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich) içinde çözüldükten sonra kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. VA'nın 5, 10, 25, 50, 100 ve 150 µM arasındaki farklı konsantrasyonları hücreler üzerine uygulanmıştır. Benzer şekilde, her bir kemoterapötik ilacın 0,05-0,1-0,5-1-5-10-25-50-100 µM konsantrasyonları hücrelere uygulanmak üzere hazırlanmıştır.

3.2.3. Hücre Proliferasyonu Testi (XTT Testi)

XTT [(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)] yöntemi ile hücre proliferasyonundaki değişimler belirlenmiştir (Altay vd., 2003). XTT analizi, XTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin ya da formazan boyalarının kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. Söz konusu yöntemde, proliferasyonu artmış hücreler tarafından XTT tuzu kullanılmaktadır ve artan dehidrojenaz enzim aktivitesine bağlı olarak XTT tuzunu turuncu renkli suda çözünebilir formazan ürününe dönüştürmektedir. Elde edilen renk değişimi, ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülerek hücre proliferasyonundaki değişimler belirlenmektedir. Önerilen tez kapsamında çalışılan VA ve kemoterapik ajanların seçilen insan kanser hücre hattı üzerine antiproliferasyonları etkileri için;

1. 96'lık plağın her bir kuyucuğuna, 100 µL (7500 hücre/kuyu) besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonu ekildi. Hücrelerin yüzeye yapışmaları için 37°C ve %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde bir gece bekletildi.
2. İnkübasyon sonrasında plak içerisindeki kültür medyumunu uzaklaştırılıp, PBS tamponu ile her bir kuyucuk yıkandı ve PBS tamponu uzaklaştırıldı.
3. 96'lık plak içerisine 100 µL test edilecek her bir maddenin besiyeri ortamında hazırlanan farklı konsantrasyonlarından ilave edildi ve 37°C de %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde zaman bağımlı olarak (24, 48 ve 72 saat) inkübe edildi. Kontrol grubu olarak sadece besiyeri içeren hücreler kullanıldı.

4. İnkübasyon süresinden sonra, hazırlanan XTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 50'şer µL (5 mL XTT için 100 µL aktivatör) konulup 5 saat %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde inkübe edildi.
5. İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikropate okuyucu spektrofotometre ile 490 nm absorbans değeriinde ölçümleri yapıldı.

Hücre proliferasyonundaki azalma aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\% \text{ proliferasyon} = \frac{[\text{Abs}_{(\text{ekstre ile muamele görmüş hücreler})} - \text{Abs}_{(\text{hücresiz ortamdaki ekstre})}] / [\text{Abs}_{(\text{kontrol grubu hücreler})} - \text{Abs}_{(\text{hücresiz ortam})}]}{1} \times 100$$

3.2.4. Kombinasyon İndeks Çalışmaları

Tez kapsamında vulpinik asit (VA) ile kemoterapötik ilaçlar (sisplatin, doksorubisin, dosetaksel ve mitoksantron) ilk önce ayrı ayrı meme kanseri hücre hatları (MCF-7, MDA-MB- 231 ve MDA- MB 453) üzerine farklı konsantrasyonlarda (0,05-150 µM) ve farklı zaman dilimlerinde (24, 48 ve 72 saat) uygulanmıştır. Her bir hücre hattı üzerinde VA'ın ve kamotarapötik ilaçların antiproliferatif etkileri ayrı ayrı belirlenmiştir. Daha sonra her bir hücre hattı üzerine kombinasyon denemeleri (VA+Doksorubisin ve VA+Mitoksantron) yapılmıştır. Kombinasyon denemeleri sonucunda kombine VA+kemoterapötik ilaçların hücrelerin üzerindeki antiproliferatif etkileri zaman bağımlı olarak belirlenmiştir.

XTT deneyleri sonucunda elde edilen verilere göre vulpinik asit (VA)'ın her bir kemoterapik ilaç (sisplatin, doksorubisin, dosetaksel ve mitoksantron) ile ayrı ayrı farklı dozlardaki kombinasyonları (VA+Doksorubisin ve VA+Mitoksantron) kanser hücrelerine tatbik edilmiş ve tekrarlanan XTT çalışması sonucunda buradan elde edilen veriler Compusyn programına işlenerek CI (Combinational Index) değerleri hesaplanmıştır. CI değeri, iki veya daha fazla ilacın belirli oranlardaki kombinasyonunun hücre üzerindeki etkilerini belirten değerdir. Kombinasyon çalışmaları sonucunda elde edilen Kombinasyon indeks değeri 1 ila 10 arasında ise Antagonistik etki, 10'den büyük ise Aditif etki, 0,9 ila 0 arasında ise Sinerjik etki gösterdiği anlamı taşımaktadır (Chou ve Talalay, 1984; Sever, 2018).

Kombinasyon indeksi değerleri (CI)	Hücreye Etkisi
CI = 1,1 – 1,2	Hafif Antagonistik etki
CI = 1,2 – 1,45	Orta Antagonistik etki
CI = 1,45 – 3,3	Antagonistik etki
CI = 3,3 - 10	Güçlü Antagonistik etki
CI > 10	Çok güçlü Antagonistik etki
CI = 0,9 – 1,1	Aditif etki
CI = 0,85 – 0,9	Hafif sinerjik etki
CI = 0,7 – 0,85	Orta sinerjik etki
CI = 0,3 – 0,7	sinerjik etki
CI = 0,1- 0,3	Güçlü sinerjik etki
CI < 0,1	Çok güçlü sinerjik etki

Şekil 3. 2. Kombinasyon İndeksi değer aralıkları ve hücreler üzerindeki etkileri (Chou ve Talalay’dan esinlenerek hazırlanmıştır).

3.2.5. Flow Sitometri Çalışmaları

3.2.5.1. Apoptozis (Annexin V-FITC/PI)

VA ve kemoterapötik ilaçların meme kanseri hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri Annexin V ve Dead Cell Kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Muse® Annexin V ve Dead Cell Kit, Merck Millipore). Bunun için, hücreler 6 kuyucuklu bir plaka içinde belirli bir konsantrasyonda (1×10^5 - 5×10^5 hücre/mL) ekildi ve bir gece CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra hücreler ön testler sonucunda elde edilen kombinasyonun CI değerindeki konsantrasyonlarıyla muamele edildi ve zaman bağımlı apoptotik etkileri görmek için 48 saat boyunca inkübasyonlara tabi tutuldu (Altay vd., 2019). İnkübasyon süresinden sonra aşağıda belirtilen deney basamakları uygulandı;

- 1) 6 kuyucuklu plaklar içerisindeki mevcut hücreler tripsin ile bulundukları ortamdan kaldırılıp santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 2) Pelet üzerine %1’ lik fetal bovine serum (FBS) içeren 1 mL’ lik besiyeri ilave edildi ve homojen hale getirildi.
- 3) Elde edilen hücre süspansiyonu üzerine daha önceden hazırlanan FITC Annexin V çözeltisinden 100 µL eklendi ve hızlıca 3-5 sn vortekslendikten sonra karışım oda sıcaklığında ışıktan korunarak 20 dk inkübe edildi.
- 4) Kontrol grubu için aynı ayarlar gerçekleştirilerek örnekler bu ayarlar üzerinden Muse™ Cell Analyzer yardımıyla okundu.

3.2.5.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (MMP)

Test örneklerinin kanser hücre hatları üzerinde Mitokondriyal Membran Potansiyeli üzerine etkileri Muse MitoPotential Kiti (MCH100110, Luminex) kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için, her bir hücre hattı (1×10^5 - 5×10^5 hücre/mL) ayrı ayrı 6 kuyucuklu plakalar içerisine ekildi ve bir gece CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra hücreler, daha önceki deney basamağından (XTT) elde edilen kombinasyon değerindeki (CI) sinerjik etkiye sahip olan konsantrasyonlarıyla muamele edildi (Çağlar vd., 2022). İnkübasyondan sonra aşağıda belirtilen deney basamakları uygulandı;

- 1) 6 kuyucuklu plaklar içerisindeki mevcut hücreler tripsin ile bulundukları ortamdan kaldırılıp santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 2) İnkübasyonun ardından hücreler toplandı ve 300 x g'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant atıldı, pellet yıkandı.
- 3) Pelet daha sonra 1X tahlil tamponu ile yeniden süspansiyon edildi.
- 4) Süspansiyon edilen hücre süspansiyonundan 100 µL alındı
- 5) Hücrelerin üzerine 95 µL Mitopotential çalışma solüsyonu eklendi
- 6) Hücreler 20 dakika 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi
- 7) İnkübasyondan sonra, 7-aminoaktinomisin D (7-AAD) test tüpüne ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı
- 8) Analizler Muse™ Cell Analyzer yardımıyla okundu.

3.2.5.3. Multikaspaz Aktivite Testi

Test örneklerinin kanser hücre hatları üzerinde Multikaspaz aktivitesi üzerine etkileri Muse Multikaspaz Kiti (MCH100109, Luminex) kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için, her bir hücre hattı (1×10^5 - 5×10^5 hücre/mL) ayrı ayrı 12 kuyucuklu plakalar içerisine ekildi ve bir gece CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra hücreler, daha önceki deney basamağından (XTT) elde edilen kombinasyon değerindeki (CI) sinerjik etkiye sahip olan konsantrasyonlarıyla muamele edildi (Altay vd., 2022). İnkübasyondan sonra aşağıda belirtilen deney basamakları uygulandı;

- 1) 12 kuyucuklu plaklar içerisindeki mevcut hücreler tripsin ile bulundukları ortamdan kaldırılıp santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

- 2) İnkübasyonun ardından hücreler toplandı ve 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant atıldı, pellet yıkandı.
- 3) Pelet daha sonra 1X kaspaz tamponu ile yeniden süspanse edildi.
- 4) Süspanse edilen hücre süspansiyonundan 50 µL alındı
- 5) Hücreler üzerine Muse Multicaspase Reagent çalışma solüsyonu eklendi ve pipetleme yapıldı.
- 6) Tüplerin ağzı tam kapatılmadan 30 dk. inkübatörde inkübe edildi.
- 7) İnkübasyon sonrası 150 µL 7-AAD'den her bir tüp eklendi ve pipetlendi.
- 8) Örnekler 5 dk.oda sıcaklığında bekletildi ve Muse™ Cell Analyzer yardımıyla okundu.

3.2.5.4. Oksidatif Stres

Test örneklerinin kanser hücre hatları üzerinde Oksidatif stres üzerine etkileri Muse Oxidative Stress Kiti (MCH100111, Luminex) kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için, her bir hücre hattı (2×10^6 - 5×10^6 hücre/mL) ayrı ayrı petrilere içersine ekildi ve bir gece CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra hücreler, daha önceki deney basamağından (XTT) elde edilen kombinasyon değeriindeki (CI) sinerjik etkiye sahip olan konsantrasyonlarıyla muamele edildi ve hücre döngüsü üzerindeki etkilerini belirlemek için tekrar CO₂ inkübatöründe 48 saat süreyle inkübe edildi (Harurluoglu vd., 2021). İnkübasyon süresinden sonra aşağıda belirtilen deney basamakları uygulandı;

- 1) Petri içersindeki mevcut hücreler tripsin ile bulundukları ortamdan kaldırılıp santrifüj edildi
- 2) Süpernatant döküldü, pelet, PBS ile yıkandı ve 300 x g'de 5 dakika santrifüjlendi
- 3) Pelet üzerine Assay tamponu eklenerek yeniden süspanse edildi.
- 4) Süspanse edilen hücre süspansiyonundan 10 uL alındı ve üzerine 190 uL çalışma solüsyonu eklendi.
- 5) Hücreler 30 dakika 37 °C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.
- 6) İnkübasyonun ardından, hücrelerdeki oksidatif stres durumu Muse™ Cell Analyzer yardımıyla belirlendi.

3.2.5.5. Hücre Döngüsü (Cell Cycle)

Test örneklerinin kanser hücre hatları üzerinde Hücre Döngüsü üzerine etkileri Muse Cell Cycle Kiti (MCH100106, Luminex) kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için, her bir hücre hattı (1×10^6 - 5×10^6 hücre/mL) ayrı ayrı 6 kuyucuklu plakalar içerisine ekildi ve bir gece CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra hücreler, daha önceki deney basamağından (XTT) elde edilen kombinasyon değerindeki (CI) sinerjik etkiye sahip olan konsantrasyonlarıyla muamele edildi ve hücre döngüsü üzerindeki etkilerini belirlemek için tekrar CO₂ inkübatöründe inkübe edildi (Harurluoglu vd., 2021). İnkübasyon süresinden sonra aşağıda belirtilen deney basamakları uygulandı;

- 1) 6 kuyucuklu plaklar içerisindeki mevcut hücreler tripsin ile bulundukları ortamdan kaldırılıp santrifüj edildi
- 2) Süpernatant döküldü, pelet, PBS ile yıkandı ve 300 x g'de 5 dakika santrifüjlendi
- 3) Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırıldı ve pelet, %70 buz soğukluğunda etanol ile yeniden süspanse edildi ve -20 °C'de 3 saat inkübe edildi
- 4) -20°C'den çıkarılan hücreler tekrar 300 x g'de 5 dakika santrifüjlendi
- 5) Süpernatant uzaklaştırıldı ve ardından test tüpüne 200 uL Muse hücre döngüsü reaktifi eklendi ve hücreler oda sıcaklığında 30 dakika daha inkübe edildi
- 6) İnkübasyonun ardından, hücre döngüsü değişiklikleri Muse™ Cell Analyzer yardımıyla okundu.

3.2.5.6. PI3K/AKT Sinyal Yolağı

Tez kapsamında kullanılan liken sekonder metaboliti ve kemoterapötik ilaçların meme kanseri hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri PI3K Cell Kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Muse® PI3K Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore, MCH200103). Bunun için, hücreler 6 kuyucuklu bir plaka içinde belirli bir konsantrasyonda (1×10^5 - 3×10^5 hücre/mL) ekildi ve bir gece %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra hücreler daha ön testler sonucunda elde edilen kombinasyonun CI değerindeki konsantrasyonlarıyla muamele edildi ve zaman bağımlı apoptotik etkileri görmek için 48 saat boyunca inkübasyonlara tabi tutuldu (Demirci vd., 2023; Harurluoglu vd., 2021). İnkübasyon süresinden sonra aşağıda belirtilen deney basamakları uygulandı;

- 6 kuyucuklu plaklar içerisindeki mevcut hücreler tripsin ile bulundukları ortamdan kaldırılıp santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelet üzerine 1X Assay Buffer eklenerek yıkama yapıldı. Daha sonra Fixation Buffer ilave edildi.
- 300 g'de 5 dk santrifüj yapıldı.
- Hücre peleti üzerine Permobilize Buffer eklendi ve tekrar hücreler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi.
- 90 µL 1X Assay Buffer eklenerek hücreler homojenize edildi.
- Her bir hücre üzerine 10 µL coctail eklendikten sonra 30 dk. inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra 1X Assay Buffer eklenerek yıkama yapıldı ve hücreler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücreler üzerine 200 µL 1X Assay Buffer eklenerek Muse™ Cell Analyzer yardımıyla okuma gerçekleştirildi.

3.2.6. Kantitatif Protein Ekspresyon (Western Blot) Çalışmaları

3.2.6.1. Jelin Yüklenmesi

Deneyde kullanılacak 10-100 µg proteine 1X SDS yükleme tamponu (Laemmli Buffer) eklenip 10 dk 95°C'lik ısıtma blokunda inkübe edildikten sonra proteinler 10 dk buz içerisinde bekletilmiştir. Denatüre edilen numuneler yükleme jeline (Mini-Protean TGX %4 ila %20 (ağırlık/hacim) prekast jel (Bio-Rad)) yüklendikten sonra 50 Voltta 30 dakika SDS jel elektroforezinde yürütülmeye başlanmıştır. Numuneler ayırma jeline geçmeye başladığında cihaz voltajı 120 Volta çıkarılıp 90 dakika daha yürütme gerçekleştirilmiştir (Kalın vd., 2022).

3.2.6.2. Jeldeki Proteinin Membrana Transferi (Blotlama), Bloklama ve Görüntüleme Basamakları

SDS-PAGE jeli üzerinde molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler BioRad Trans-BlotR Turbo™ Transfer System semidry blotter cihazı kullanılarak PVDF membrana aktarılmıştır (Altun ve Budak, 2021). Transfer için yapılan işlemler aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

- 1) Semidry Blotter cihazına sırasıyla bir parça blot kâğıdı, PVDF membran, jel ve tekrar blot kâğıdı konulduktan sonra 25 Volt 2,5 Amper’de 7 dakika süreyle blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- 2) Blotlama işleminin ardından membran 10 dk TBST ile yıkanmıştır. Bloklama çözeltisi (%5 Skim Milk Powder veya %5 Bovine Serum Albumin) ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edilmiştir.
- 3) 4°C’de bir gece boyunca birinci antikor ile inkübasyona bırakılmıştır.
- 4) İnkübasyon bittikten sonra 5 kez 5 dk TBST ile yıkama yapılmıştır.
- 5) HRP konjuge edilmiş ikinci antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 6) İnkübasyon işlemi bittikten sonra membran 5 kez 5 dk TBST ile yıkanarak görüntüleme basamağına geçilmiştir.
- 7) Antikoron kimyasal sinyal oluşturarak ışığa vermesi için Femto ve Pico substratları (ECL Reagent) kullanılmıştır.
- 8) BioRad ChemiDoc™ Touch Imaging System cihazı kullanılarak membranın kemilüminesans görüntüsü elde edilmiştir.

3.2.7. Kantitatif Gen Ekspresyon (Real-Time PCR) Çalışmaları

RT-PCR çalışmaları kapsamında kontrol ve muamele grubu olmak üzere iki farklı grup bulunmaktadır. Muamele grubuna insan meme kanseri MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine VA+Kemoterapötik ilaçların CI değerlerince belirlenmiş olan sinerjik etki dozları, belirlenen konsantrasyonlarda uygulanırken, kontrol grubuna besiyeri eklenmiştir.

3.2.7.1. Total RNA İzolasyonu

MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları (2×10^6 hücre/mL) ayrı ayrı petriler içerisine ekildi ve 37°C’de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyeri uzaklaştırılarak DPBS tamponu ile hücreler yıkandı. Daha sonra muamele grubu hücreleri üzerine VA+Kemoterapötik ilaç kombinasyonu, kontrol grubu hücrelerine taze besiyeri konularak 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası besiyeri ve ilaçlar hücreler üzerinden uzaklaştırıldı ve DPBS ile tekrar yıkama yapıldı. RNA izolasyonu, GeneJET RNA Purification Kit kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi (Günaydın, 2021; Kalın, 2022; Karaca, 2021).

- Hücrelerin üzerindeki büyüme ortamı uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkanarak PBS uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin üzerine Trypsin eklenerek hücreler kaldırıldı ve 250 g'de 5dk. santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
- Toplanan hücrelere M β -merkaptoetanol veya DTT ile desteklenmiş Lysis Buffer'dan 600 μ L eklendi, vortexlendi.
- 360 μ L etanol (%96-100) numune üzerine eklendi ve numune pipetajlandı.
- Toplama tüpüne yerleştirilen GeneJET RNA saflaştırma kolonuna 700 μ L'ye kadar lizat aktarıldı. Kolon 12000 g'de 1 dk. santrifüjlendi. Tüm lizat kolona aktarılan kadar işleme devam edildi. İşlem esnasında her 700 μ L'lik değişimden sonra tüp dibinde kalan atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Son aşamada kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolona 700 μ L Wash Buffer -1 eklendi ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Dipteki kısım atıldı ve kolon yeniden toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolona 600 μ L Wash Buffer -2 eklendi ve 12000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Dipteki kısım atıldı ve kolon yeniden toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kolona 250 μ L Wash Buffer -2 eklendi ve 12000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Kolon steril bir 1,5 mL RNAaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Kolonun merkezine nükleaz içermeyen 100 μ L su eklendi.
- Saflaştırma kolonu çıkarıldı. Alınan RNA'lar diğer işlemler için -20°C veya -70°C 'de muhafaza edildi.

3.2.7.2. RNA Konsantrasyon ve Saflığının Belirlenmesi

Nükleik asitler, içerdikleri pürin ve pirimidin bazlarının 260-280 nm'de ultraviyole (UV) ışığı kuvvetli şekilde absorbe etmelerinden dolayı kantitatif olarak tayin edilebilirler. Spektrofotometrik yöntemler kullanılarak elde edilen nükleik asitlerin protein kirliliği taşıyıp taşımadığı 280 nm'de ölçüm yapılarak tespit edilebilmektedir. Saf olarak elde edilen DNA örneklerinde A260/A280 oranı yaklaşık 1,8 ve üzerinde iken, RNA örneklerinde ise A260/A280 oranı yaklaşık 2,0 ve üzeridir. Bu oranların altında yer alan değerler proteinlerin izolasyon esnasında oluşabilecek kirliliğin göstergesidir (Günaydın, 2021; Karaca, 2021). İzole edilen RNA'nın konsantrasyon ve saflık derecesi Elisa cihazı (Take3) kullanılarak spektroskopik ölçümle belirlendi (Tablo 3.4 ve 3.5).

Tablo 3. 4. MDA-MB-231 Hücre Hattı için Belirlenen CI Dozunda VA+Kemoterapötik İlaç Uygulaması Sonucu Elde Edilen RNA'ların Safılık ve Konsantrasyon Değerleri

Gruplar/MDA-MB-231	260/280	ng/ μ L
Kontrol-1	2,114	299,616
Kontrol-2	2,194	387,456
VA+DOX	2,173	223,296
VA+MIX-1	2,164	276,416
VA+MIX-2	2,163	226,656

Tablo 3.5. MDA-MB-453 Hücre Hattı için Belirlenen CI Dozunda VA+Kemoterapötik İlaç Uygulaması Sonucu Elde Edilen RNA'ların Safılık ve Konsantrasyon Değerleri

Gruplar/MDA-MB-453	260/280	ng/ μ L
Kontrol-1	2,208	385,936
Kontrol-2	2,187	342,176
VA+DOX	2,194	114,747
VA+MIX-1	2,211	132,827
VA+MIX-2	2,269	93,216

3.2.7.3. cDNA kütüphanesinin hazırlanması

İzole edilen mRNA'lardan cDNA sentezi için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits kullanılarak üretici firmanın belirlemiş olduğu kit protokolüne göre aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- ✓ Kit içerisindeki bütün bileşenler buz üzerinde çözündürülür.

2X RT Master Mix hazırlamak için;

- 10XRT Buffer 2 μ L
- 25XdNTP Mix (100mM) 0,8 μ L
- 10XRT Random Primer 2 μ L
- MultiScribeTM Revers Transkriptaz 1 μ L
- Nükleaz-içermeyen H₂O 4,2 μ L

- ✓ Önce 2X RT Master Mix hazırlanarak buza yerleştirilir. 2X Master Mix'den 10 μ L alınarak mini-santrifüj tüpüne aktarılır.

- ✓ 10 µL numunelerden alınarak tüplere eklenir.
- ✓ Numuneler ve master mix içeren tüpler karıştırılır ve mini santrifüjde spin yapılır.
- ✓ Daha sonra aşağıdaki sürelerde reaksiyon döngüleri uygulanır:

Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Dakika	10	120	5	Hold

Süre bitiminde reaksiyon sonlandırılarak elde edilen cDNA'ların konsantrasyon ve saflık derecesi Elisa cihazı (Take3) kullanılarak spektroskopik ölçümle belirlendi (Tablo 3.6 ve 3.7).

Tablo 3.6. MDA-MB-231 Hücre Hattı için Belirlenen CI Değerindeki VA+Kemoterapötik ilaç Uygulaması Sonucu Elde Edilen cDNA'ların Saflık ve Konsantrasyon Değerleri

Gruplar/MDA-MB-231	260/280	ng/µL
Kontrol-1	1,920	2452,86
Kontrol-2	1,929	2431,66
VA+DOX	1,915	2376,66
VA+MIX-1	1,927	2347,26
VA+MIX-2	1,930	2235,06

Tablo 3. 7. MDA-MB-453 Hücre Hattı için Belirlenen CI Değerindeki VA+Kemoterapötik ilaç Uygulaması Sonucu Elde Edilen cDNA'ların Saflık ve Konsantrasyon Değerleri

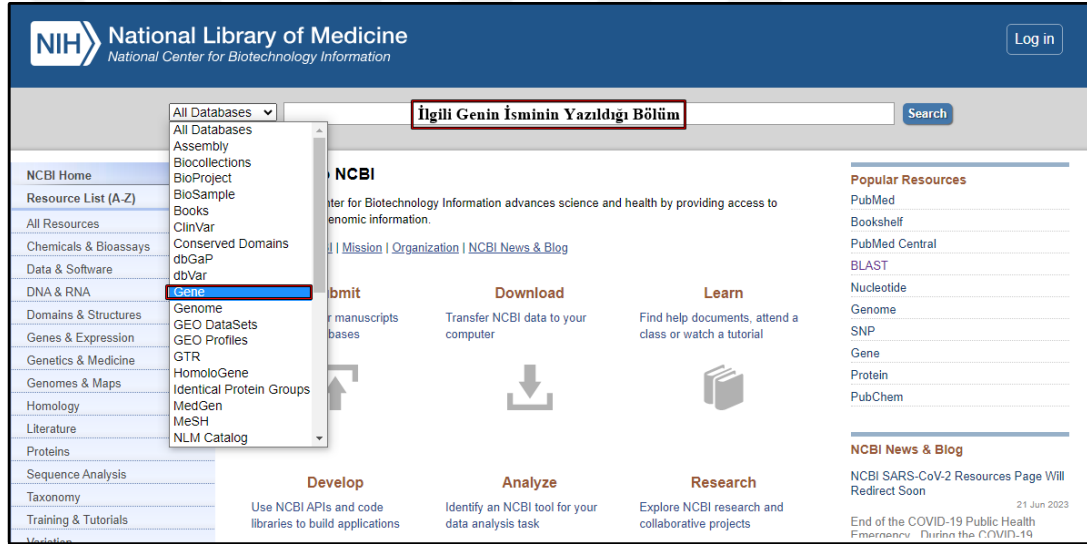
Gruplar/MDA-MB-453	260/280	ng/µL
Kontrol-1	1,943	2247,46
Kontrol-2	1,940	2100,36
VA+DOX	1,929	2104,26
VA+MIX-1	1,931	2123,86
VA+MIX-2	1,931	1957,96

Saflık dereceleri ve konsantrasyonları belirlenen numuneler Real-Time PCR analizinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.2.7.4. Primer Dizayını

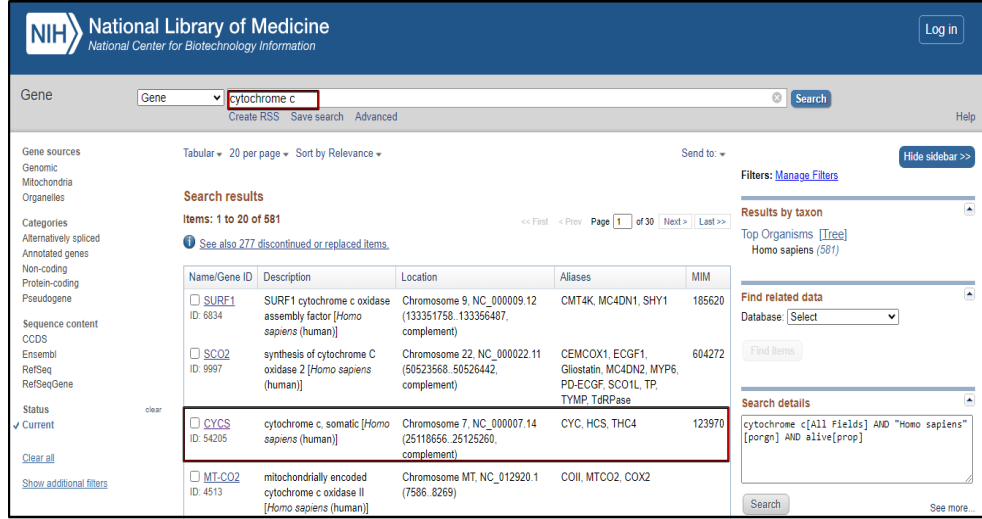
Tez kapsamında çalışılan apoptotik yolak proteinlerinden BCL-2 ilişkili apoptotik X proteini (BAX), anti-apoptotik onkoprotein (BCL-2) (Ergün vd., Demir, 2023; Taouji,

Wolf, ve Chevet, 2013), solunum zincirinin kompleks III ve kompleks IV'ü arasında elektronları transfer etmek üzere işlev gördüğü, iç ve dış mitokondriyal zarlar arasındaki bölgede lokalize olan bir heme proteini (Sitokrom-C) (Matsuura vd., 2016), transkripsiyon aktivasyon domainini içeren (p53) (Belyi vd., 2010), asparata özgü sisteinil proteazlar ailesinin üyesi olan protein (Kaspaz-3) (Kashyap, Garg, ve Goel, 2021), PI3K sinyal yolağı proteinleri (PI3K, AKT, mTOR) ve β -Aktin genlerinin primer dizaynı için National Center for Biotechnology Information (NCBI) databazı kullanılmıştır. Primer dizaynı için NCBI ana sayfası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)'na gidilerek Şekil 3.3.'deki gibi “All databases” bölümünden “Gene” seçeneği seçildi ve arama kutucuğuna gen bilgisi (kısa veya uzun adı ya da ID numarası) girilip “search” tıklanarak Şekil 3.4 organizma seçim sayfasına ulaşıldı.



Şekil 3. 3. Primer dizaynında kullanılan NCBI ana sayfası.

Tez kapsamında insan meme kanseri hücre hatları kullanıldığı için gen ismi arama kutucuğuna yazılıp search butonuna tıklandıktan sonra sağ tarafta bulunan kutucuk yardımıyla ‘homo sapiens’ yazılarak ilgili gen hakkında detaylı bilgilerin bulunduğu şekil 3.4 sayfası açıldı.



Şekil 3. 4. Primer dizaynı için ilgili genin bilgilerinin yer aldığı seçim sayfası.

Açılan sayfada ilgili genin gen sekansına ait detaylı bilgiler görünmektedir. Gen sekans kodu tıklanarak gen hakkındaki gen ve protein sekans detayları bilgilerine ulaşılmaktadır (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).



Şekil 3. 5. İlgili gen sekansına ait bilgilerin olduğu NCBI sayfasının üst tarafı.

NCBI Reference Sequences (RefSeq)

NEW Try the new Transcript table

RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes

These reference sequences exist independently of genome builds. [Explain](#)

Genomic

1. NG_023438.1 RefSeqGene

Range 5001..11711

Download [GenBank](#) [FASTA](#) [Sequence Viewer](#) [Graphics](#) [LRG_876](#)

mRNA and Protein(s)

1. NM_018947.6 → NP_061820.1 cytochrome c

[See identical proteins and their annotated locations for NP_061820.1](#)

Status: REVIEWED

Source sequence(s) [AC007487](#) [AI365318](#) [BC024218](#) [DB447825](#)

Consensus CDS [CCDS5393.1](#)

UniProtKB/Swiss-Prot [A4D166](#) [B2R411](#) [P00001](#) [P99999](#) [Q6NUR2](#) [Q6NXX9](#) [Q96BY4](#)

UniProtKB/TrEMBL [G4XXL9](#)

Related [ENSP00000307786.2](#) [ENST00000305786.7](#)

Conserved Domains (1) [summary](#)

[COG3474](#) Location:1 → 103 Cyt7, Cytochrome c2 [Energy production and conversion]

Şekil 3. 6. İlgili gene ait mRNA bilgilerin olduğu NCBI sayfasının alt tarafı.

Gene ait mRNA bilgilerinin FASTA formatına ulaşmak için sayfada (Şekil 3.7) bulunan FASTA sekmesine tıklanır ve genin nükleotit sekansına ulaşılır (Şekil 3.8).

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide [Advanced](#)

GenBank [Send to: ▾](#)

Homo sapiens cytochrome c, somatic (CYCS), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_018947.6

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to: ▾](#)

LOCUS NM_018947 5432 bp mRNA linear PRI 24-MAY-2023

DEFINITION Homo sapiens cytochrome c, somatic (CYCS), mRNA.

ACCESSION NM_018947

VERSION NM_018947.6

KEYWORDS RefSeq; MANE Select.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 5432)

AUTHORS Feng Y, Dong Y, Du KJ, Liu XC, Gao SQ and Lin YW.

TITLE The oxidative nuclease activity of human cytochrome c with mutations in Omega-loop C/D

JOURNAL Biochim Biophys Acta Proteins Proteom 1871 (3), 140897 (2023)

PUBMED [36642204](#)

Şekil 3. 7. İlgili gen sekansının bulunduğu NCBI sayfası.

General Primer Picking Conditions

Upload the settings from a file Dosya seçilmedi

Primer Size Min Opt Max

Primer Tm Min Opt Max Max Tm Difference [Table of thermodynamic parameters](#)

Product Tm Min Opt Max

Primer GC% Min Opt Max

Product Size Ranges

Number To Return Max 3' Stability

Max Library Mispriming Pair Max Library Mispriming

Thermodynamic Secondary Structure Alignments		Old Secondary Structure Alignments	
☒ Use Thermodynamic Oligo Alignment			
TH: Max Self Complementarity	45.0	Max Self Complementarity	3.00
TH: Max 3' Self Complementarity	35.0	Max 3' Self Complementarity	3.00
TH: Max Pair Complementarity	45.0	Max Pair Complementarity	3.00
TH: Max 3' Pair Complementarity	35.0	Max 3' Pair Complementarity	3.00
TH: Max Primer Hairpin	24.0		

Thermodynamic Template Alignments		Old Template Alignments	
☐ Use Thermodynamic Template Alignment			
TH: Max Template Mispriming	40.00	Max Template Mispriming	12.00
TH: Pair Max Template Mispriming	70.00	Pair Max Template Mispriming	24.00

Şekil 3. 10. Primer bilgilerinin girildiği veri tabanı sayfası.

Gerekli bilgiler girildikten sonra sayfada yer alan ‘Pick Primers’ butonuna tıklanarak veri tabanının önerdiği primer dizisinin yer aldığı sayfaya ulaşıldı (Şekil 3.11).

Primer3 Output

```

PRIMER PICKING RESULTS FOR

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO
LEFT PRIMER 361 20 59.08 50.00 0.00 0.00 0.00 ATGCCTGTAATCCAGCACT
RIGHT PRIMER 462 20 59.39 55.00 0.00 0.00 0.00 TGTAGAGACAGGTTTCGCC
SEQUENCE SIZE: 507
INCLUDED REGION SIZE: 507

PRODUCT SIZE: 102, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.37

1 CTGTAAGTGGCTAGGTTGGTAGAATCAAAAACAAGGGCCAGATGTATTTAAGGGGTATTC

61 AGATGCCACCTACATGCTTATTTGTCTAGAACAGTGTCTAATAGAACTTTCTGTGA

121 CGATGGATATTTTGTAGACTTTTGTCTGCCAGTGTGGTAGCCACTAACCACATGTGGCTG

```

Şekil 3. 11. Veri tabanının ilgili gen için önerdiği primer dizisi sayfası.

Primer3 veri tabanının önermiş olduğu dizayn edilen primer dizilerinin başka genler ile aralarında herhangi bir homolojinin olup olmadığını ise <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> veri tabanı kullanılarak kontrol edilir (Şekil 3.11). İlgili genin dizayn edilen primerleri blastlanarak sonuçları Şekil 3.13’de gösterilmiştir.

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) Query subrange [?](#)

ATGCCTGTAATCCCAGCACT

İlgili Gene Ait Primer Sekansının Yazıldığı Alan

From To

Or, upload file Dosya seçilmedi [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

☐ Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database ☒ Standard databases (nr etc.): ☐ rRNA/ITS databases ☐ Genomic + transcript databases ☐ Betacoronavirus

☒ Experimental databases [Try experimental taxonomic nt databases](#) [Download](#)

For more info see [What are taxonomic nt databases?](#)

Organism [?](#)

Homo sapiens (taxid:9606) **İlgili Organizmanın Yazıldığı Alan** [Add organism](#)

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [?](#)

Exclude ☐ Models (XMP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

Limit to ☐ Sequences from type material

Entrez Query

Enter an Entrez query to limit search [?](#)

Program Selection

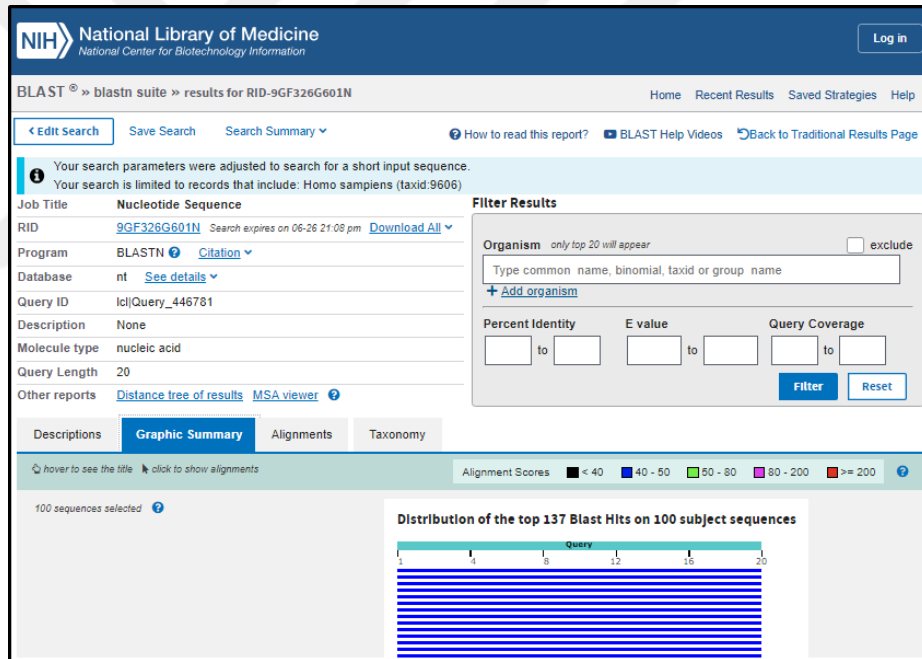
Optimize for ☒ Highly similar sequences (megablast) ☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast) ☐ Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm [?](#)

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

☐ show results in a new window

Şekil 3. 12. Primer dizaynının kontrol edildiği BLAST sayfası.



Şekil 3. 13. Dizayn edilen primerlerin BLAST sonuç sayfası.

Tez çalışması doğrultusunda gen ekspresyon profillerine bakılarak her bir gen için dizayn edilen primerlerin listesi Tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3. 8. Dizayn Edilen Primerlerin Listesi

Gen Adı	Primer	Primer Dizisi (5'→3')	Tm Sıcaklık (°c)	% GC Oranı
Beta Aktin	Forward	TGCTATCCCTGTACGCTCT	59	55
	Reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGA	57	50
BAX	Forward	CAGGAAGTGGAAAGGTGGAG	59	55
	Reverse	CTCAGGATGAAGACCCGAAG	59	55
BCL2	Forward	TTGTAGTGTGTATGCCCTGCTT	59	45
	Reverse	TCCTCTGTGATGCTGAAAGGT	59	47
Caspase-3	Forward	GCCTACAGCCCATTTCTCC	59	58
	Reverse	TTCACTTTCTTACTTGGCGATG	59	41
P53	Forward	ACCCATCCACCTCTCATCAC	59	55
	Reverse	TCTACTCCCAACCACCCTTG	59	55
PI3KCA	Forward	CCCCTCCATCAACTTCTTCA	60	50
	Reverse	ATGCCGATAGCAAAACCAAT	59	40
mTOR	Forward	GCAGATTTGCCAACTATCTTCGG	64	48
	Reverse	CAGCGGTAAAAGTGTCCCCTG	64	57
AKT	Forward	TTCTATGGCGCTGAGATTGTGT	62	45
	Reverse	GCCGTAGTCATTGTCCTCCAG	62	57
Cytochrome-c	Forward	AGACATGGACAGAGGAATGCC	60	52
	Reverse	CCTTGTGCTCACCATCTCCA	59	55

3.2.7.5. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Analizi

Gen ekspresyon seviyelerinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla VA+Kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının sinerjik etki gösteren dozları ile muamele edilen ve muamele edilmeyen insan meme kanseri hücre hatlarına Real-Time PCR (qPCR) analizi gerçekleştirildi. qPCR analizi sürecinde SYBR Green yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde SYBR Green, qPCR analizi esnasında ilgili gen bölgesi çoğaltılırken yeşil floresan boya kantitatif olarak oluşan ürüne bağlanır. Bu bağlanma sonucunda belirli bir dalga boyunda ışıma meydana gelmesi sonucunda cihazda absorbans alınmasıyla analiz gerçekleştirilir (Ergün vd., 2023).

Kontrol ve uygulama gruplarındaki hücrelerden izole edilen RNA’lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA’ların konsantrasyonları eşitlendikten sonra SYBR Green yöntemi kullanılarak BAX, BCL-2, p53, Sitokrom-C, Kaspaz-3, PI3K, mTOR, AKT genlerinin ekspresyon miktarları ölçülerek β -Aktin ile normalize edildi.

RT-PCR reaksiyon karışımı hazırlandı ve içerisine cDNA (100 ng-100 fg), çalışılan her bir primerden 0,3-0,5 μ M, Syber Green master miksten 10 μ L ilave edildi. Son hacim nükleaz free su ile 25 μ L’ye tamamlandı. Çalışmalar esnasında ve Tablo 3.9’daki PCR protokolü takip edildi.

Tablo 3. 9. Quantitect SYBR Green PCR Protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	50°C	2 dk	
Denatürasyon	95°C	15dk	1
Primer Bağlanma Basamağı	94°C	15 sn	
Primer Uzama Basamağı	50°C -60°C	30 sn	40
Sonlandırma Basamağı	72°C	30 sn	

3.2.8. Migrasyon Çalışması

Hücre göçü, yara iyileşmesi, kanser metastazı, embriyonik gelişim ve doku rejenerasyonu dahil olmak üzere çeşitli patolojik ve fizyolojik süreçlerin temel bir bileşenidir. Kanserli hücrelerde toplu hücre göçü özellikle invazyon ve metastazda önemli bir rol almaktadır (Yamaguchi, Wyckoff, ve Condeelis, 2005). Hücre migrasyonunu değerlendirmek için wound healing çalışması yapılmıştır. Hücreler (5×10^5 hücre/kuyu) 6 kuyucuklu plakalara ekildi (Kalin vd., 2022). Hücreler inkübatörde bir gece bekletildikten sonra steril 10 μ L pipet ucu ile çizik (yara) oluşturuldu. Hücre artıklarını uzaklaştırmak için DPBS ile yıkandıktan sonra hücreler, VA+Kemoterapötik ilaçların kombinasyonunun en etkin CI dozlarıyla muamele edilerek inkübasyona bırakıldı. Çizilen bölgeler, mikroskopla 0, 24 ve 48 saat aralıklarla fotoğraflandı. Çizilen bölgelerin mesafesi, ImageJ yazılım programı ile ölçülerek migratif etkisi ortaya konuldu.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Her bir hücre hattı üzerine ilk aşamada kemoterapötik ilaçlar ve vulpinink asit (VA) ayrı ayrı uygulandı ve doz- zaman bağımlı proliferasyon sonuçları mikropate okuyucu

spektrofotometre ile 490 nm absorbans değeriinde ölçümleri alındı. Elde edilen sonuçlara göre her bir hücre hattı üzerine ikinci aşamada kemoterapötik ilaç ile VA kombinasyon denemesi yapıldı. Kombinasyon denemelerinin sonuçları CompuSyn programı ile hesaplandı. Deneyler 3'er kez tekrarlandı.

Her bir hücre hattı üzerine sinerjik etki gösteren VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozları XTT sonucunda belirlenen 48 saatlik inkübasyon süresince uygulandı. Uygulama sonrası kombinasyon dozlarının hücreler üzerindeki migratif etkileri, mitokondriyal membran potansiyeli, çoklu kaspaz aktivasyonu, apoptoz, hücre döngüsü üzerine etkisi, hücre içi oksidatif stres ile ilişkisi, PI3K sinyal yolağı üzerindeki aktivasyon ve inhibisyon değişimlerinin yanı sıra apoptotik ve PI3K yolak proteinleri üzerindeki farklılıklar ve proteinlerin apoptotik yolak üzerindeki etkileri araştırıldı. Deney sonuçlarının istatistiki değerlendirilmesi için GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiki olarak gerçekleştirilen çalışmaların değerlendirilmesi sonucunda $P<0.05$, istatistiksel olarak anlamlı bir farkın göstergesi olarak kabul edildi. Gerçekleştirilen tüm deneyler 3'er kez tekrarlandı.

Western blot analizi ile elde edilen hedef proteinler ve β -Aktin housekeeping proteininin kemilüminesans sinyal yoğunluğu ImageJ software programı ile ölçölüp, hedef proteinler ve β -Aktin housekeeping proteinine karşı normalize edildi. Deney sonuçlarının istatistiki değerlendirilmesi için GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) istatistik programı kullanılarak Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. Deneyler 3'er kez tekrarlandı.

qPCR sonrası hem kontrol hem de muamele gruplarının gen ekspresyon seviyeleri CT değerlerine göre standart sapmalarıyla Livak Metodu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) kullanılarak gerçekleştirildi (Livak ve Schmittgen, 2001). Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi GraphPad Prism Software programı kullanılarak yapıldı. Unpaired t-testi yapılmış ve p değerleri belirlendi. Buna göre; $p>0,1=ns$ önemsiz, $*p<0,01$ önemli, $**p<0,001$ çok önemli, $***p<0,0001$ yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi. Deneyler 3'er kez tekrarlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Vulpinik Asit ve Kemoterapötik İlaçların Doz-Zaman Bağımlı Antiproliferasyon Çalışmaları

Meme kanseri hücre hatları (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453) üzerine ilk aşamada 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde sisplatin, doksorubisin, dosetaksel, mitoksantron ve vulpinik asit ayrı ayrı uygulanmıştır. Uygulama sonucunda her bir hücre hattında kemoterapötik ilaçların ve vulpinik asitin inhibisyon değerleri Tablo 4.1’ de doz-zaman bağımlı olarak verilmiştir.

Tablo 4. 1. MCF-7 hücre hattı üzerine Sisplatin, Doksorubisin, Dosetaksel, Mitoksantron ve Vulpinik Asitin 24, 48 ve 72 saatlik inhibisyon değerleri.

24 saat						
Sisplatin Dosetaksel Doksorubisin Mitoksantron (μ M)	%inhibition Sisplatin	%inhibition Dosetaksel	%inhibition Doksorubisin	%inhibition Mitoksantron	Vulpinik Asit (μ M)	%inhibition Vulpinik Asit
0.1	16,94	57,35	46,24	31,30	10	10,29
1	26,49	58,94	47,74	33,50	25	25,82
10	29,06	60,86	86,31	38,73	50	30,21
50	32,79	65,09	>100	26,75	75	37,60
100	38,31	69,14	>100	51,34	100	56,25
48 saat						
Sisplatin Dosetaksel Doksorubisin Mitoksantron (μ M)	%inhibition Sisplatin	%inhibition Dosetaksel	%inhibition Doksorubisin	%inhibition Mitoksantron	Vulpinik Asit (μ M)	%inhibition Vulpinik Asit
0.1	8,76	59,33	83,01	56,45	10	52,48
1	11,03	46,62	85,90	67,86	25	58,69
10	9,67	35,62	97,25	88,91	50	59,86
50	1,25	36,27	>100	86,52	75	71,88
100	6,10	42,633	>100	96,01	100	73,03
72 saat						
Sisplatin Dosetaksel Doksorubisin Mitoksantron (μ M)	%inhibition Sisplatin	%inhibition Dosetaksel	%inhibition Doksorubisin	%inhibition Mitoksantron	Vulpinik Asit (μ M)	%inhibition Vulpinik Asit
0.1	16,56	62,40	94,81	>100	10	78,72
1	22,59	65,46	94,55	>100	25	88,035
10	17,01	61,80	97,51	>100	50	89,79
50	9,45	58,95	>100	>100	75	>100
100	11,19	59,46	>100	>100	100	>100

İnhibisyon sonuçları doğrultusunda MCF-7 hücre hattı için konsantrasyonlar vulpinik vsit (VA) 25-150 μ M, doksorubisin (DOX) ve mitoksantron (MIX) için ise 0,05-10 μ M olarak belirlenmiştir.

Meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231 üzerine ilk aşamada 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde doksorubisin, mitoksantron ve vulpinik asit ayrı ayrı uygulanmıştır. 72 saat sonunda hücreler tamamen öldüğü için ölçüm alınamamıştır. Bu nedenle 72 saatlik doz aralığı verilmemiştir. Uygulama sonucunda her bir hücre hattında kemoterapötik ilaçların ve vulpinik asitin inhibisyon değerleri Tablo 4.2' de doz-zaman bağımlı olarak verilmiştir.

Tablo 4. 2. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine Doksorubisin, Mitoksantron ve Vulpinik Asitin 24 ve 48 saatlik inhibisyon değerleri.

24 saat				
Doksorubisin/ Mitoksantron (μM)	%İnhibisyon Doksorubisin	%İnhibisyon Mitoksantron	Vulpinik Asit (μM)	%İnhibisyon Vulpinik Asit
0.05	61,77	41,93	5	18,94
0.1	60,01	48,64	10	29,53
1	68,45	58,24	25	31,99
10	77,80	83,68	50	38,11
50	98,67	85,57	100	49,57
100	>100	92,02	150	70,72
48 saat				
Doksorubisin/ Mitoksantron (μM)	%İnhibisyon Doksorubisin	%İnhibisyon Mitoksantron	Vulpinik Asit (μM)	%İnhibisyon Vulpinik Asit
0.05	69,09	40,82	5	26,84
0.1	73,45	49,0	10	38,90
1	77,83	59,22	25	34,35
10	91,23	90,98	50	39,37
50	>100	91,78	100	63,89
100	>100	>100	150	76,89

İnhibisyon sonuçları doğrultusunda MDA-MB-231 hücre hattı için konsantrasyonlar vulpinik asit (VA) 5-150 μ M, doksorubisin (DOX) ve mitoksantron (MIX) için ise 0,05-100 μ M olarak belirlenmiştir.

Meme kanseri hücre hatları MDA-MB-453 üzerine ilk aşamada 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde doksorubisin, mitoksantron ve vulpinik asit ayrı ayrı uygulanmıştır. 72 saat sonunda hücreler tamamen inhibe edildiği için ölçüm alınamamıştır. Bu nedenle 72 saatlik doz aralığı verilmemiştir. Uygulama sonucunda her bir hücre hattında kemoterapötik ilaçların ve vulpinik asitin inhibisyon değerleri Tablo 4.3' de doz-zaman bağımlı olarak verilmiştir.

Tablo 4. 3. MDA-MB-453 hücre hattı üzerine doksorubisin, mitoksantron ve vulpinik asitin 24 ve 48 saatlik inhibisyon değerleri.

24 saat				
Doksorubisin/ Mitoksantron (μ M)	%İnhibisyon Doksorubisin	%İnhibisyon Mitoksantron	Vulpinik Asit (μ M)	%İnhibisyon Vulpinik Asit
0,05	2,63	20,16	5	23,06
0,1	2,66	41,66	10	28,46
0,5	12,53	30,72	25	40,04
1	23,51	41,93	50	48,72
5	49,36	80,88	100	54,96
10	56,26	90,68	150	59,38
25	71,52	93,48		
50	84,12	97,41		
48 saat				
Doksorubisin/ Mitoksantron (μ M)	%İnhibisyon Doksorubisin	%İnhibisyon Mitoksantron	Vulpinik Asit (μ M)	%İnhibisyon Vulpinik Asit
0,05	4,28	25,64	5	27,91
0,1	4,94	27,87	10	32,14
0,5	14,42	37,83	25	43,01
1	25,07	44,63	50	56,74
5	68,33	85,74	100	60,11
10	79,40	93,78	150	74,01
25	84,51	96,61		
50	91,92	98,01		

4.2. Kemoterapötik İlaçların Vulpinik Asit ile Kombinasyon İndeks Değerlerinin Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine VA ve kemoterapötik ilaçların doz-zaman bağımlı XTT çalışması sonuçları doğrultusunda her üç hücre hattı üzerine belirlenen konsantrasyonlarda VA-DOX ve VA-MIX kombinasyonları uygulanarak 48 saatlik inkübasyon sonucuna göre kombinasyon indeks (CI) değerleri CompuSyn programı ile belirlenmiştir. Bu aşamadan sonraki tüm çalışmalar VA'nın her bir kemoterapötik ilaç ile sergilemiş olduğu sinerjik etki ($CI < 1$) gösterdiği dozlar üzerinden devam ettirilmiştir.

MCF-7 hücre hattı üzerinde uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon indeks değerleri Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4. 4. MCF-7 hücre hattı üzerinde VA+DOX ve VA+MIX'in CI değerleri

VA+DOX			VA+MIX		
Konsantrasyon (μ M)	Absorbans	CI değeri	Konsantrasyon (μ M)	Absorbans	CI değeri
25-0,05	0,394	4,732	25-0,05	0,313	2,123
50-0,1	0,222	1,725	50-0,1	0,211	1,369
75-1	0,144	4,190	75-1	0,143	3,362
100-5	0,064	2,623	100-5	0,068	2,169
150-10	0,070	6,373	150-10	0,050	1,980

MCF-7 hücre hattı üzerine uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının beş farklı dozu (25-0,05, 50-0,1, 75-1, 100-5 ve 150-10 μ M) 48 saatlik inkübasyon sonrasında absorbans değerleri alınarak CI değerleri CompuSyn programı ile belirlenmiştir. MCF-7 hücre hattı üzerinde uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarından elde edilen CI değerleri bu kombinasyonların tüm dozlarında antagonistik etki sergilediğini göstermiştir.

MDA-MB-231 hücre hattı üzerine uygulanan kombinasyon konsantrasyonları ve CI değerleri Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4. 5. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX konsantrasyon ve CI değerleri

VA+DOX			VA+MIX		
Konsantrasyon (μ M)	Absorbans	CI değeri	Konsantrasyon (μ M)	Absorbans	CI değeri
5-0,1	0,459	0,713	5-0,1	0,317	0,162
10-0,5	0,413	2,207	10-0,5	0,360	0,639
25-1	0,349	2,784	25-1	0,247	0,785
50-5	0,153	1,808	50-5	0,109	0,907
100-10	0,107	2,002	100-10	0,127	2,161

MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının dozları (5-0,1, 10-0,5, 25-1, 50-5 ve 100-10 μ M) 48 saatlik inkübasyon sonrasında absorbans değerleri alınarak CI değerleri CompuSyn programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda CI değerlerine bakıldığında MDA-MB-231 hücre hattında VA+DOX kombinasyonları içerisinde en düşük dozlar olan 5-0,1 μ M dozu orta sinerjik etki gösterirken diğer dört doz antagonistik etki göstermiştir. Aynı hücre hattı üzerine uygulanan VA+MIX dozlarından ise en düşük doz (5-0,1 μ M) güçlü sinerjik etki, uygulanan ikinci ve üçüncü dozlar (10-0,5 μ M ve 25-1 μ M) sinerjik etki, dördüncü doz (50-5 μ M) ise hafif sinerjik etki sergilediği görülmüştür.

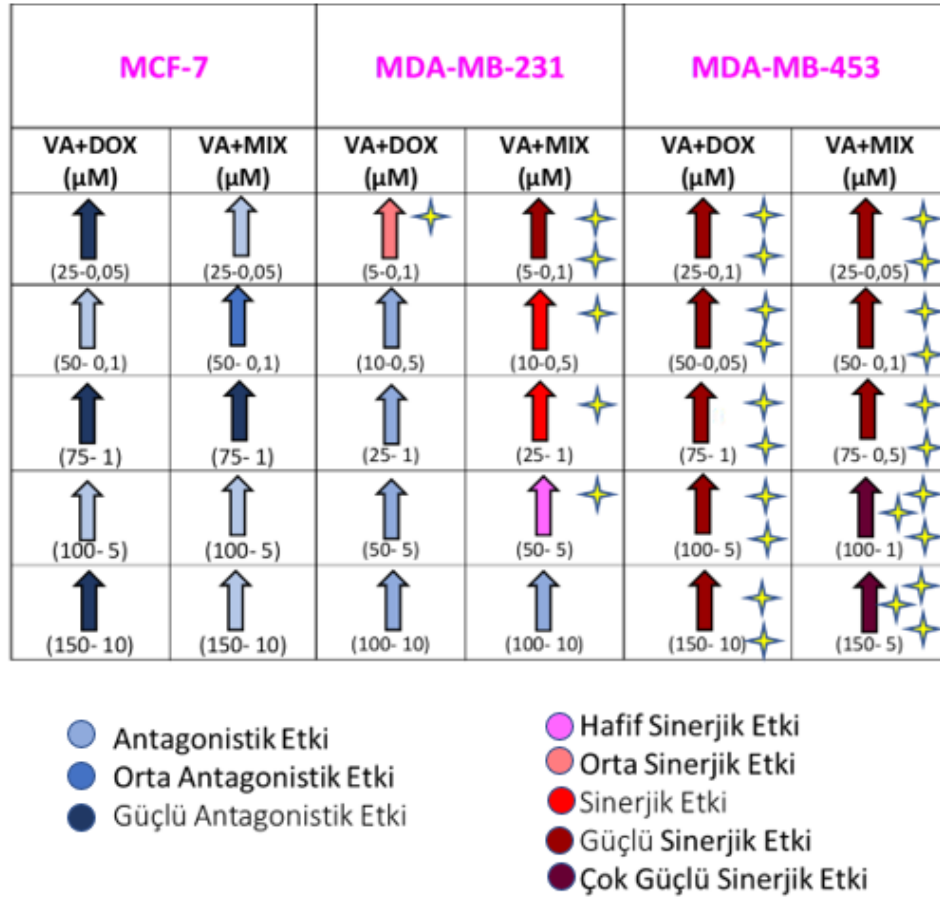
MDA-MB-453 hücre hattı üzerine uygulanan kombinasyon konsantrasyonları ve CI değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4. 6. MDA-MB-453 üzerine VA+DOX ve VA+MIX konsantrasyon ve CI değerleri

VA+DOX			VA+MIX		
Konsantrasyon (μ M)	Absorbans	CI değeri	Konsantrasyon (μ M)	Absorbans	CI değeri
25-0,1	0,146	0,174	25-0,05	0,105	0,119
50-0,5	0,118	0,295	50-0,1	0,086	0,192
75-1	0,083	0,303	75-0,5	0,034	0,115
100-5	0,0388	0,203	100-1	0,0188	0,087
150-10	0,0150	0,113	150-5	0,0073	0,054

MDA-MB-453 hücre hattı üzerine 48 saatlik inkübasyon süresince uygulanan VA+DOX (25-0,1, 50-0,5, 75-1, 100-5 ve 150-10 μ M) dozları ve VA+MIX (25-0,05, 50-0,1, 75-

0,5, 100-1 ve 150-5 μM) dozlarının tamamında sinerjik etki gözlenmiştir. VA+DOX uygulanan tüm dozları güçlü sinerjik etki sergilerken, VA+MIX uygulanan ilk üç dozu (25-0,05 μM , 50-0,1 μM ve 75-0,5 μM) güçlü sinerjik etki, son iki dozu ise (100-1 μM ve 150-5 μM) çok güçlü sinerjik etki sergilemiştir.



Şekil 4. 1. MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerinde uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyon çalışmaları.

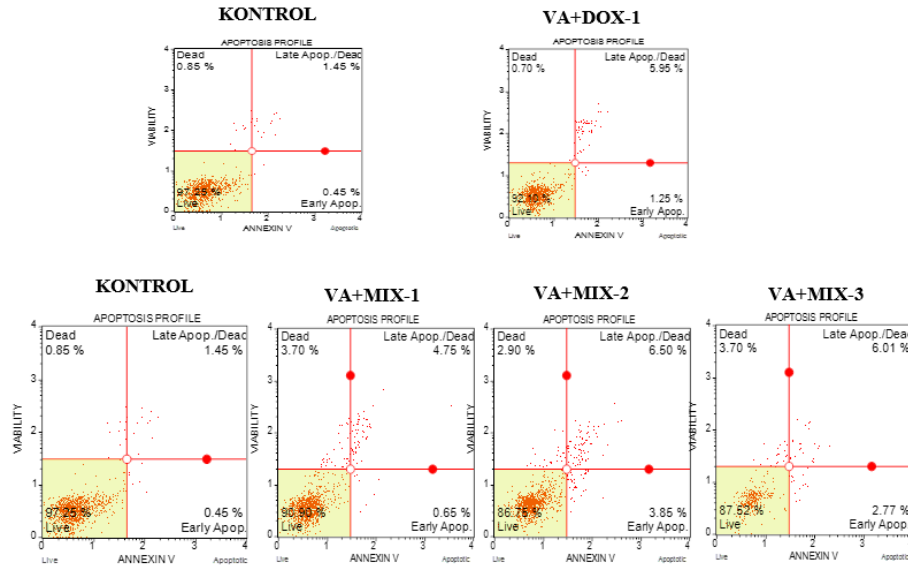
Meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 üzerinde 48 saatlik inkübasyondan sonra VA+DOX ve VA+MIX'in sinerjik etki gösteren dozları sonraki moleküler çalışmalar için uygulanmıştır. Her bir uygulama sonrasında sinerjik etki gösteren dozların her iki meme kanseri hücre hattında oksidatif stres, mitokondriyal membran potansiyeli, çoklu kaspaz aktivasyonu, hücre döngüsü, migrasyon, apoptoz ve PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine etkileri araştırılmıştır.

4.3. Flow Sitometri Çalışmaları

4.3.1. Apoptozis (Annexin V/FITC-PI)

MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının 48 saat uygulanması sonucu apoptotik etkilerinin flow sitometri analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de verilmiştir.

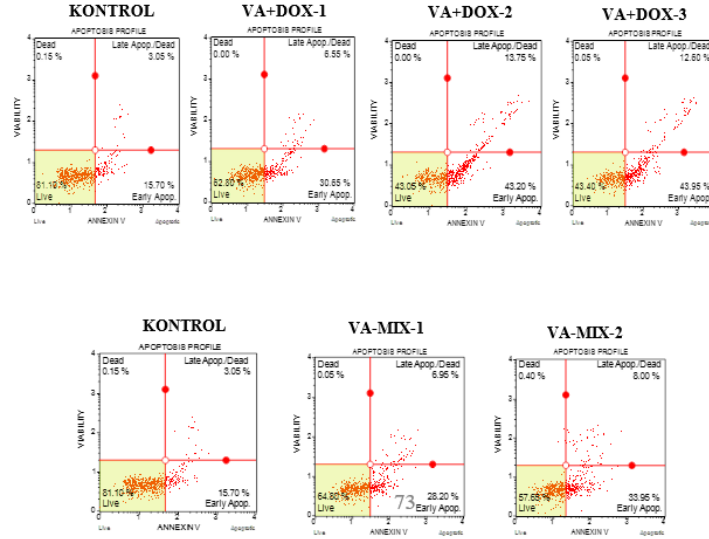
MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerin belirlenmesi için hücreler VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının 48 saatlik uygulama sonrası ANNEXIN V testine tabi tutulmuştur (Şekil 4.2). Yapılan çalışmalar sonucunda kontrol grubunda bulunan hücre popülasyonunun %97,25’i canlı, %0,45’i erken apoptoz, %1,45’i geç apoptoz, toplamda %1,9 total apoptoz gözlenmiştir. Uygulama gruplarında ise VA+DOX (5-0,1 μ M) dozunda hücre popülasyonunun %92,10’u canlı, %1,25’i erken apoptoz, %5,95’i geç apoptoz, toplamda %7,2 (**, $p<0,001$) total apoptoz gözlenmiştir. VA+MIX kombinasyonunun en düşük dozunda (VM-1, 5-0,1 μ M) hücre popülasyonunun %90,90’ı canlı, %0,65’i erken apoptoz, %4,75’i geç apoptoz, toplamda %5,4 (**, $p<0,001$) total apoptoz gözlenmiştir. VA+MIX’in ikinci kombinasyonu (VM-2, 10-0,5 μ M) hücrelere tatbik edildiğinde hücre popülasyonunda %3,85 erken apoptoz, %6,50 geç apoptoz ve toplamda %10,35 (***, $p<0,0001$) total apoptoz gözlenmiştir. VA+MIX uygulanan en son dozunun (VM-3, 25-1 μ M) hücre popülasyonunun %87,52’sinin canlı, %2,77’sinin erken apoptoz, %6,01’inin geç apoptoz, toplamda %8,78 (***, $p<0,0001$) total apoptoz sonuçları elde edilmiştir. Sonuç olarak kontrol grubuna kıyasla uygulama grubu hücrelerinde, VA+DOX ve VA+MIX’in sinerjik etki dozlarının kanser hücrelerini düşük-orta derecede apoptoza yönelttiği görülmüştür.



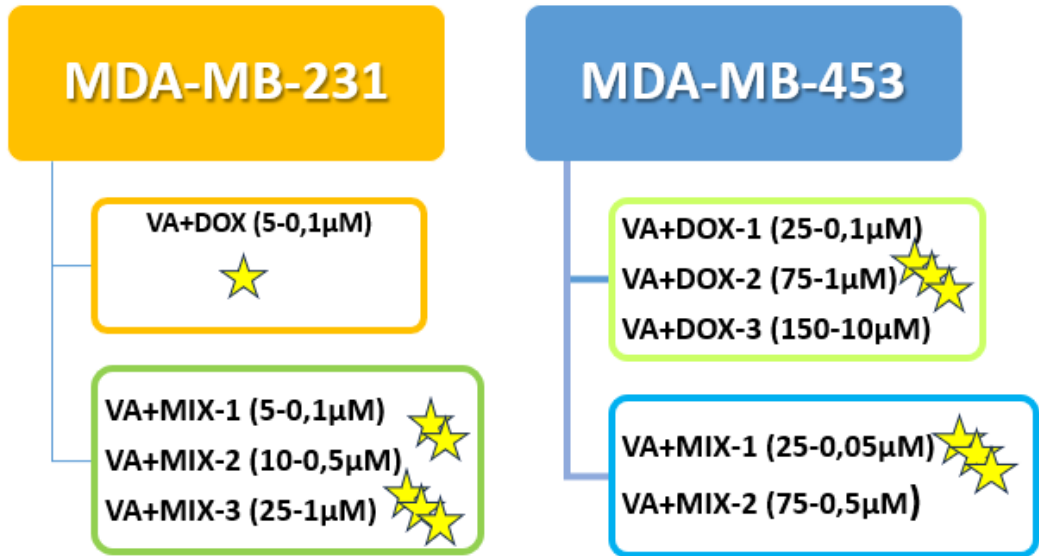
Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının 48 saatlik apoptotik etkileri. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M), VA+MIX-3 (25-1 μ M)'dir.

MDA-MB-453 hücre hattına 48 saatlik inkübasyon süresince uygulanan VA+DOX ve VA+MIX dozlarının hücreler üzerindeki apoptotik etkisini belirleyebilmek için ANNEXİN V testi hücrelere uygulanmıştır (Şekil 4.2). Uygulama sonrası kontrol grubunda bulunan hücrelerdeki hücre popülasyonunun %81,10'u canlı, %15,70'i erken apoptoz, % 3,05'i geç apoptoz, toplamda %18,75 total apoptoz gözlenmiştir. Uygulama grubunda ise, VA+DOX kombinasyonunun ilk dozunda (VD-1, 25-0,1 μ M) hücre popülasyonunun % 62,80'i canlı, %30,65'i erken apoptoz, %6,55'i geç apoptoz, toplamda %37,2 (***, $p<0,0001$) total apoptoz gözlenmiştir. VA+DOX kombinasyonunun ikinci uygulanan dozunda (VD-2, 75-1 μ M) ise hücre popülasyonunun % 43,05'i canlı, %43,20'si erken apoptoz ve %13,75'i geç apoptoz, toplamda %56,95 (****, $p<0,00001$) total apoptoz gözlenmiştir. VA+DOX son uygulanan dozu (VD-3, 150-10 μ M) ise hücre popülasyonunu % 43,40 canlı, %43,95'inin erken apoptoz, %12,60'ının geç apoptoz, toplamda %56,55 (****, $p<0,00001$) total apoptoz gözlenmiştir. VA+MIX dozlarında ise ilk dozda (VM-1, 25-0,05 μ M) hücre popülasyonunun % 64,80'i canlı, %28,20'si erken apoptoz, % 6,95'i geç apoptoz toplamda %35,15 (***, $p<0,0001$) total apoptoz gözlenmiştir. İkinci uygulanan dozda ise (VM-2, 75-0,5 μ M) hücre popülasyonunun %57,65'inin canlı, % 33,95'i erken apoptoz, %8'i geç apoptoz, toplamda %41,95 (****, $p<0,00001$)total apoptoz gözlenmiştir. MDA-MB-453 hücre hattına uygulanan VA+DOX ve VA+MIX sinerjik etki kombinasyon

dozlarının kontrol grubuna göre hücreleri yüksek derecede apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.3. MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik apoptoz etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M), VA+DOX-2 (75-1 μ M), VA+DOX-3 (150-10 μ M), VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (75-0,5 μ M)'dır.

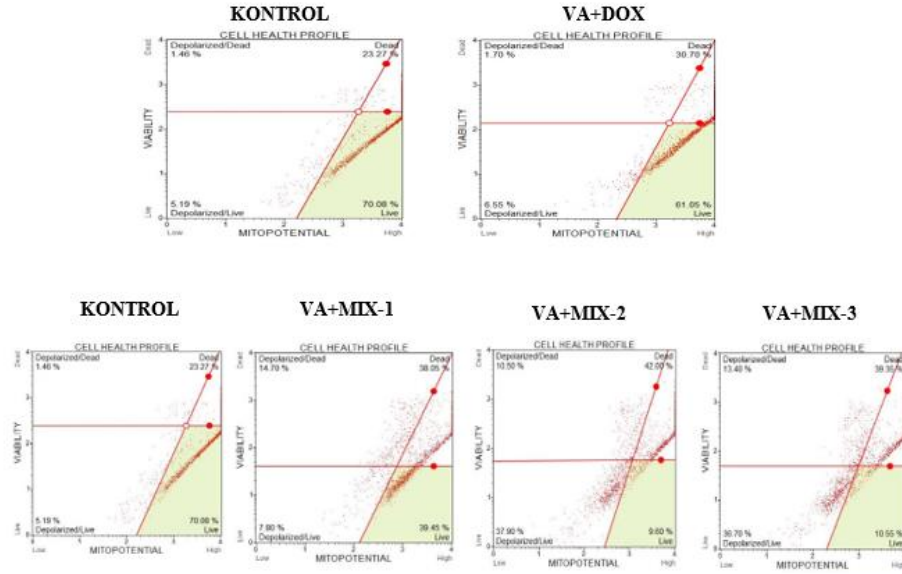


Şekil 4.4. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatları üzerinde vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının apoptoz sonuçları.

4.3.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli

MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının 48 saat uygulanması sonucu mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkilerinin flow sitometri analiz sonuçları sırasıyla Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

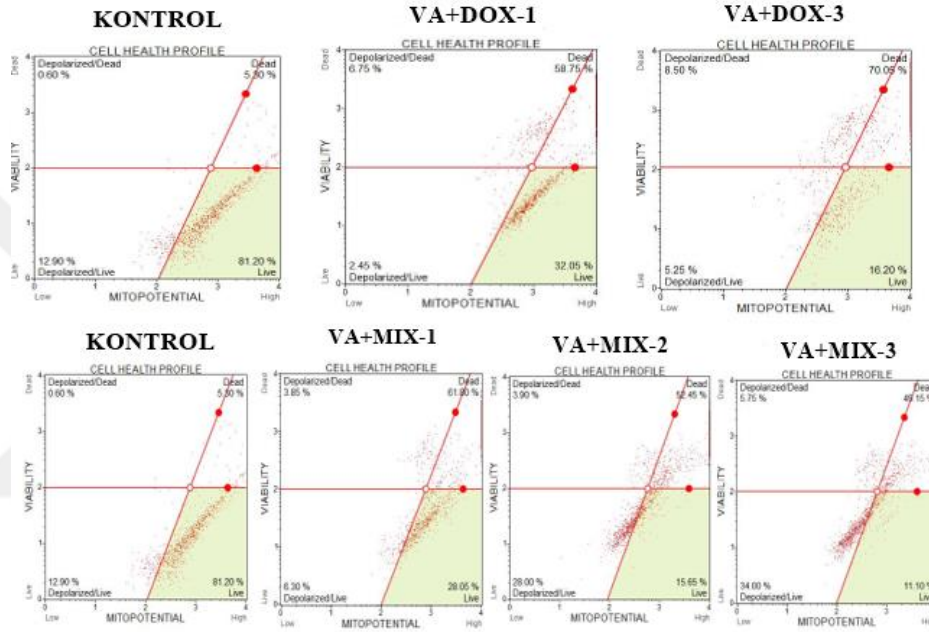
MDA-MB-231 hücre hattı üzerine 48 saatlik inkübasyon süresince uygulanan VA+DOX (VD-1, 5-0,1 μ M) ve VA+MIX (VM-1, 5-0,1 μ M, VM-2, 10-0,5 μ M ve VM-3, 25-1 μ M) dozlarının mitokondri membranında meydana getirdiği farklılık Mitokondriyal Membran Potansiyeli testi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular kontrol grubu hücrelerinde hücre popülasyonunun %70,08'i canlı, %23,27'si ölü, %5,19'u depolarize-canlı, ve %1,46'sının ise depolarize ölü, toplamda %6,65 total depolarize hücre popülasyonu olduğunu göstermiştir. Uygulama grubunda ise VD-1 dozunun hücre popülasyonunun, %61,05'inin canlı, %30,70'inin ölü, %6,55'ini depolarize canlı %1,70'inin depolarize ölü, toplamda %8,25 (*, $p<0,01$) total depolarize hücre popülasyonu olduğu belirlenmiştir. VA+MIX dozlarında ise VM-1 dozunda hücre popülasyonunun %39,45'i canlı, %38,05'i ölü ve %7,80'i depolarize canlı, %14,70'inin depolarize ölü, toplamda %22,5 (***, $p<0,0001$) total depolarize hücre popülasyonu olduğu, VM-2 dozuna tabi tutulan hücre popülasyonunun %9,60'ı canlı, %42'si ölü ve %37,90'ı depolarize canlı, %10,05'inin depolarize ölü, toplamda %47,95 (***, $p<0,0001$) total depolarize hücre popülasyonu olduğu, uygulanan VM-3 dozunda ise hücre popülasyonunun %10,55'i canlı, %39,35'i ölü ve %36,70'i depolarize canlı, %13,40'ı depolarize ölü, toplamda %50,1 (***, $p<0,0001$) total depolarize hücre popülasyonu olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak kontrol grubuna kıyasla uygulanan VD kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinde oldukça düşük bir değişiklik göstermiştir (*, $p<0,01$). Öte yandan her bir VM kombinasyonunda membran potansiyelinin yüksek derecede depolarize olduğu belirlenmiştir (***, $p<0,0001$).



Şekil 4.5. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişimlerin etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M), VA+MIX-3 (25-1 μ M)'dir.

MDA-MB-453 hücre hattı üzerine 48 saatlik inkübasyon süresince uygulanan VA+DOX (VD-1, 25-0,1 μ M ve VD-3 150-10 μ M) ve VA+MIX (VM-1, 25-0,05 μ M, VM-2, 75-0,5 μ M ve VM-3 150-5 μ M) dozlarının mitokondri membranında meydana getirdiği farklılık Mitokondriyal Membran Potansiyeli testi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular kontrol grubu hücrelerindeki hücre popülasyonunun %81,20'si canlı, %5,30'u ölü ve %12,90'ı depolarize canlı, %0,60'ı depolarize ölü, toplamda %13,5 total depolarize hücre popülasyonu olduğu belirlenmiştir. Uygulama grubunda ise VA+DOX dozlarına bakıldığında VD-1 dozunda hücre popülasyonunun %32,05'i canlı, %58,75'i ölü ve %2,45'i depolarize canlı, %6,75'i depolarize ölü, toplamda %9,2 (**, $p < 0,001$) total depolarize hücre popülasyonu olduğu, VD-3 dozunda ise hücre popülasyonunun %16,20'si canlı, %70,05'i ölü ve %5,25'i depolarize canlı, %8,50'sinin depolarize ölü toplamda %13,75 (ns, $p < 0,05$) total depolarize hücre popülasyonu olduğu belirlenmiştir. VA+MIX dozlarına bakıldığında VM-1 dozunda hücre popülasyonunun %28,05'i canlı, %61,80'i ölü ve %6,30'u depolarize canlı, %3,85'i depolarize ölü, toplamda %10,15 (**, $p < 0,001$) total depolarize hücre popülasyonu olduğu, VM-2 dozunda ise hücre popülasyonunun %15,65'i canlı, %52,45'i ölü ve %28' depolarize canlı, %3,90'ı depolarize ölü, toplamda %31,90 (***, $p < 0,0001$) total depolarize hücre popülasyonu olduğu, VM-3 dozundaki hücre popülasyonunun ise %11,10'u canlı, %49,15'i ölü ve

%34'ü depolarize canlı, %5,75'i depolarize ölü, toplamda %39,75 (***, $p<0,0001$) total depolarize hücre popülasyonu olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak kontrol grubu hücrelerine kıyasla VD'nin her iki dozu da 48 saat inkübasyondan sonra MDA-MB-453 hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyellerinde anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Öte yandan VM'nin ikinci ve üçüncü kombinasyonları istatistiksel olarak mitokondriyal membran potansiyelini yüksek derecede değiştirdiği belirlenmiştir (***, $p<0,0001$).



Şekil 4.6. MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişimlerin etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M), VA+DOX-3 (150-10 μ M), VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (75-0,5 μ M), VA+MIX-3 (150-5 μ M)'dir.

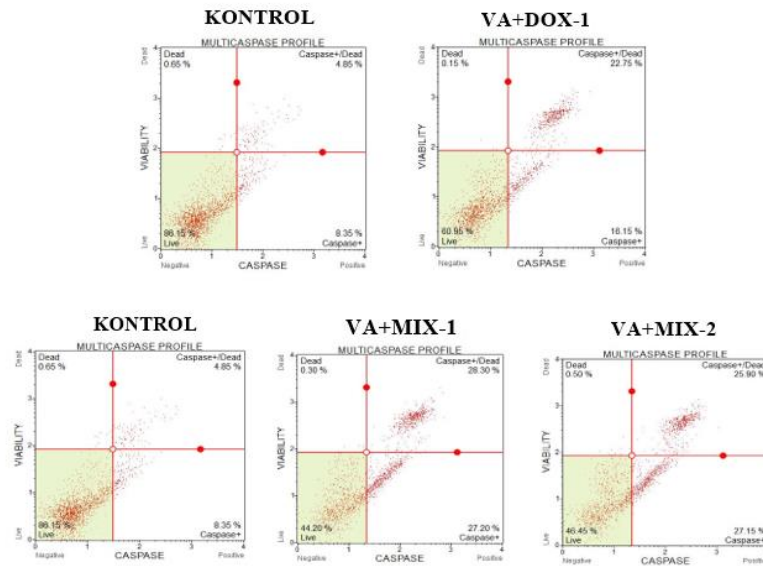
	VA+DOX	VA+MIX
MDA-MB-231	VD-1 (5-0,1 μ M)	VM-1 (5-0,1 μ M)
	ns	VM-2 (10-0,5 μ M)
MDA-MB-453	VD-1 (25-0,1 μ M)	VM-3 (25-1 μ M)
	VD-3 (150-10 μ M)	VM-1 (25-0,05 μ M)
		VM-2 (75-0,5 μ M)
		VM-3 (150-5 μ M)

Şekil 4.7. MDA-MB-453 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerine vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri.

4.3.3. Multikaspaz Aktivitesi

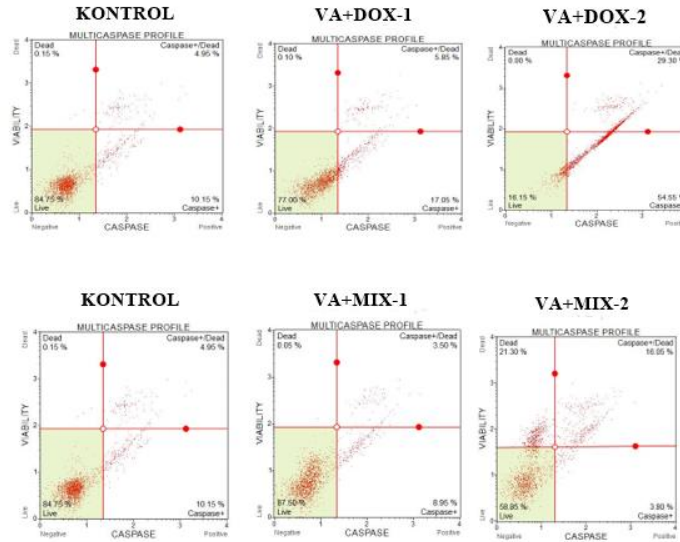
MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine VA+DOX ve VA+MIX'in farklı kombinasyonları 48 saat süreyle uygulanmış ve bu kombinasyonların multi-kaspaz aktiviteleri flow sitometri analizleriyle belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Şekil 4.8'de görüldüğü üzere MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubu hücrelerinin %86,15'i canlı, %0,65'inin ise ölü, %8,35'i casp+, %4,85'i casp+/ölü, toplamda ise %13,2 total kaspaz hücre popülasyonu olduğu görülmektedir. VD-1 (5-0,1 μ M) uygulama grubunda hücre popülasyonunun %60,95'i canlı, %0,15'inin ölü, %16,5'i casp+, %22,75'i casp+/ölü ve toplamda %39,25 (***, p<0,0001) total kaspaz hücre popülasyonu olduğu görülmektedir. VA+MIX uygulama grubunda ise VM-1 (5-0,1 μ M) kombinasyonunda hücre popülasyonunun %44,20 canlı, %0,30 ölü, %27,20 casp+, %28,30 casp+/ölü ve toplamda %55,50 (***, p<0,0001) total kaspaz hücre popülasyonu olduğu, VM-2 (10-0,5 μ M) kombinasyonunda ise hücre popülasyonunun %46,45 canlı, %0,50 ölü, %27,15 casp+, %25,90 casp+/ölü ve toplamda ise %53,05 (***, p<0,0001) total kaspaz hücre popülasyonu olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak kontrol grubuna kıyasla her iki VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücrelerinde multi-kaspaz aktivitesini önemli derecede artırdığı görülmüştür.

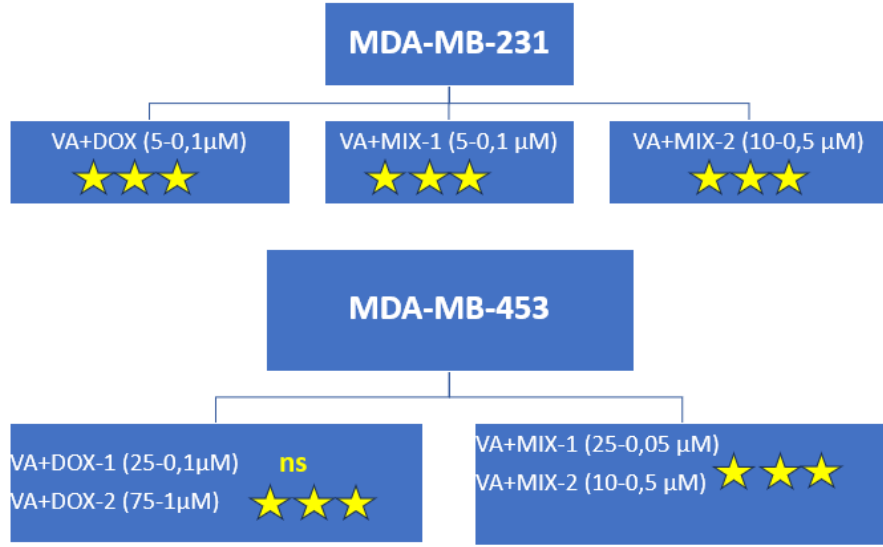


Şekil 4.8. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik multikaspaz aktivitesine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dır.

Şekil 4.9’da görüldüğü üzere MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubu hücrelerinin %84,75 canlı, %0,15 ölü, %10,15 casp+, %4,95 casp+/ölü ve toplamda %15,1 total kaspaz hücre popülasyonu olduğu belirlenmiştir. Uygulama dozlarında ise VD-1 (25-0,1 μ M) dozundaki hücre popülasyonunun %77 canlı, %0,10 ölü, %17,05 casp+, %5,85 casp+/ölü ve toplamda %22,9 (**, $p<0,001$) total kaspaz hücre popülasyonu olduğu, VD-2 (75-1 μ M) dozundaki hücre popülasyonunun ise %16,15 canlı, %54,55 casp+, %29,30 casp+/ölü, toplamda %83,85 (****, $p<0,00001$) total kaspaz hücre popülasyonu olduğu, VA+MIX dozlarında ise VM-1 (25-0,05 μ M) dozundaki hücre popülasyonunun %87,50 canlı, %0,05 ölü, %8,95 casp+, %3,50 casp+/ölü ve toplamda %12,45 (*, $p<0,01$) total kaspaz hücre popülasyonu olduğu, VM-2 (75-0,5 μ M) dozundaki hücre popülasyonunun %58,85 canlı, %21,30 ölü %3,80 casp+, %16,05 casp+/ölü ve toplamda %19,85 (*, $p<0,01$) total kaspaz hücre popülasyonu olduğu, olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında uygulama grubunda kullanılan VD-2 dozunun önemli derecede MDA-MB-453 hücre hattı üzerinde kaspaz aktivitesini artırdığı, uygulamada kullanılan diğer VA+DOX ve VA+MIX sinerjik etki kombinasyonlarında da MDA-MB-453 hücre hattı üzerinde kaspaz aktivitesini artırdığı belirlenmiştir.



Şekil 4.9. MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik multikaspaz aktivitesine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M), VA+DOX-2 (75-1 μ M), VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (75-0,5 μ M)’dir.

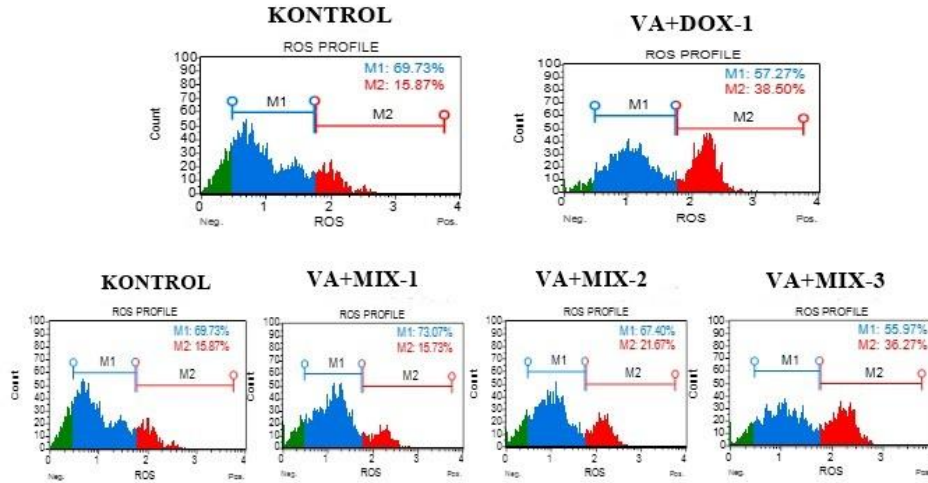


Şekil 4.10. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının multikaspoz aktivite üzerindeki etkileri.

4.3.4. Reaktif Oksijen Türleri

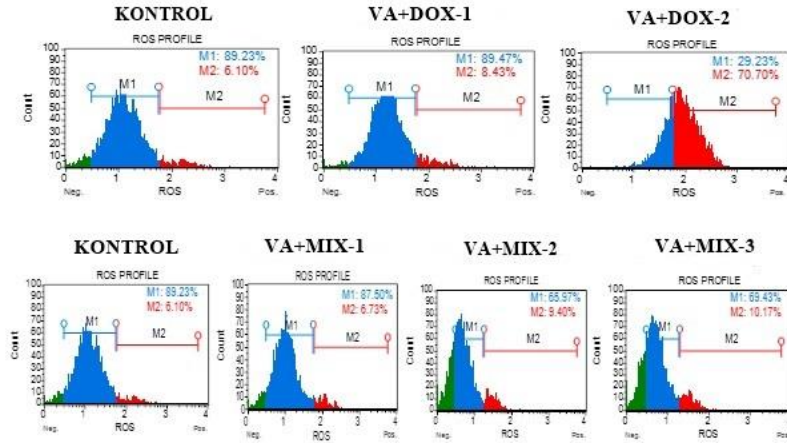
MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonları 48 saat süreyle uygulanmış ve bu kombinasyonların reaktif oksijen türleri üzerindeki değişimleri flow sitometri analizleriyle belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX (5-0,1 µM) ve VA+MIX (5-0,1 µM, 10-0,5 µM, 25-1 µM) kombinasyonlarının ROS üzerindeki etkilerini belirlemek için uygulama yapılmıştır. Uygulama sonucunda elde edilen grafiklerde yer alan M1; Canlı ve ROS’un negatif olduğu hücre popülasyonunu, M2 ise ROS+ sergileyen hücre popülasyonunu göstermektedir. Bu kapsamda hücre MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının ROS değişimleri belirlenmiştir. Kontrol grubu hücrelerinin ROS popülasyonuna bakıldığında M1 %69.73, M2 %15.87 olduğu belirlenmiştir. Uygulama grubunda VD-1 dozunda M1 %57.27, M2 %38.50 (***, $p<0,0001$) olduğu, VM-1 kombinasyonunda M1 %73.07, M2 %15.73 (ns, $p<0,05$) olduğu, VM-2 kombinasyonunda M1 %67.40, M2 %21.67 (**, $p<0,001$) olduğu, VM-3 kombinasyonunda M1 %55.97, M2 %36.27 (***, $p<0,0001$) olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, kontrole göre kıyaslandığında VD-1 ve VM-3 dozlarının ROS miktarını artırdığı, VM-2 dozunda ROS’un kısmen arttığı ve VM-1 dozunda ise anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 4.11. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik reaktif oksijen türleri üzerine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M), VA+MIX-3 (25-1 μ M)'dir.

MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX (VD-1, 25-0,1 μ M ve VD-2, 75-1 μ M) ve VA+MIX (25-0,05 μ M, 75-0,5 μ M, 150-5 μ M) kombinasyonlarının ROS üzerindeki etkilerini belirlemek için uygulama yapılmıştır. Uygulama sonucunda elde edilen grafiklerde yer alan M1; Canlı ve ROS'un negatif olduğu hücre popülasyonunu, M2 ise ROS'un pozitif olduğunu sergileyen hücre popülasyonunu göstermektedir. Bu kapsamda hücre MDA-MB-453 hücre hattına uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının ROS değişimleri belirlenmiştir. Kontrol grubu hücrelerinin ROS popülasyonuna bakıldığında M1 %89.23, M2 %6.10 olduğu belirlenmiştir. Uygulama grubunda VD-1 kombinasyonunda M1 %89.47, M2 %8.43 (*, $p < 0,01$) olduğu, VD-2 kombinasyonunda M1 %29.23, M2 %70.70 (****, $p < 0,00001$) olduğu, VM-1 kombinasyonunda M1 %87.50, M2 %6.73 (ns, $p < 0,05$) olduğu, VM-2 kombinasyonunda M1 %65.97, M2 %9.40 (*, $p < 0,01$) olduğu, VM-3 kombinasyonunda M1 %69.43, M2 %10.17 (*, $p < 0,01$) olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, kontrole göre kıyaslandığında özellikle VD-2 kombinasyonunun hücrelerinde oldukça önemli derecede ROS'u artırdığı, VM-1 kombinasyonunda kontrole göre anlamlı bir değişim gözlemlenmediği, VD-1, VM-2 ve VM-3 kombinasyonlarında ROS miktarını kısmen artırdığı belirlenmiştir.



Şekil 4.12. MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik reaktif oksijen türleri üzerine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M), VA+DOX-2 (75-1 μ M), VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (75-0,5 μ M), VA+MIX-2 (150-5 μ M)'dir.

	VA+DOX	VA+MIX
MDA-MB-231	VD-1 (5-0,1 μ M)	VM-1 (5-0,1 μ M) ns
		VM-2 (10-0,5 μ M)
		VM-3 (25-1 μ M)
MDA-MB-453	VD-1 (25-0,1 μ M) ns	VM-1 (25-0,05 μ M) ns
	VD-2 (75-1 μ M)	VM-2 (75-0,5 μ M)
		VM-2 (150-5 μ M)

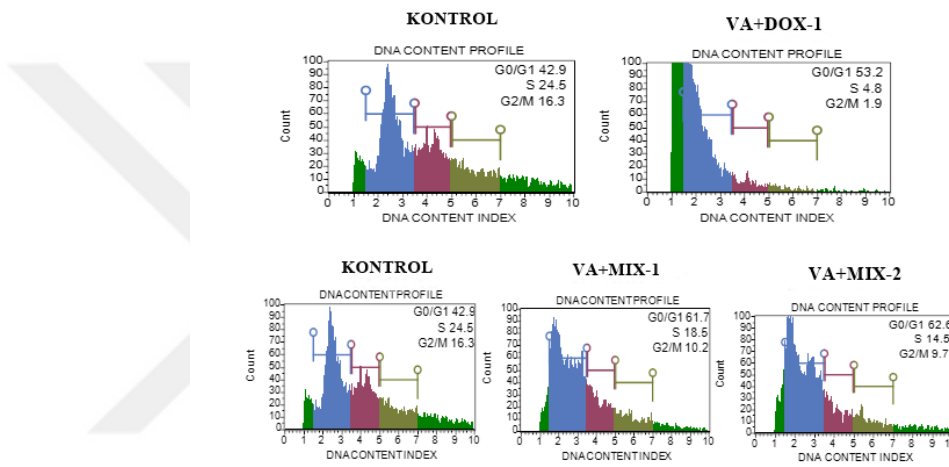
Şekil 4.13. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının ROS üzerine etkileri.

4.3.5. Hücre Döngüsü

MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonları 48 saat süreyle uygulanmış ve bu kombinasyonların hücre döngüsü üzerindeki değişimleri flow sitometri analizleriyle belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de verilmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattı üzerine 48 saatlik inkübasyon süresince uygulanan VA+DOX (VD-1, 5-0,1 μ M) ve VA+MIX (VM-1, 5-0,1 μ M ve VM-2, 10-0,5 μ M) dozlarının hücre döngüsü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Uygulama sonrasında kontrol grubu hücrelerinin hücre döngüsü esnasında hücre popülasyonlarının tutulma yerleri ve oranları; G0/G1 noktasında %42.9, S noktasında %24.5, G2/M noktasında %16.3 olarak

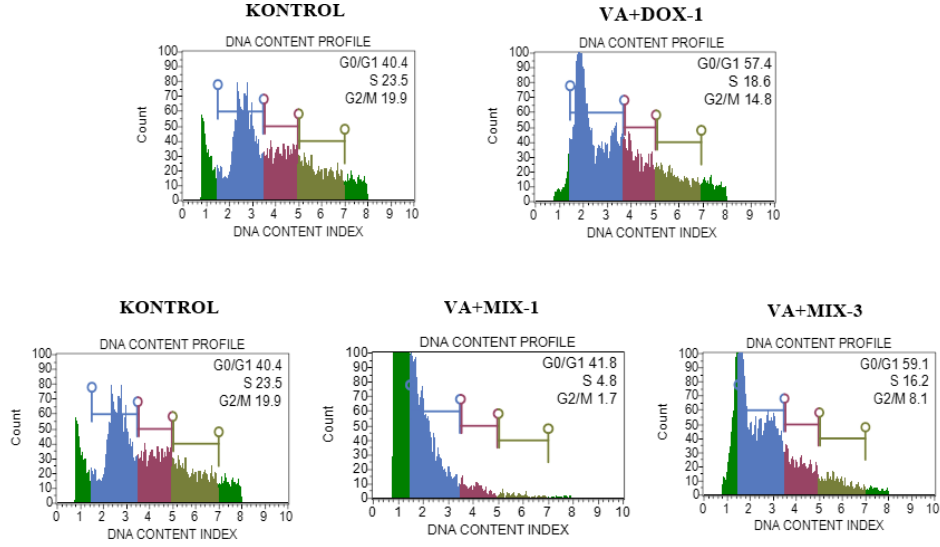
belirlenmiştir. Uygulama grubunda ise VD-1 dozunda hücre popülasyonu; G0/G1 noktasında %53.2 (**, $p<0,001$), S noktasında %4.8, G2/M noktasında %1.9, VM-1 dozunda hücre popülasyonu; G0/G1 noktasında %61.7 (***, $p<0,0001$), S noktasında %18.5, G2/M noktasında %10.2, VM-2 dozunda hücre popülasyonu; G0/G1 noktasında %62.6 (***, $p<0,0001$), S noktasında %14.5, G2/M noktasında %9.7 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak MDA-MB-231 hücreleri üzerine uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının, uygulama sonucunda kontrol grubuyla kıyaslandığında hücrelerin G0/G1 fazında tutuldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.14. MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dır.

MDA-MB-453 hücre hattı üzerine 48 saatlik inkübasyon süresince uygulanan VA+DOX (VD-1, 25-0,1 μ M) ve VA+MIX (VM-3, 150-5 μ M) dozlarının hücre döngüsü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Uygulama sonrasında Kontrol grubu hücrelerinin hücre döngüsü esnasında hücre popülasyonlarının tutulma yerleri ve oranları; G0/G1 noktasında %40.4, S noktasında %23.5, G2/M noktasında %19.9 olarak belirlenmiştir. Uygulama grubunda ise VD-1 kombinasyonunda hücre popülasyonu; G0/G1 noktasında %57.4 (***, $p<0,0001$), S noktasında %18.6, G2/M noktasında %14.8, VM-1 kombinasyonunda hücre popülasyonu; G0/G1 noktasında %41.8 (ns, $p<0,05$), S noktasında %4.8, G2/M noktasında %1.7, VM-3 kombinasyonunda hücre popülasyonu; G0/G1 noktasında %59.1 (***, $p<0,0001$), S noktasında %16.2, G2/M noktasında %8.1 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak MDA-MB-453 hücreleri üzerine uygulanan VA+DOX ve VA+MIX

kombinasyonlarından VD-1 ve VM-3 kombinasyonlarının hücre döngüsünde hücre popülasyonlarını önemli derecede G0/G1 fazında tutuldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.15. MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının 48 saatlik hücre döngüsü üzerine etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M), VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-3 (150-5 μ M)'dır.

	VA+DOX (G0/G1)	VA+MIX (G0/G1)
MDA-MB-231	VD-1 (5-0,1 μ M)	VM-1 (5-0,1 μ M)
		VM-2 (10-0,5 μ M)
	VD-1 (25-0,1 μ M)	VM-1 (25-0,05 μ M) ns
MDA-MB-453		VM-3 (150-5 μ M)

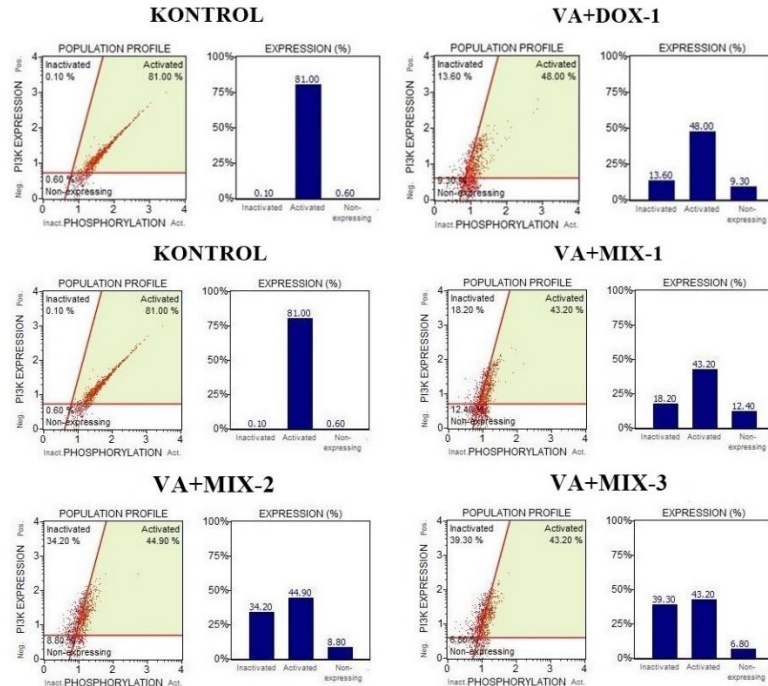
Şekil 4.16. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının hücre döngüsü üzerine etkileri.

4.3.6. PI3K/AKT Sinyal Yolu

MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının PI3K/AKT sinyal yolu üzerine etkisinin zaman bağımlı olarak uygulanması sonucu elde edilen bulgular Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.

Şekil 4.17'de görüldüğü üzere MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubu hücrelerinin %81 aktif, %0,1 inaktif ve %0,60 ekspresyona uğramayanlar olduğu belirlenmiştir.

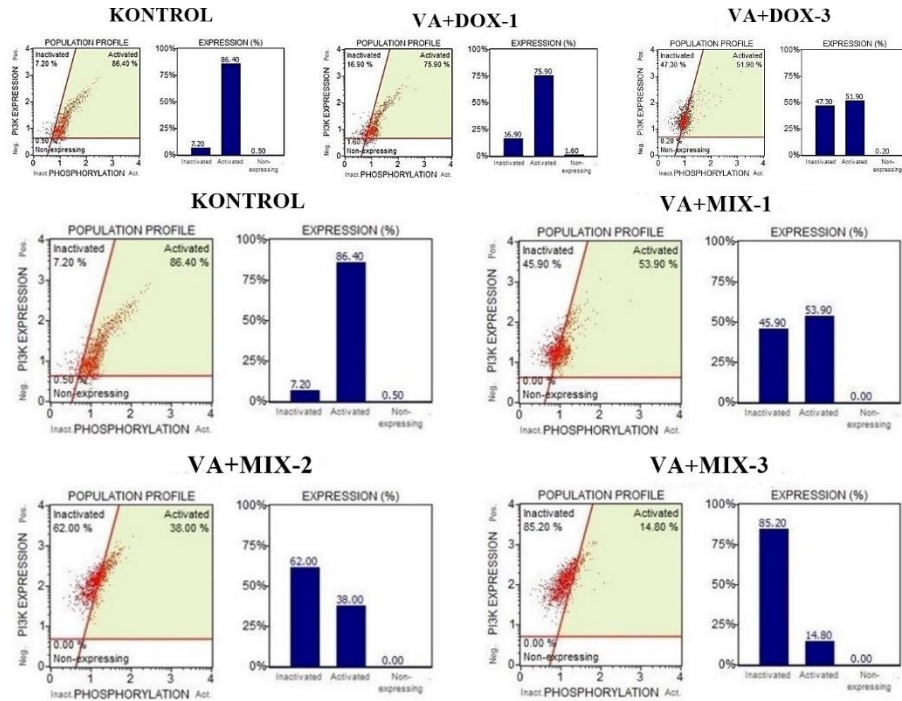
Uygulama grubunda ise VA+DOX (VD-1, 5-0,1 μ M) hücre popülasyonunda %48 aktif, %13,60 (***, $p<0,0001$) inaktif ve %9,30'unun ekspresyona uğramayanlar olduğu belirlenmiştir. VA+MIX (VM-1, 5-0,1 μ M/ VM-2, 10-0,5 μ M/ VM-3 25-1 μ M) kombinasyonlarında ise VM-1 kombinasyonunda hücre popülasyonunun %43,20 aktif, %18,20 (***, $p<0,0001$) inaktif ve %12,40 ekspresyona uğramayanlar olduğu, VM-2 kombinasyonunda hücre popülasyonunun %44,90 aktif, %34,20 (****, $p<0,00001$) inaktif ve %8,80 ekspresyona uğramayanlar olduğu, VM-3 kombinasyonunda hücre popülasyonunun %43,20 aktif, %39,30 (****, $p<0,00001$) inaktif ve %6,80 ekspresyona uğramayanlar olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının oldukça önemli derecede PI3K/AKT sinyal yolağını inhibe ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.17. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolağı ekspresyon grafikleri. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dir.

Şekil 4.18'de görüldüğü üzere MDA-MB-453 hücre hattı üzerine uygulanan VA+DOX (VD-1, 25-0,1 μ M/ VD-3 150-10 μ M) ve VA+MIX (VM-1, 25-0,05 μ M/ VM-2 75-0,5 μ M/ VM-3 150-5 μ M) kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolağı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kontrol grubu hücre popülasyonunun %86,40 aktif, %7,20 inaktif ve %0,50 ekspresyona uğramayanlar olduğu belirlenmiştir. Uygulama grubunda VD-1

kombinasyonunda hücre popülasyonunun %75,90 aktif, %16,90 (**, $p<0,001$) inaktif ve %1,60 ekspresyona uğramayan, VD-3 kombinasyonunda hücre popülasyonunun %51,90 aktif, %47,30 (***, $p<0,0001$) inaktif ve %0,20 ekspresyona uğramayan olduğu belirlenmiştir. VM-1 kombinasyonunda hücre popülasyonunun %53,90 aktif, %45,90 (***, $p<0,0001$) inaktif, VM-2 kombinasyonunda hücre popülasyonunun %38 aktif, %62 (****, $p<0,00001$) inaktif, VM-3 kombinasyonunda hücre popülasyonunun %14,80 aktif, %85,20 (****, $p<0,00001$) inaktif olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, MDA-MB-453 hücre hattına uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolagını oldukça önemli derecede inhibe ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.18. MDA-MB-453 hücre hattı üzerinde uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolagı ekspresyon grafikleri. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M), VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-3 (150-5 μ M)'dir.

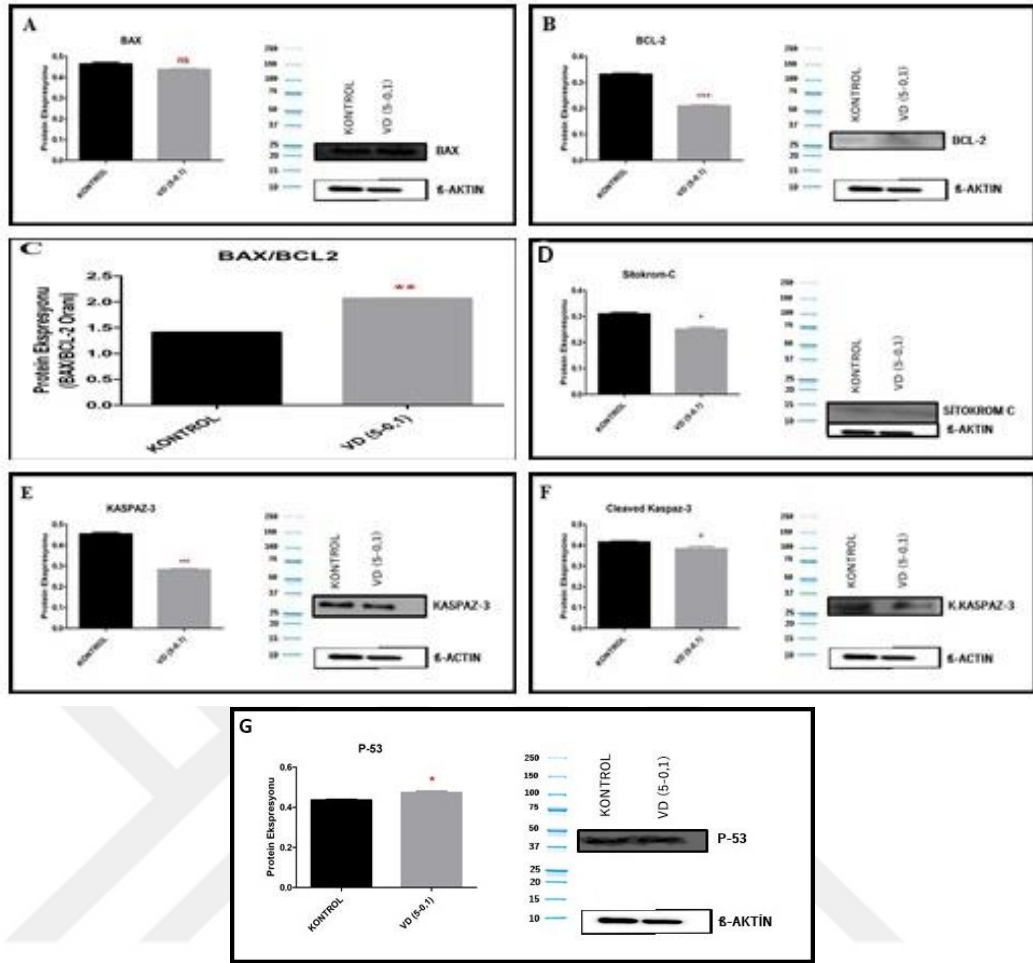
MDA-MB-231		MDA-MB-453	
VA+DOX (μ M)	VA+MIX (μ M)	VA+DOX (μ M)	VA+MIX (μ M)
(5-0,1) 	(5-0,1) 	(25-0,1) 	(25-0,05) 
	(10-0,5) 	(150-10) 	(75-0,5) 
	(25-1) 		(150-5)  

Şekil 4.19. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine etkileri.

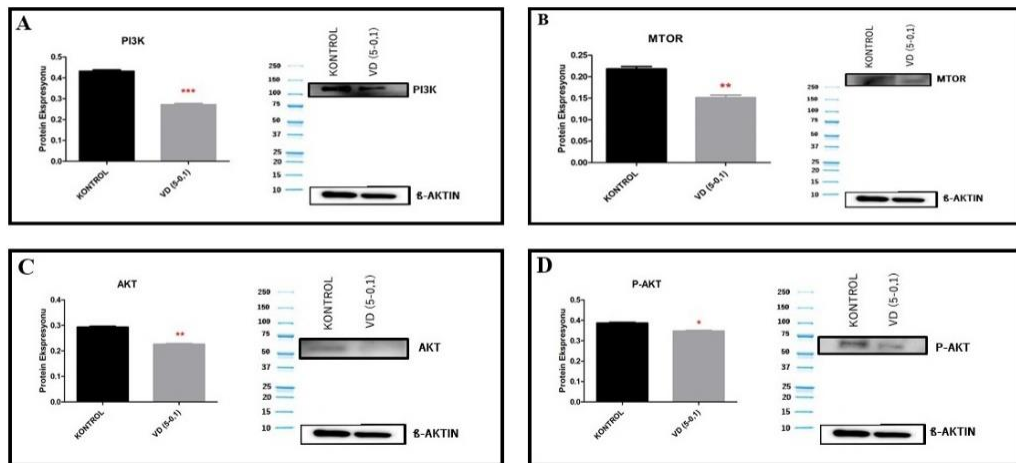
4.4. Kantitatif Protein Ekspresyon Analiz (Western Blot) Çalışmaları

MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerinde sinerjik etki gösteren VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonları hücrelere uygulanmış, 48 saatlik inkübasyon süresi sonucunda western blot tekniği ile kantitatif protein miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler grafik haline getirilmiştir.

Şekil 4.20’de görüldüğü üzere, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde VA+DOX kombinasyonunun uygulanması sonucunda apoptotik ve PI3K yolak proteinlerinin nasıl etkilendiği araştırıldı. Apoptotik yolak proteinleri incelendiğinde MDA-MB-231 hücre hattında VA+DOX (5-0,1 μ M) kombinasyonunda; BAX’ın (ns, $p>0,05$) değişmediği, BCL-2’nin (***, $p<0,0001$) önemli derecede azaldığı, BAX/BCL2 oranında (**, $p<0,001$) önemli bir artış, Sitokrom-c’de ve Cleaved-kaspaz3’de (*, $p<0,01$) azalış, Kaspaz-3’de (***, $p<0,0001$) oldukça önemli bir azalış, p53’ün ise (*, $p<0,01$) arttığı gözlemlenmiştir. PI3K sinyal yolağı proteinlerinde ise PI3K’da (***, $p<0,0001$) oldukça önemli bir azalış, mTOR ve AKT’de (**, $p<0,001$) önemli bir azalış, Phospho-AKT (P-AKT)’de ise (*, $p<0,01$) azalış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, uygulanan VA+DOX kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerini flow sitometri sonuçlarında olduğu gibi protein seviyesinde de apoptoza yönelttiği, PI3K/AKT sinyal yolunu da protein seviyesinde de inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.21).

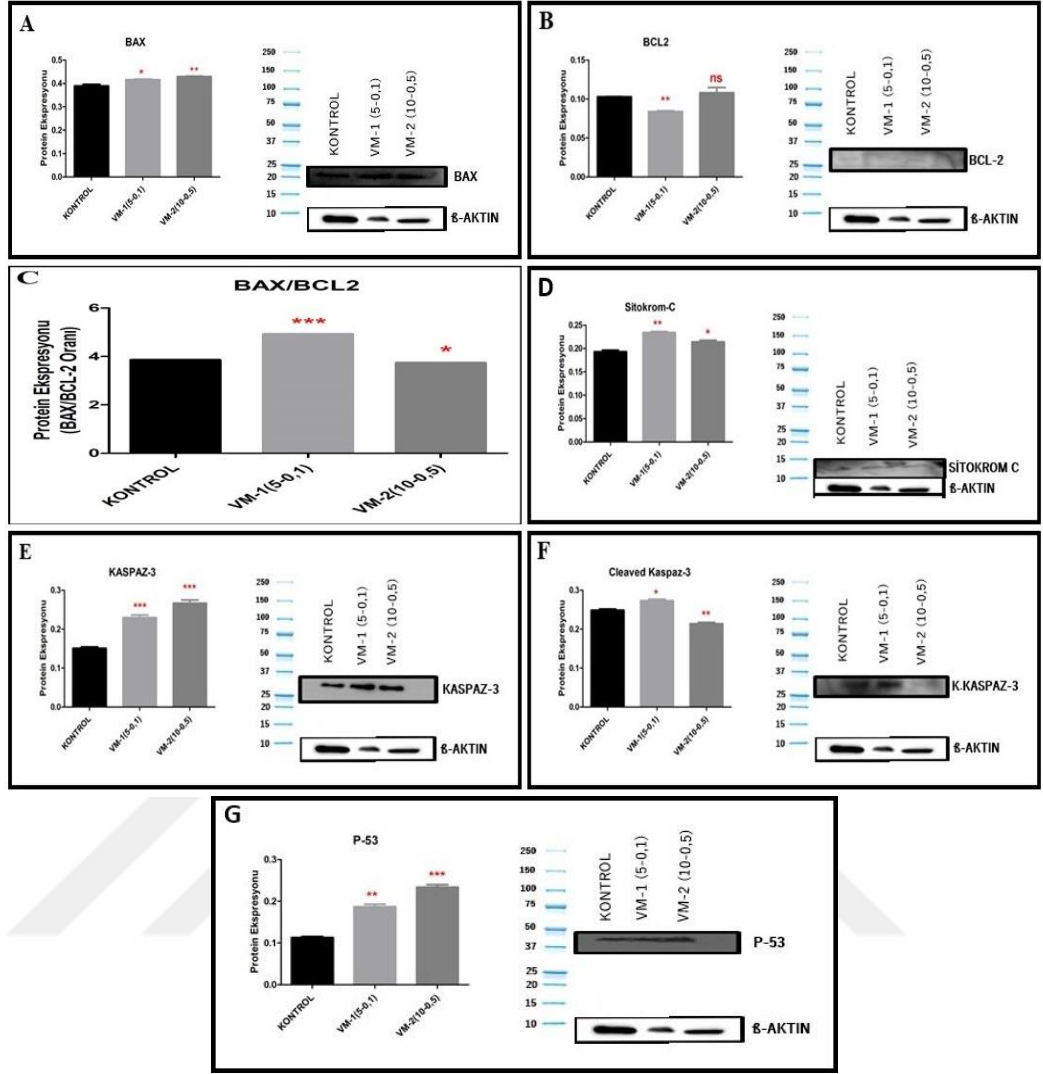


Şekil 4.20. VA+DOX kombinasyonunun MDA-MB-231 hücreleri üzerinde apoptotik yolak kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyon VA+DOX-1 (5-0,1 μ M)'dır.

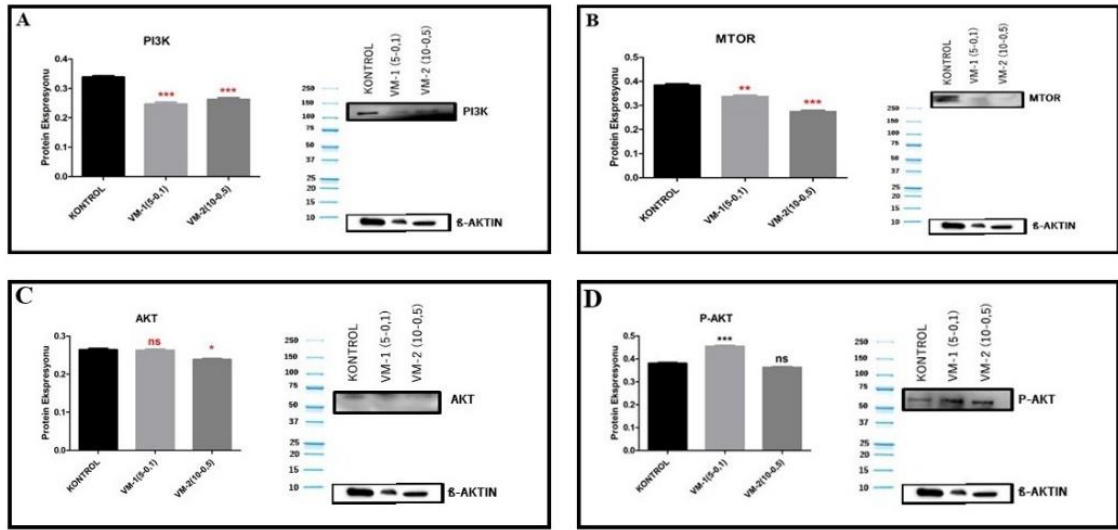


şekil 4.21. VA+DOX kombinasyonunun MDA-MB-231 hücreleri üzerinde PI3K/AKT yolağı kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyon; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M)'dır.

MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA+MIX kombinasyonunun sinerjik etki dozlarının uygulanması sonucunda apoptotik ve PI3K yolak proteinlerinin nasıl etkilendiği araştırıldı (Şekil 4.22). Apoptotik yolak proteinleri incelendiğinde BAX'ın uygulanan her iki kombinasyonunda da sırası ile artış (*, $p<0,01$; ***, $p<0,0001$), BCL-2'de uygulanan en düşük kombinasyonda azalış, sonraki kombinasyonda ise herhangi bir değişim olmamıştır (**, $p<0,001$; ns $p>0,05$). BAX/BCL-2 oranında ise kontrole göre en düşük kombinasyonda oldukça önemli bir artış, sonraki kombinasyonda artış gözlenmiştir (***, $p<0,0001$; *, $p<0,01$). Sitokrom-c'de her iki kombinasyonda da artış (**, $p<0,001$; *, $p<0,01$). P53'de her iki kombinasyonda da önemli artış (**, $p<0,001$; ***, $p<0,0001$), kaspaz-3'ün her iki kombinasyonda önemli artış (***, $p<0,0001$), cleaved kaspaz-3'de ise her iki kombinasyonda da artış (*, $p<0,01$; **, $p<0,001$) gözlemlenmiştir. PI3K sinyal yolağı proteinlerinde ise PI3K'da uygulanan her iki kombinasyonda da önemli derecede azalış (***, $p<0,0001$), mTOR'da her iki kombinasyonda azalış (**, $p<0,001$; ***, $p<0,0001$), AKT'de ilk kombinasyonda spesifik bir değişim yokken ikinci kombinasyonda kısmi azalış (ns $p>0,05$; *, $p<0,01$), P-AKT de en düşük kombinasyonda artış, ikinci kombinasyonda ise herhangi bir değişim görülmemiştir (***, $p<0,0001$; ns $p>0,05$). Sonuç olarak, uygulanan VA+MIX kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerini flow sitometri sonuçlarında olduğu gibi protein seviyesinde de apoptoza yönelttiği, PI3K/AKT sinyal yolunu da protein seviyesinde de inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.23).

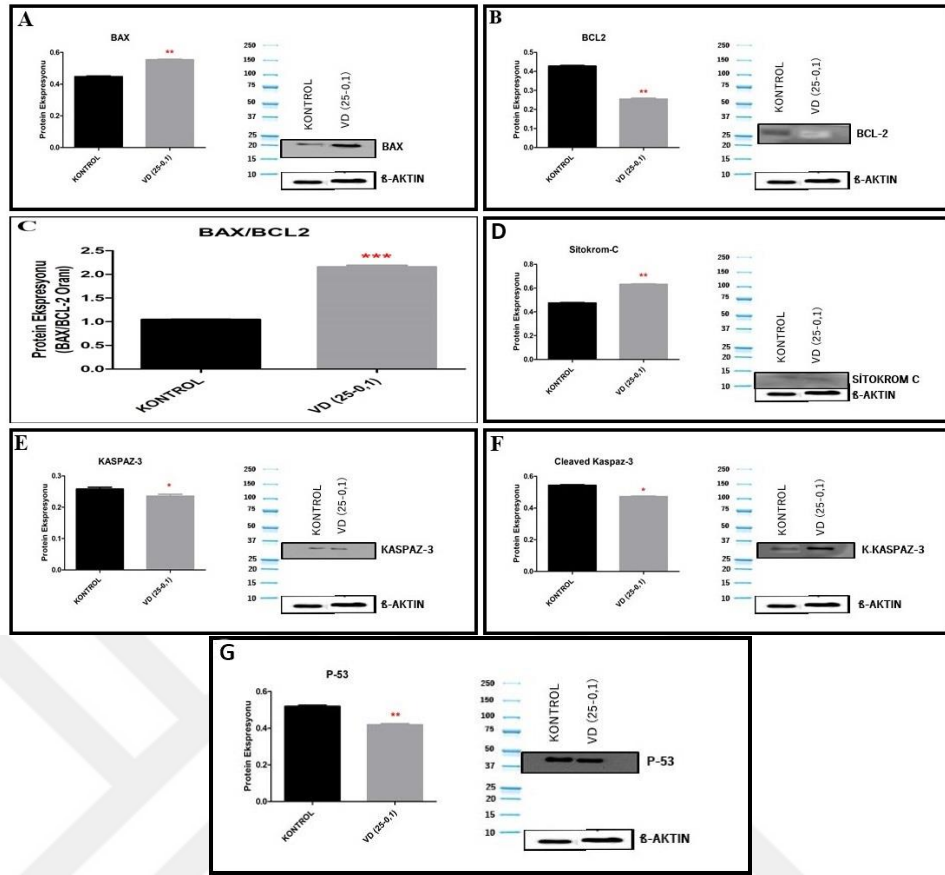


Şekil 4.22. VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde apoptotik yolak kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dır.

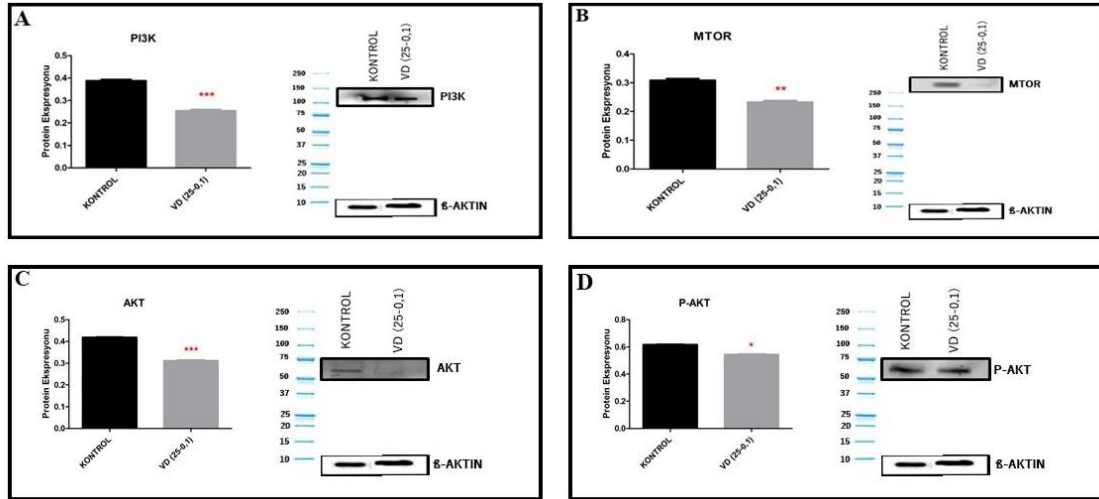


Şekil 4.23. VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde PI3K/AKT yolu kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dir.

MDA-MB-453 hücre hattı üzerinde VA+DOX kombinasyonunun uygulanması sonucunda apoptotik ve PI3K yolak proteinlerinin nasıl etkilendiği araştırıldı. Apoptotik yolak proteinleri incelendiğinde BAX'da artış (**, $p < 0,001$), BCL-2'de azalış (**, $p < 0,001$), BAX/BCL-2'de önemli derecede artış (***, $p < 0,0001$), Sitokrom-c ve P53'de azalış (**, $p < 0,001$), Kaspaz-3 ve Cleaved kaspaz-3'de kısmi azalış (*, $p < 0,01$) gözlemlenmiştir (Şekil 4.22). PI3K sinyal yolu proteinlerinde ise PI3K ve AKT'de önemli derecede azalış (***, $p < 0,0001$), mTOR'da azalış (**, $p < 0,001$), P-AKT'de ise kısmi azalış (*, $p < 0,01$) gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, uygulanan VA+DOX kombinasyonunun MDA-MB-453 hücrelerini flow sitometri sonuçlarında olduğu gibi protein seviyesinde de apoptoza yönelttiği, PI3K/AKT sinyal yolunu da protein seviyesinde de inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.23).

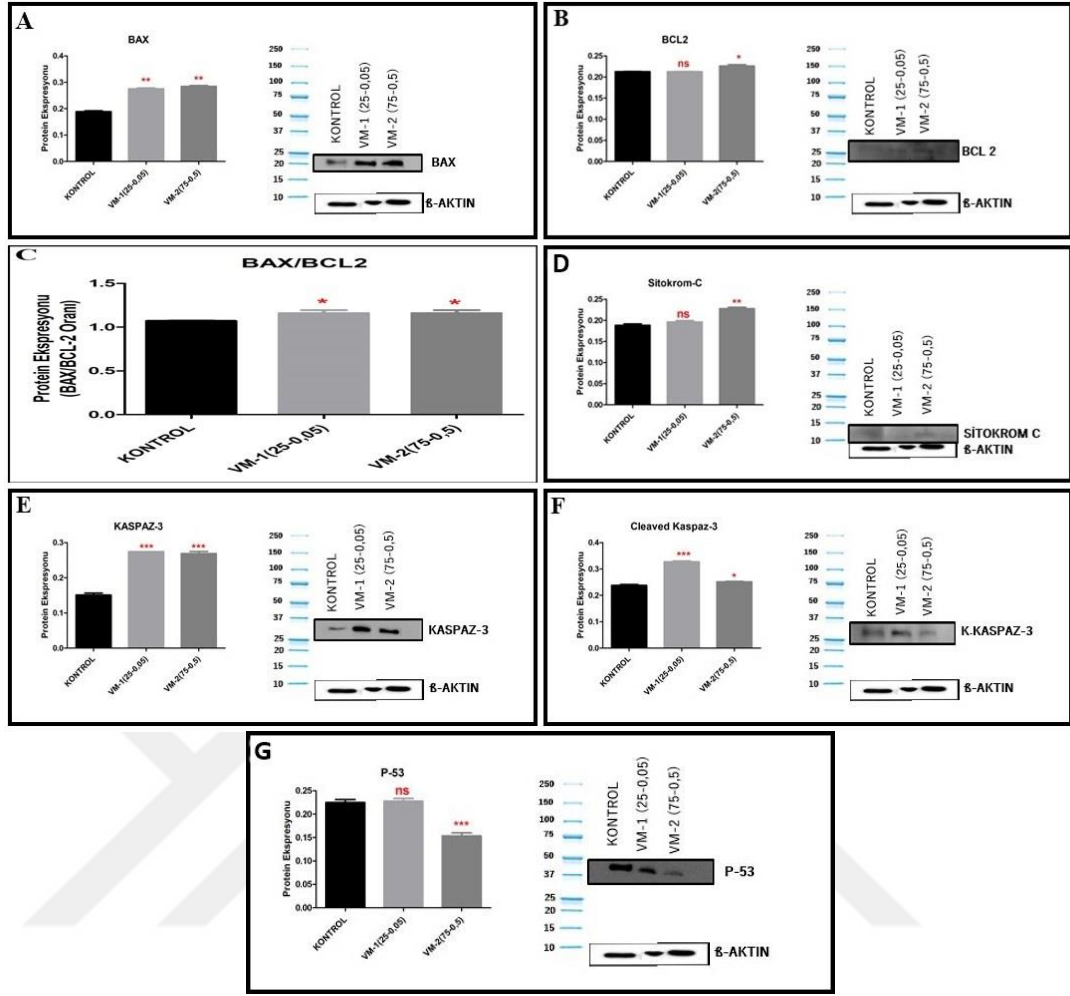


Şekil 4.24. VA+DOX kombinasyonunun MDA-MB-453 hücreleri üzerinde apoptotik yolak kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyon; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M)'dır.

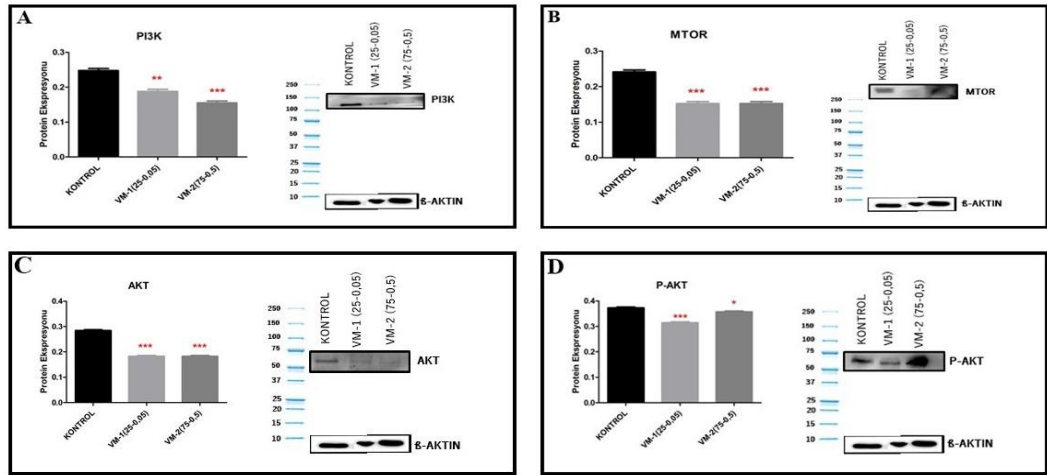


Şekil 4.25. VA+DOX kombinasyonunun MDA-MB-453 hücreleri üzerinde PI3K/AKT yolağı kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyon; VA+DOX-1 (25-0,1 μ M)'dır.

MDA-MB-453 hücre hattı üzerinde VA+MIX kombinasyonlarının uygulanması sonucunda apoptotik ve PI3K yolak proteinlerinin nasıl etkilendiği araştırıldı (Şekil 4.24). Apoptotik yolak proteinleri incelendiğinde BAX'da artış (**, $p<0,001$), BCL-2'de ilk kombinasyonunda herhangi bir değişim gözlemlenmezken ikinci kombinasyonda kısmi artış (ns $p>0,05$; *, $p<0,01$), yine BAX/BCL-2 oranında ise kısmi artış (*, $p<0,01$) gözlemlenmiştir. Sitokrom-c'de ilk kombinasyonda herhangi bir değişim yok iken ikinci kombinasyonda artış (ns $p>0,05$; **, $p<0,001$), Kaspaz-3'de önemli derecede artış (***, $p<0,0001$), Cleaved kaspaz-3'de ilk kombinasyonda önemli derecede artış, sonraki kombinasyonda artış (***, $p<0,0001$; *, $p<0,01$), p53'de ilk kombinasyonda spesifik bir değişim gözlemlenmezken ikinci kombinasyonda önemli derecede azalış (ns $p>0,05$; ***, $p<0,0001$) gözlemlenmiştir. PI3K sinyal yolağı proteinlerinde ise PI3K'nın ilk kombinasyonda azalış, ikinci kombinasyonda önemli derecede azalış (**, $p<0,001$; ***, $p<0,0001$), mTOR ve AKT'nin her iki kombinasyonunda da önemli derecede azalış (***, $p<0,0001$), VM-1 P-AKT'ın kantitatif protein ekspresyonunu önemli derecede azalttığı, VM-2 ise düşük derecede azalttığı (***, $p<0,0001$; *, $p<0,01$) gözlenmiştir. Sonuç olarak, uygulanan VA+DOX kombinasyonlarının MDA-MB-453 hücrelerini flow sitometri sonuçlarında olduğu gibi protein seviyesinde de apoptoza yönelttiği, PI3K/AKT sinyal yolunu da protein seviyesinde de inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.26. VA+MIX kombinasyonunun sinerjik etki gösteren konsantrasyonunda MDA-MB-453 hücreleri üzerinde kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (75-0,5 μ M)'dır.



Şekil 4.27. VA+MIX kombinasyonunun MDA-MB-453 hücreleri üzerinde PI3K/AKT yolağı kantitatif protein ekspresyon etkisi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+MIX-1 (25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (75-0,5 μ M)'dır.

MDA-MB-231 (VA+MIX 5-0,1/10-0,5 μ M)	BAX	BCI-2	BAX/BCI2	SİTOKROM-C	P53	KASPAZ-3	CLEAVED KASPAZ-3
	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑
MDA-MB-453 (VA+MIX 25-0,05/75-0,5 μ M)	BAX	BCI-2	BAX/BCI2	SİTOKROM-C	P53	KASPAZ-3	CLEAVED KASPAZ-3
	↑	ns	↑	↑	ns	↑	↑
MDA-MB-231 (VA+DOX 5-0,1 μ M)	BAX	BCI-2	BAX/BCI2	SİTOKROM-C	P53	KASPAZ-3	CLEAVED KASPAZ-3
	ns	↓	↑	↓	↑	↓	↓
MDA-MB-453 (VA+DOX 25-0,1 μ M)	BAX	BCI-2	BAX/BCI2	SİTOKROM-C	P53	KASPAZ-3	CLEAVED KASPAZ-3
	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓

Şekil 4.28. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının apoptotik yolak üzerindeki kantitatif protein ekspresyon etkisi.

MDA-MB-231 (VA+MIX 5-0,1/10-0,5 μ M)	MTOR	PI3K	AKT	P-AKT
	↓	↓	ns	ns
MDA-MB-453 (VA+MIX 25-0,05/75-0,5 μ M)	MTOR	PI3K	AKT	P-AKT
	↓	↓	↓	↓
MDA-MB-231 (VA+DOX 5-0,1 μ M)	MTOR	PI3K	AKT	P-AKT
	↓	↓	↓	↓
MDA-MB-453 (VA+DOX 25-0,1 μ M)	MTOR	PI3K	AKT	P-AKT
	↓	↓	↓	↓

Şekil 4.29. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolağı üzerindeki kantitatif protein ekspresyon etkisi.

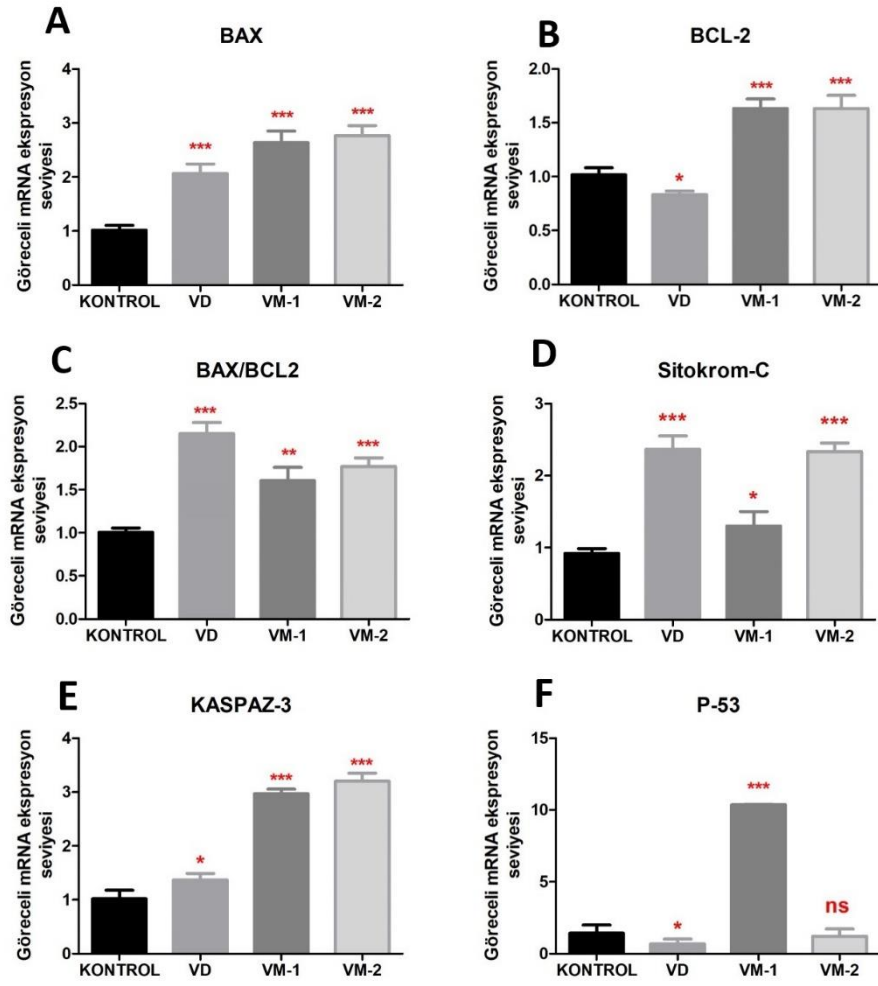
Protein seviyesinde gerçekleştirilen çalışmalar sonrasında aynı doz ve kombinasyonların meme kanseri hücre hatlarına (MDA-MB-231 ve MDA-MB-453) uygulanması sonucu apoptotik ve PI3K/AKT sinyal yolağı genleri üzerine etkisi qRT-PCR yöntemi ile araştırıldı.

4.5. Kantitatif Gen Ekspresyonu (q-PCR) Çalışmaları

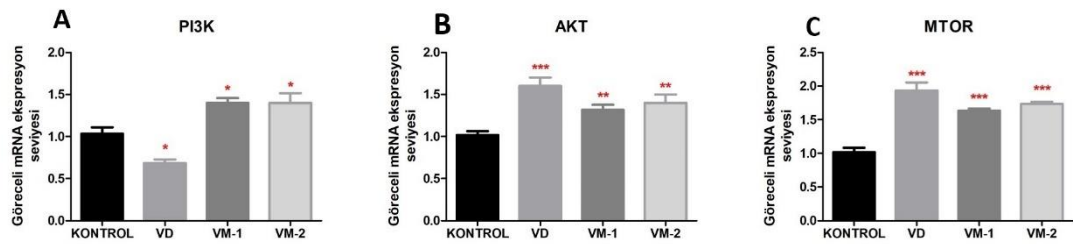
Şekil 4.30'da görüldüğü üzere, MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının gen seviyesindeki değişimleri; apoptotik yolak genlerinden BAX'ın hem VA+DOX (5-0,1 μ M) hem de VA+MIX (VM-1 (5-0,1 μ M) / VM-2 (10-0,5 μ M)) kombinasyonlarının hepsinde önemli derecede artış (***, p<0,0001) sergilediği, BCL-2'nin VA+DOX (5-0,1 μ M) kombinasyonunda anlamlı bir değişim gözlenmezken VA+MIX (VM-1 (5-0,1 μ M) / VM-2 (10-0,5 μ M)) kombinasyonlarında önemli derecede artış (***, p<0,0001) sergilediği, BAX/BCL-2 oranında ise VA+DOX (5-0,1 μ M) kombinasyonunda önemli derecede artış (***, p<0,0001), VA+MIX ilk kombinasyonunda (VM-1) artış uygulanan ikinci kombinasyonunda (VM-2) önemli derecede artış (**, p<0,001; ***, p<0,0001) sergilediği belirlenmiştir. Kaspaz-3'de VA+DOX (5-0,1 μ M) kombinasyonunda spesifik bir değişim olmamışken VA+MIX (VM-1 / VM-2) kombinasyonlarının her ikisinde de önemli derecede artış (***, p<0,0001) gözlemlenmiştir. Sitokrom-C'de ise VA+DOX (5-0,1 μ M) ve VA+MIX (VM-

2 (10-0,5 μ M)) kombinasyonlarında önemli bir artış (**, $p<0,001$), VA+MIX ilk kombinasyonunda (VM-1 (5-0,1 μ M)) ise kontrole göre herhangi bir değişim (ns $p>0,05$) gözlenmemiştir. p53'de VA+DOX (5-0,1 μ M) kombinasyonunda kısmi azalış (*, $p<0,01$), VA+MIX VM-1 (5-0,1 μ M) kombinasyonunda önemli derecede artış (***, $p<0,0001$), VA+MIX VM-2 (10-0,5 μ M) kombinasyonunda ise anlamlı bir farklılık (ns $p>0,05$) gözlenmemiştir. Sonuç olarak, uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının gen seviyesinde MDA-MB-231 hücrelerini apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir.

Şekil 4.31'de görüldüğü üzere, PI3K sinyal yolağı genlerinde ise PI3K'da VA+DOX (5-0,1 μ M) kombinasyonunda kısmi azalış (*, $p<0,01$), VA+MIX (VM-1 (5-0,1 μ M) / VM-2 (10-0,5 μ M)) kombinasyonlarında kısmi artış (*, $p<0,01$), mTOR'da hem VA+DOX (5-0,1 μ M) hem de VA+MIX (VM-1 (5-0,1 μ M) / VM-2 (10-0,5 μ M)) kombinasyonlarında önemli bir artış (***, $p<0,0001$), AKT'de ise VA+DOX (5-0,1 μ M) kombinasyonunda önemli bir artış (***, $p<0,0001$), VA+MIX (VM-1 (5-0,1 μ M)/ VM-2 (10-0,5 μ M)) kombinasyonlarında ise artış (**, $p<0,001$) gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonları gen seviyesinde MDA-MB-231 hücreleri üzerinde PI3K/AKT sinyal yolağında inhibisyon göstermemiştir.



Şekil 4.30. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücre hattında apoptotik yolak genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dir.

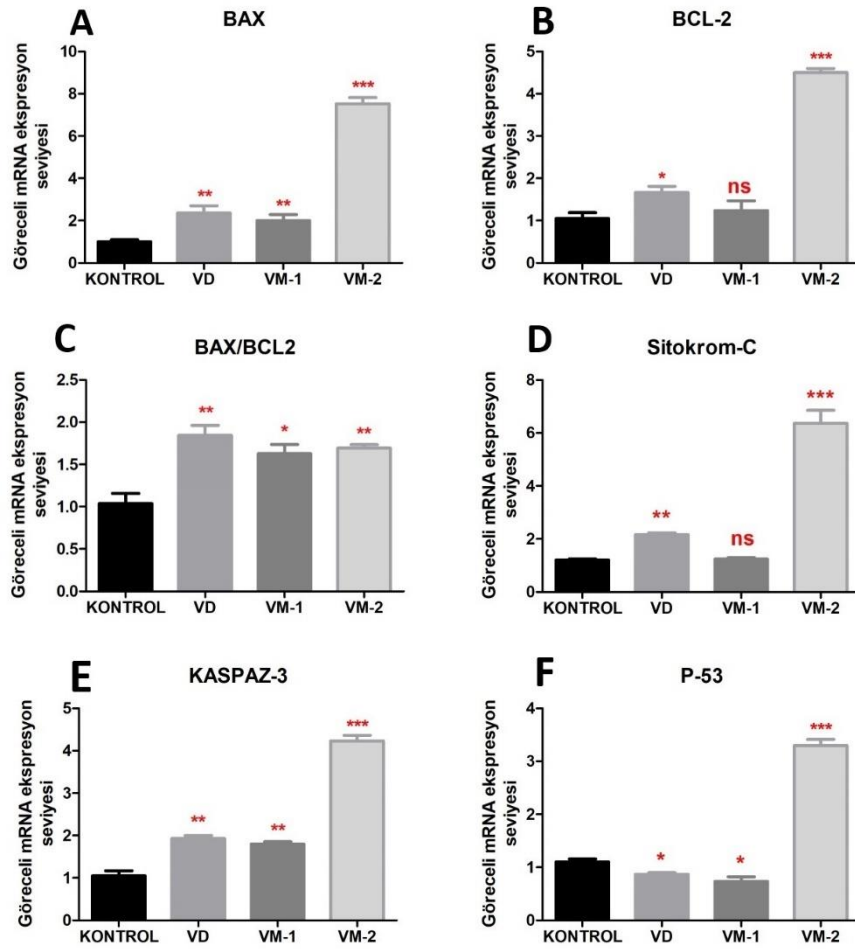


Şekil 4.31. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücre hattında PI3K/AKT yolak genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-1 (5-0,1 μ M), VA+MIX-2 (10-0,5 μ M)'dir.

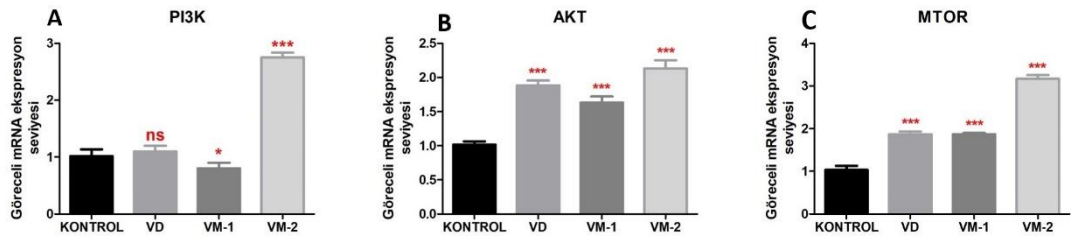
MDA-MB-453 hücre hattına uygulanan sinerjik etki kombinasyon dozlarının gen seviyesindeki değişimleri; apoptotik yolak genlerinden BAX'ın VA+DOX (VD 25-0,1 μ M) ve VA+MIX'in (VM-1 25-0,05 μ M) ilk kombinasyonunda artış (**, p<0,001),

VA+MIX'in ikinci kombinasyonunda (75-0,5 μ M) ise önemli bir artış (***, $p<0,0001$), BCL-2'de VA+DOX (25-0,1 μ M) kombinasyonunda kısmi artış (*, $p<0,01$), VA+MIX dozlarında sırasıyla ilk kombinasyonunda (VM-1, 25-0,05 μ M) kayda değer bir değişim yok iken (ns $p>0,05$), ikinci uygulanan kombinasyonda (VM-2, 75-0,5 μ M) önemli derecede artış (***, $p<0,0001$), BAX/BCL-2 oranında VA+DOX (25-0,1 μ M) kombinasyonunda artış (**, $p<0,001$), VA+MIX'un ilk kombinasyonunda (VM-1, 25-0,05 μ M) kısmi artış (*, $p<0,01$), sonraki uygulanan kombinasyonda ise artış (**, $p<0,001$), P53'de VA+DOX (25-0,1 μ M) ve VA+MIX ilk kombinasyonunda (VM-1, 25-0,05 μ M) spesifik bir değişim olmadığı (ns $p>0,05$), VA+MIX ikinci kombinasyonunda (VM-2, 75-0,5 μ M) ise önemli derecede artış (***, $p<0,0001$), Kaspaz-3'de VA+DOX (25-0,1 μ M) ve VA+MIX ilk kombinasyonunda (VM-1, 25-0,05 μ M) artış (**, $p<0,001$), VA+MIX ikinci kombinasyonunda (VM-2, 75-0,5 μ M) ise önemli bir artış (***, $p<0,0001$) gözlemlenmiştir. Sitokrom-C'de VA+DOX (25-0,1 μ M) kombinasyonunda ve VA+MIX ilk kombinasyonunda (VM-1, 25-0,05 μ M) anlamlı bir farklılık (ns, $p>0,05$) görülmemiş, VA+MIX ikinci kombinasyonunda (VM-2 75-0,5 μ M) oldukça önemli bir artış (***, $p<0,0001$) gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının gen seviyesinde MDA-MB-453 hücrelerini apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir (Şekil 4.32).

PI3K sinyal yolağı genlerinde ise PI3K'da VA+DOX (25-0,1 μ M) kombinasyonunda ve VA+MIX ilk kombinasyonunda (VM-1, 25-0,05 μ M) anlamlı bir farklılık (ns, $p>0,05$) görülmemiş, VA+MIX ikinci kombinasyonunda (VM-2 75-0,5 μ M) oldukça önemli bir artış (***, $p<0,0001$) gözlemlenmiştir. AKT ve mTOR'da ise hem VA+DOX (25-0,1 μ M) hem de VA+MIX (VM-1 (25-0,05 μ M), VM-2 (75-0,5 μ M)) kombinasyonlarında önemli derecede artış (***, $p<0,0001$) gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonları gen seviyesinde MDA-MB-453 hücreleri üzerinde PI3K/AKT sinyal yolağında inhibisyon göstermemiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.32. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-453 hücre hattında apoptotik yolak genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX (25-0,1 μ M), VA+MIX-1 (VM-1, 25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (VM-2 75-0,5 μ M)'dır.



Şekil 4.33. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücre hattında PI3K/AKT yolak genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi. Grafiklerin üzerinde bulunan konsantrasyonlar sırasıyla; VA+DOX (25-0,1 μ M), VA+MIX-1 (VM-1, 25-0,05 μ M), VA+MIX-2 (VM-2 75-0,5 μ M)'dır.

MDA-MB-231	BAX	BCL-2	BAX/ BCL-2	SİTOKROM C	KASPAZ 3	P 53
VA+DOX (5-0,1µM)	↑	↓	↑	↑	↑	↓
VA+MIX-1 (5-0,1µM)	↑	↑	↑	↑	↑	↑
VA+MIX-2 (10-0,5µM)	↑	↑	↑	↑	↑	ns
MDA-MB-453	BAX	BCL-2	BAX/ BCL-2	SİTOKROM C	KASPAZ 3	P 53
VA+DOX (25-0,1µM)	↑	↑	↑	↑	↑	↓
VA+MIX-1 (25-0,05µM)	↑	ns	↑	ns	↑	↓
VA+MIX-2 (75-0,5µM)	↑	↑	↑	↑	↑	↑

Şekil 4.34. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının apoptotik yolak üzerindeki kantitatif gen ekspresyon etkisi.

MDA-MB-231	PI3K	AKT	mTOR
VA+DOX (5-0,1µM)	↓	↑	↑
VA+MIX-1 (5-0,1µM)	↑	↑	↑
VA+MIX-2 (10-0,5µM)	↑	↑	↑
MDA-MB-453	PI3K	AKT	mTOR
VA+DOX (25-0,1µM)	ns	↑	↑
VA+MIX-1 (25-0,05µM)	↓	↑	↑
VA+MIX-2 (75-0,5µM)	↑	↑	↑

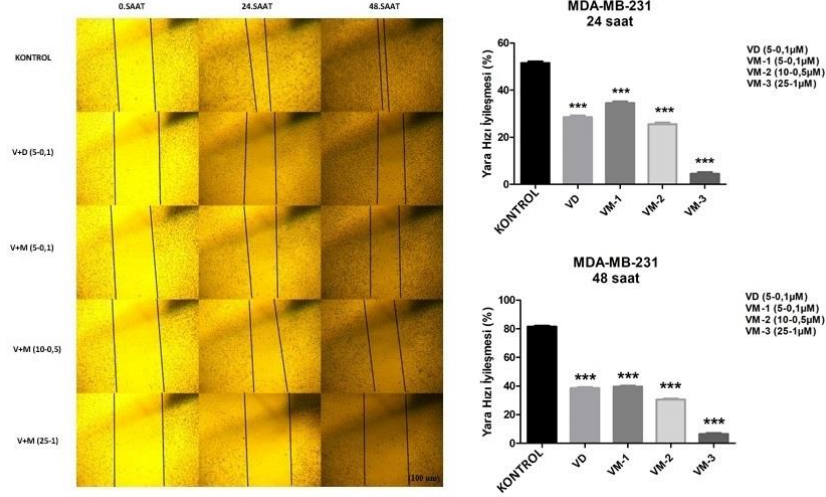
Şekil 4.35. MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan vulpinik asit-kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının PI3K/AKT sinyal yolağı üzerindeki kantitatif gen ekspresyon etkisi.

4.6. Migrasyon Analizi Çalışmaları

MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine sinerjik etki gösteren dozların uygulanması sonucunda bu dozların hücreler üzerindeki migrasyon etkileri Şekil 4.25 ve Şekil 4.36'da verilmiştir.

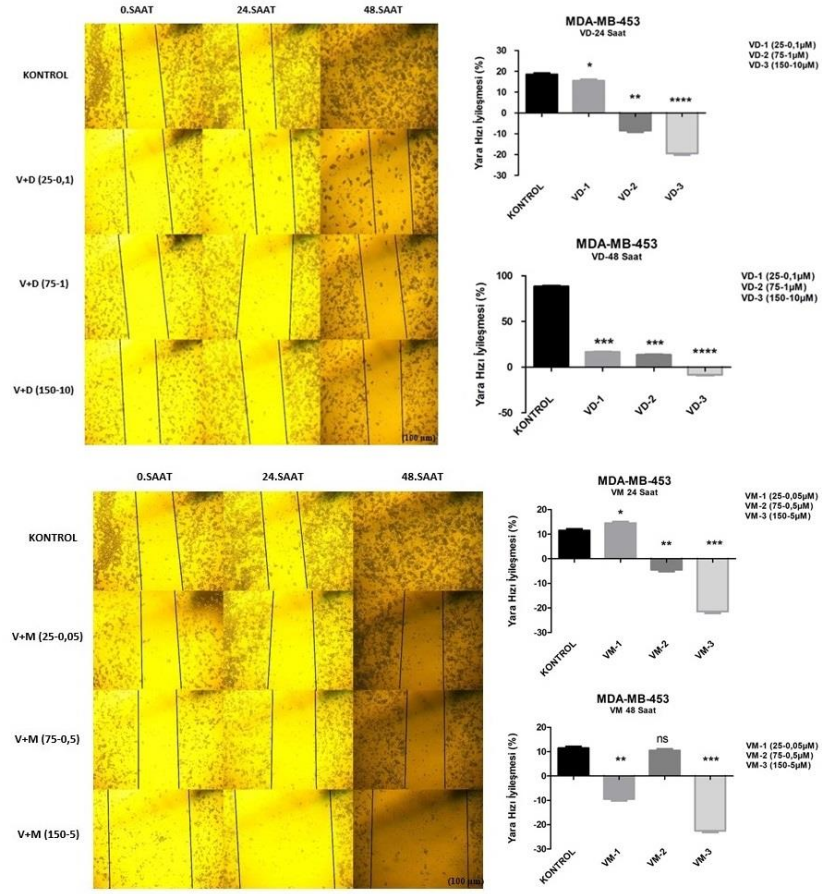
MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde VA+DOX (5-0,1µM) ve VA+MIX (5-0,1 µM, 10-0,5 µM ve 25-1 µM) dozları 0, 24 ve 48 saatlik süre zarfında migratif etkileri gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda uygulanan dozların MDA-MB-231 hücre hattında

kontrole göre hücre göçünü istatistiksel olarak önemli derecede durdurduğu belirlenmiştir (***, $p<0,001$).



Şekil 4.36. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki 0-24 ve 48 saatlik migrasyon etkisi.

VA+DOX (25-0,1 μ M, 75-1 μ M ve 150-10 μ M) ve VA+MIX (25-0,05 μ M, 75-0,5 μ M ve 150-5 μ M) kombinasyonları MDA-MB-453 hücre hattında 0, 24 ve 48 saatlik sürelerde fotoğraflanmış ve çalışma sonucunda uygulanan kombinasyonların MDA-MB-453 hücre hattında kontrole göre hücre göçünü istatistiksel olarak önemli derecede durdurduğu belirlenmiştir (***, $p<0,001$) (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-453 hücre hattı üzerindeki 0-24 ve 48 saatlik migrasyon etkisi.

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Geçmişten günümüze insanlar çeşitli hastalıklara karşı tedaviyi doğal yollarla aramışlardır. Günümüzde tıp ve teknoloji oldukça gelişmesine rağmen insanlar bitkisel tedavi deneyimlerini sürdürmeye halen devam etmektedir. Sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla olması ve kanser tedavisi sürecinden sonra hastalarda ortaya çıkan çeşitli yan etkilerin bir süre daha devam etmesi nedeniyle pek çok bilim insanı doğal bileşiklere yönelmiştir. Sentetik ilaçların aksine doğal bileşiklerin metabolizmaya pozitif yönde etki eden özellikleri yıllardır bilinmekte olup ilaç etken maddesi ve gıda takviyeleri olarak kullanılmaktadır. Bundan dolayı ilaç uygulama sistemleri halen doğal ve daha etkin, aynı zamanda minimum yan etkiye sahip olabilecek ilaç ve tedavi protokolleri aramaktadır (Sekar ve Kandavel, 2010). Türkiye, özellikle etnobotanik olarak da adlandırılan tıbbi ve aromatik bitkiler açısından büyük çeşitliliğe sahiptir. Günümüzde de tıbbi bitkiler, geleneksel tedavi yöntemlerinin en aktif unsurlarıdır. Kullanılan tıbbi ve aromatik bitkilere bakıldığında içerdikleri etken maddelere göre çok fazla sayıda kullanım alanı bulunmaktadır (Baytop, 1999).

Son yıllarda içeriklerinin de belirlenmesiyle ciddi rağbet görmeye başlayan liken sekonder metabolitleri, özellikle kemoterapötik ajan olarak kullanım alanına sahip olabileceği düşünülen ve üzerinde çalışmalara halen devam edilen yeni bir alandır. Literatürde birçok biyolojik aktivite gösterdiği belirlenmiş olan bu sekonder metabolitlerden biri olan Vulpinik Asit (VA) ile mevcut kullanımda bulunan kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları sonucunda hücreler üzerinde oluşturdukları sinerjik etkinin kombinasyon indeks değerlerinin belirlenmesi, liken sekonder metaboliti olan VA ve kemoterapi ilaçlarının (sisplatin, doksorubisin, dokataksel, mitaksantron) kombinasyonlarının en etkin olduğu insan meme kanseri hücre hatlarında, en düşük konsantrasyon uygulanarak, en yüksek iyileşme sağlayabilmek tez çalışmasının ilk aşamasını kapsamaktaydı. Tezin ilk aşamasında, seçilen hücre hatları üzerinde pozitif etki gösteren ve farklı etkileriyle de aynı yönde etkiler sağlayan yeni ilaç kombinasyonları elde edilmeye çalışılması, sonraki aşamalarda ise ilk aşamadan elde edilen bulgular doğrultusunda VA+kemoterapötik ilaç kombinasyonları arasında sinerjik etki gösteren dozların meme kanseri hücre hatları üzerindeki migratif etkisi, flow sitometri çalışmaları ile apoptoz üzerine etkilerini, apoptotik gen ve protein ekspresyonu, PI3K/AKT yolağı gen ve protein üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı ve çalışmalar gerçekleştirildi.

Öncelikle, VA'in ve belirlenen kemoterapötik ilaçların, doz ve zaman bağımlı olarak canlılık üzerine etkisi incelenmiş ve meme kanser hücre hatlarından MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücrelerinde etkin dozları ayrı ayrı belirlenmiştir. Daha sonra VA+Kemoterapötik ilaçlar farklı dozlarda zaman bağımlı olarak kombine şekilde hücreler üzerine uygulanmış ve CI değerleri belirlenmiştir. Belirlenen etkin CI değerleri ile muamele edilen kanser hücre hatlarının flow sitometri ile analizleri yapılarak apoptoz üzerine etkileri, migrasyon, apoptotik yolak genlerinin ve proteinlerinin ekspresyonu ve PI3K/AKT/mTOR yolağının gen ve protein üzerine etkileri araştırılmıştır.

Literatüre bakıldığında, VA'in çeşitli kanser hücrelerinde antiproliferatif, antimikrobiyal ve antianjiyogenik gibi biyolojik aktivite sergilediği belirtilmiştir (Koparal, 2015). VA'in sitotoksik etkisi üzerine yapılan bir çalışmada CaCo2, HepG2, Hep2C, RD, Wehi, Vero ve L929 hücre hatları kullanılmış, doz ve zaman (24, 48 ve 72 saat) bağımlı olarak VA ile hücreler muamele edildiğinde canlılığı özellikle 48 saatte önemli ölçüde (sırasıyla IC₅₀ değeri 13.7, 23.8, 25.3, 34.4 ve 38.6 µM) inhibe ettiği belirlenmiştir (Cansaran-Duman, Guney Eskiler, Colak, ve Sozen Kucukkara, 2021). Başka bir çalışmada da VA'in meme kanseri hücre hatları (MDA-MB-231, MCF-7, BT-474 ve SK-BR-3) üzerindeki proliferatif aktivitesinin önemli ölçüde (5-18 µM arasındaki konsantrasyonlarının) inhibe edildiği gösterilmiştir (Kılıç vd., 2018). Kalın (2022) liken asitlerinin meme kanseri hücre hatları üzerine etkilerini araştırdığı çalışmasında VA'in MCF-7 ve MDA-MB-453 (IC₅₀=22,92 (µg/ mL) ve IC₅₀=95,65 (µg/ mL)) hücre hatları üzerinde oldukça güçlü bir sitotoksik etki sergilediğini belirtmiştir (Kalın vd., 2022). VA'in meme kanseri üzerine etkilerinin yanı sıra literatürde başka kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri de araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda VA'in cilt kanseri (Yangın vd., 2022), prostat kanseri (Duman vd., 2021), rahim ağzı kanseri (Budak, Kalın, ve Yapça, 2023), akciğer kanseri (Y. Wu vd., 2022) hücre hatları üzerinde de oldukça etkili bir antiproliferatif etki sergilediği belirlenmiştir.

Bu bağlamda VA'in meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkileri çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları ile literatüre kazandırılmıştır. Ancak, kemoterapötik ilaçlar ile VA'in kombinasyon etkilerine dair henüz bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışma kapsamında meme kanseri hücre hatları (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) üzerine ilk aşamada 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde Sisplatin, Doksorubisin, Dokataksel, Mitaksantron ve Vulpinik Asit ayrı ayrı uygulanmıştır. İlk uygulama aşamasında, meme

kanseri hücre hatları içinde üzerinde en çok çalışma yapılmış olan MCF-7 hücre hattına her bir kemoterapötik ilaç sisplatin, doksorubisin, dokataksel, mitaksantron ayrı ayrı uygulanmıştır. Uygulama sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.1’de verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kemoterapötik ilaçlar içerisinde Sisplatinin hücre hattı üzerinde doz-zaman bağımlı inhibisyon etkisi olmadığı görülmektedir. Dokatakselin ise doz-zaman bağımlı sonuçları, doksorubisin ile mitaksantrona göre daha az inhibisyon etkisine sahiptir. Vulpinik asitin hücre hattı üzerine etkisine bakıldığında en iyi etkiyi 48 saatlik inhibisyon zaman diliminde gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda MCF-7 hücre hattı üzerine 48 saatlik uygulama yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler üzerine vulpinik asit (VA), doksorubisin (DOX) ve Vulpinik asit + Doksorubisin (VA+DOX) kombinasyonu ile Vulpinik asit (VA), Mitaksantron (MIX) ve Vulpinik asit + Mitaksantron (VA+MIX) kombinasyonundan elde edilen sonuçlar CompuSyn programı ile analiz edilmiş ve kombinasyon indeks (CI) değerleri Tablo 4.4’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonları MCF-7 hücre hattı üzerinde belirlenen konsantrasyonlarda sinerjik etki göstermemiş ancak antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattı üzerine VA, DOX, MIX’in Tablo 4.2’de belirtilen farklı konsantrasyonları 24 ve 48 saatlik sürelerde uygulanmıştır. Elde edilen inhibisyon sonuçları doğrultusunda VA’nın en iyi inhibisyon değerleri 48 saatlik uygulamada alındığından dolayı MDA-MB-231 hücre hattı üzerine 48 saatlik uygulama yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler üzerine Vulpinik asit (VA), Doksorubisin (DOX) ve Vulpinik asit + Doksorubisin (VA+DOX) kombinasyonu ile Vulpinik asit (VA), Mitaksantron (MIX) ve Vulpinik asit + Mitaksantron (VA+MIX) kombinasyonu Tablo 6’da belirtilen beş farklı dozda uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar CompuSyn programı ile analiz edilmiş ve kombinasyon indeks (CI) değerleri Tablo 4.5’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonları MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde belirlenen konsantrasyonlar içerisinde; VA+DOX kombinasyonunda 5-0,1 μM kombinasyonu, VA+MIX kombinasyonunda ise en yüksek dozlar olan 100-10 μM ’lık kombinasyon dozları hariç diğer dört (5-0,1 μM , 10-0,5 μM , 25-1 μM , 50-5 μM) doz sinerjik etki göstermiştir.

MDA-MB-453 hücre hattı üzerine VA, DOX, MIX’in Tablo 4.3’de belirtilen farklı konsantrasyonları 24 ve 48 saatlik sürelerde uygulanmıştır. Elde edilen inhibisyon

sonuçlar doğrultusunda VA'in en iyi inhibisyon değerleri 48 saatlik uygulamada alındığından dolayı MDA-MB-231 hücre hattında olduğu gibi MDA-MB-453 hücre hattında da 48 saatlik uygulama yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler zerine Vulpinik asit (VA), Doksorubisin (DOX) ve Vulpinik asit + Doksorubisin (VA+DOX) kombinasyonu ile Vulpinik asit (VA), Mitaksantron (MIX) ve Vulpinik asit + Mitaksantron (VA+MIX) kombinasyonlarından elde edilen sonuçlar CompuSyn programı ile analiz edilmiş ve kombinasyon indeks (CI) değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonları MDA-MB-453 hücre hattı üzerinde belirlenen konsantrasyonlar içerisinde; hem VA+DOX (25-0,1 μ M, 50-0,5 μ M, 75-1 μ M, 100-5 μ M, 150-10 μ M) kombinasyonunda hem de VA+MIX (25-0,05 μ M, 50-0,1 μ M, 75-0,5 μ M, 100-1 μ M, 150-5 μ M) kombinasyonunda uygulanan tüm dozlar sinerjik etki göstermiştir.

Tezin ilk aşamasında yapılan çalışmalar sonucunda Vulpinik asit ile Doksorubisin ve Mitaksantronun çeşitli kombinasyonlarının sinerjik etkileri zaman bağımlı bir şekilde belirlendi. VA+DOX ile VA+MIX kombinasyonları MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine ayrı ayrı uygulanarak 48 saatlik inkübasyon süresince inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında her bir hücre hattı üzerindeki sinerjik etki kombinasyon dozlarının; migrasyonu, mitokondriyal membran potansiyeli, çoklu kaspaz aktivasyonu, apoptoz, hücre döngüsü üzerine etkisi, hücre içi oksidatif stres ile ilişkisi araştırıldı.

VA ile yapılan apoptoz çalışmaları literatürde oldukça sınırlıdır. Yapılan alışmalarda; Kalın (2022), Vulpinik asit'in MCF-7 hücreleri üzerinde erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdesini kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak değiştirmediğini, MDA-MB-453 hücrelerinde ise, vulpinik asit'in erken apoptozu ~%2,5 ($p < 0,05$), geç apoptozu ~%5,2 ($p < 0,001$) artırdığını, ancak kontrolle karşılaştırıldığında nekrozu etkilemediğini belirlemiştir (Kalın vd., 2022). Literatürde meme kanserinin yanı sıra akciğer kanseri hücre hattında da VA'in apoptotik etkisinin olduğu belirtilmiştir (Günaydın, 2021).

Tez alışması kapsamında VA ile kemoterapötik ilaçların (Doxorubisin+DOX, Mitaksantron+MIX) sinerjik etki gösteren kombinasyon dozları (VA+DOX ve VA+MIX) MDA-MB-453 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının apoptoz üzerine etkilerini belirlemek için Annexin V-FITC (Apoptosis) alışması yapıldı. Yapılan alışma sonucunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerine uygulanan VA+DOX ve VA+MIX

kombinasyonlarının kontrole göre kıyaslandığında hücreleri apoptoza MDA-MB-453 hücre hattına göre daha az yönlendirdiği, ancak kombinasyonların sinerjik etki dozlarının MDA-MB-453 hücrelerini apoptozu indüklediği belirlenmiştir.

Mitokondri intrinsik apoptotik yolakta önemli bir rol oynar ve membran bütünlüğündeki herhangi bir bozulma, ölüm sinyal kaskadını başlatan apoptotik efektörlerin salınmasına neden olabilir. Bu nedenle kanser hücreleri üzerinde mitokondriyal membranın bozulması, hücrelerin apoptoza yönelimleri için önemli bir basamaktır. BAX/BCL 2 oranındaki herhangi bir değişiklik sonucu mitokondri membranı bozulmaya başlar ve bu bozulma sonucunda mitokondriden sitozole sitokrom C salınır. Sitokrom C'ler kaspazları aktive eder ve hücre apoptoza yönelir.

Kalın (2022) yapmış olduğu VA ile yapmış olduğu çalışma sonucunda MCF-7 ve MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatları üzerinde apoptotik yolak markırlarının her iki hücre hattında da farklı sonuçlar sergilediğini belirlemiştir. VA'nın MCF-7 hücre hattında apoptotik yolağı etkilemediği, ancak MDA-MB-453 hücre hattında ise inhibisyona sebep olduğunu belirtmiştir. Flow sitometri çalışmaları neticesinde; Vulpinik asidin meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-453 hücreleri üzerindeki olası sitostatik etkisini belirlemek için, hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki (G0/G1, S ve G2/M gibi) hücre popülasyonlarının dağılımının; VA'nın MCF-7 hücrelerinde hem G0/G1 ($p < 0.01$) hem de G2/M ($p < 0.001$) fazlarındaki hücre popülasyonlarının oranını artırırken, S fazındaki hücre popülasyonunu ($p < 0.001$) kontrol hücrelerine kıyasla azalttığını göstermiştir. MDA-MB-453 hücrelerinde ise VA, S fazındaki hücre popülasyonunu azaltırken ($p < 0.001$), G2/M ($p < 0.001$) fazındaki popülasyonu artırmış ve G0/G1 ($p > 0.05$) fazında önemli bir değişikliğin bulunmadığını belirtmiştir (Kalın vd., 2022).

Likenlerin pek çok biyolojik aktivite sergilediği literatürde yapılmış çalışmalarla belirtilmiştir. Likenlerin ayrıca hücre döngüsünde G0/G1, S veya G2/M fazlarına etki ederek hücre döngüsünü durdurabildiği de bilinmektedir (Hirota vd., 2002; Shrestha ve St. Clair, 2013). Aynı zamanda liken asitlerinin hücresel birçok yolakta da çeşitli etkinliklere sahip olduğu bilinmektedir (Mohammadi vd., 2022).

Kılıç ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada vulpinik asitin sitotoksik etkilerini ve çeşitli kanser hücre hatlarını (CaCo2, HepG2, Hep2C, RD Wehi) ve normal hücreleri (Vero ve L929) inhibe eden farklı konsantrasyonlarını hücreler üzerine uygulamışlardır. VA'nın

apoptotik moleküler paternlerinin belirlenebilmesi için western blot ve RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada hem gen hem de protein seviyelerindeki transkriptom değişiklikleri benzer sonuçlar göstermiştir. Bax, Bcl-2 ve p53 genlerinin mRNA seviyelerinin belirlenmesi, kanser ve normal hücre hatlarında qRT-PCR ile gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları, vulpinik asidin IC₅₀ değerinin, incelenen tüm kanser hücrelerinde Bax, Bcl-2 ve p53 genlerinin mRNA seviyelerini tedavi edilmeyen hücrelere kıyasla değiştirdiğini göstermiştir. İncelenen genlerin mRNA seviyeleri karşılaştırıldığında, Bax geninin tüm hücre hatlarında Bcl-2 ve p53 genlerine kıyasla daha fazla ekspresyon artışı gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlarla, VA'nın mRNA seviyeleri üzerindeki apoptotik etkisi ilk kez değerlendirilmiştir. (Kılıç vd., 2018).

Cansaran-Duman ve ark (2021) yaptıkları çalışmada MCF-7 ve MCF-12A hücreleri üzerine VA'nın antikanser etkilerini mRNA'lar aracılığıyla belirlemişlerdir. Çalışmada miRNA dizisi ve biyoinformatik analizlerin sonuçları, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 12 miRNA'nın vulpinik aside spesifik olarak duyarlı olduğunu göstermiştir ve VA'nın 12 miRNA'nın ekspresyonunu inhibe ettiğini ve meme kanseri hücre proliferasyonunu baskıladığını ortaya koymuştur. Çalışma ayrıca VA'nın FOXO-3 genini baskılayarak 12 miRNA'nın ekspresyonunu aşağı regüle edebileceğini ortaya koymuştur. miRNA hedeflerinin esas olarak apoptoz, hücre döngüsü ve MAPK yollarında rol oynadığı bulunmuştur. Ayrıca, Bcl-2, Bax, procaspase-3 ve procaspase-9 protein seviyeleri, protein seviyesinde apoptozun doğrulanması için western blot analizi ile değerlendirilmiştir (Cansaran-Duman vd., 2021).

VA'nın farklı biyolojik aktivite sergileyen çalışmalar yakın zamanda literatüre kazandırılmıştır. Özellikle meme kanseri üzerinde önemli ölçüde etkinliğe sahip olduğu düşünülmektedir. Kemoterapötik ilaçların yan etkisini azaltabilmek için bazı doğal ürünlerle kombinasyonlarının uygulamaları yapılmaktadır (Calaf vd., 2018; Tekin, 2021; Vargas vd., 2020). Ancak literatürde bu amaçla VA ile kemoterapötik ilaçların kombinasyonlarının meme kanseri hücre hatları (MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-453) üzerindeki etkileri henüz bilinmemektedir. Bu kapsamda yapılan bu tez çalışması ile VA+DOX ve VA+MIX kombinasyon dozlarının meme kanseri hücre hatları üzerindeki mitokondri membran potansiyeli, multi kaspaz aktivitesi, ROS, hücre döngüsü üzerine etkileri şu şekildedir;

Yapılan tez çalışması sonucunda VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonu uygulanan hücre hatlarında (MDA-MB-231 ve MDA-MB-453) kontrole göre ilaçlı gruplar karşılaştırıldığında ilaçlı grupların depolarize canlı ve depolarize ölü hücre popülasyonlarında artış, canlı hücre popülasyonlarında azalış görülmektedir. Bu sonuçlar ele alındığında her iki hücre hattı üzerine uygulanan sinerjik etki kombinasyon dozlarında her iki hücre hattında da mitokondri membranında bozulmalar meydana gelmiştir.

Mitokondriyal membran potansiyelindeki herhangi bir bozulma, sitokrom c'nin sitozole salınmasına yol açar, bu da mitokondride kaspaz kaskadının aktivasyonuna neden olur. Aktive kaspazlar ise hücreyi apoptoza yönlendirir. Her iki hücre hattı üzerinde uygulanan sinerjik kombinasyon dozlarının kaspaz+ ve kaspaz+/Ölü hücre popülasyonlarını kontrole göre artırdığı, canlı hücre popülasyonlarının ise kontrole göre azaldığı belirlenmiştir.

Reaktif oksijen türleri, çeşitli reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin tümüne verilen isimdir. ROS'lar bulundukları dokuya ciddi zararlar verirler bu nedenle kanser hücrelerinde ROS miktarındaki artış önem arz etmektedir. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatlarına belirlenen sinerjik etki dozlarında uygulanması sonucunda MDA-MB-453 hücre hattında VA+DOX-2 olarak kodlanan dozunda önemli bir ROS artışının meydana geldiği, ancak VA+MIX dozlarının hücre üzerinde fazla oksidatif stres oluşturmadığı, MDA-MB-231 hücrelerinde ise VA+DOX ve VA+MIX-3 dozlarının oksidatif stres oluştururken diğer dozların oluşturmadığı belirlenmiştir.

Hücreler, işlevlerini yerine getirebilmek ve çoğalmak için sürekli ve düzenli bir döngü içerisinde yer alırlar. Bir hücrenin bir döngüsünün tamamlanması 4 temel basamaktan oluşur: G0, G1, S, G2 ve M evreleri. Bu evreleri tamamlayan hücre artık yeni bir kopyasını oluşturmuş olur. Sağlıklı hücrelerin döngüsü bu şekilde ilerleme kaydederken kanserli hücrelerde döngünün durdurulması gereklidir. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının hücrelere uygulanması sonucunda elde edilen grafiklerde özellikle hücre popülasyonlarının G0/G1 evresinde yüksek tutulma olduğu belirlenmiştir.

PI3K/AKT/mTOR yolu, hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli olan hücre içi bir sinyal yoludur. Bu nedenle hücresel durgunluk, çoğalma, kanser ve uzun ömürle doğrudan ilişkilidir. PI3K aktivasyonu AKT'yi fosforile edip aktive ederek plazma

membranında lokalize eder (King, Yeomanson, ve Bryant, 2015). Normal hücrelerin yaşamsal faaliyetlerinin devamını sağlayan bu yolağın aktivasyonu önemli iken kanser hücrelerinde hücrelerin apoptozdan kaçmak için kullandığı yolaklardan biridir. Birçok kanserde bu yolak aşırı derecede aktiftir, dolayısıyla apoptozu azaltır ve kanserli hücrelerde çoğalmaya izin verir (Peltier, O'Neill, ve Schaffer, 2007).

Pek çok meme kanseri türünde PI3K/AKT/mTOR yolağında gerçekleşen anormallikler en sık görülen genomik anormalliklerdir. Bilinen en yaygın anormallikler arasında PIK3CA gen mutasyonu ve fonksiyon kaybı mutasyonları veya PTEN'in epigenetik susturulması yer almaktadır (Raphael vd., 2018). Rapamisinin fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt) /memeli hedefi (mTOR) yolu, meme kanseri vakalarının yaklaşık %30-40'ında aktive olur. Üçlü negatif meme kanserinde, PI3K/AKT/mTOR yolunun onkogenik aktivasyonu, EGFR gibi yukarı akış düzenleyicilerinin aşırı ekspresyonunun, PIK3CA mutasyonlarının aktive edilmesinin, fonksiyon kaybının veya fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) ekspresyonunun bir fonksiyonu olarak meydana gelebilir (Costa vd., 2018).

PI3K/AKT sinyal yolağı etkilerine bakıldığında MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde uygulanan kombinasyon dozlarının (VA+DOX ve VA+MIX) etkileri şekil x de görülmektedir. Kontrol grubuna göre hücre popülasyonlarına bakıldığında aktivasyon oranlarının uygulanan dozlarda %81'den %43'lere kadar düşürdüğünü, inaktive hücre popülasyonlarında ise hücrelerin %0,10'dan %39,30'a kadar artış gösterdiği belirlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde uygulanan dozların PI3K/AKT sinyal yolağını inhibe ettiği belirlenmiştir.

MDA-MB-453 hücre hattı üzerinde uygulanan kombinasyon dozlarının (VA+DOX ve VA+MIX) etkileri şekil x de görülmektedir. Kontrol grubuna göre hücre popülasyonlarına bakıldığında aktivasyon oranlarının uygulanan dozlarda %86'dan %14,8'e kadar düşürdüğü, inaktive hücre popülasyonlarında ise hücrelerin %16,9'dan %85,2'ye kadar artış gösterdiği belirlenmiştir. MDA-MB-453 hücre hattı üzerinde uygulanan dozların PI3K/AKT sinyal yolağını inhibe ettiği belirlenmiştir.

Tezin son aşamasında yapılan çalışmalarla; VA+DOX ve VA+MIX sinerjik etki kombinasyon dozlarının PI3K sinyal yolağı ile yapılan flow sitometri çalışmaları sonucunda uygulanan dozların bu yolak üzerinde inhibisyon sergilediği belirlenmiştir.

Yapılan western blot çalışmasından elde edilen sonuçlar, her iki hücre hattı üzerine uygulanan sinerjik etki dozlarının hem apoptotik yolak proteinleri hem de PI3K yolak proteinlerinde apoptoz ve PI3K yolak inhibisyon sonuçları ile benzer sonuçlar sergilediği belirlenmiştir. CI değerleri ile muamele edilen MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatlarının flow sitometrik analiz sonuçlarından elde edilen verileri doğrulamak amacıyla gen ve protein ekspresyon profilleri de incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda VA+DOX kombinasyonunun apoptotik yolak markırı BAX/BCL2 oranının ve p53 miktarının MDA-MB-231 hücre hattında arttığı, buna karşın Sitokrom-c, Kaspaz-3 ve Cleaved kaspaz-3 miktarlarında azalış olduğu belirlenmiştir. VA+MIX kombinasyonunda ise aynı hücre hattında hem BAX/BCL2 oranını hem de p53, Kaspaz-3, Cleaved kaspaz3 ve Sitokrom-c miktarlarında da artış sergilediği bulunmuştur. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı proteinlerinin ise MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde hem VA+DOX hem de VA+MIX kombinasyonlarının uygulanması sonucunda AKT, PI3K, mTOR, P-AKT miktarlarında düşüş meydana geldiği gözlemlenmiştir. Her iki kemoterapötik ilaç kombinasyonunun kullanılan en iyi CI değerlerinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağını protein seviyesinde baskıladığı bulunmuştur.

MDA-MB-453 hücre hattında ise uygulanan VA+DOX kombinasyon dozlarının BAX/BCL2 oranını artırdığı, buna karşın p53, Kaspaz-3, Cleaved kaspaz3 ve Sitokrom-c miktarlarında azalış meydana geldiği belirlenmiştir. Aynı hücre hattında VA+MIX kombinasyonunda ise p53 miktarında azalış, Kaspaz-3, Cleaved kaspaz3 ve Sitokrom-c miktarlarında artış gözlemlenmiştir. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı proteinlerinin ise MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde hem VA+DOX hem de VA+MIX kombinasyonlarının uygulanması sonucunda AKT, PI3K, mTOR, P-AKT miktarlarında düşüş meydana geldiği gözlemlenmiştir. Her iki kemoterapötik ilaç kombinasyonunun kullanılan en iyi CI değerlerinin MDA-MB-453 hücre hattı üzerinde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağını protein seviyesinde baskıladığı bulunmuştur.

Yapılan PCR çalışmaları sonucunda; VA+DOX ve VA+MIX sinerjik etki kombinasyon dozlarının MDA-MB-453 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki etkileri zaman bağımlı olarak etkileri incelenmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattında hem VA+DOX hem de VA+MIX kombinasyonlarında, BAX/BCL2 oranında artış, sitokrom-c, kaspaz-3 ve p53 seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Elde edilen bu qPCR sonuçları protein seviyesinde olduğu gibi gen

seviyesinde de benzer sonuçlar sergilemiş, uygulanan dozların gen seviyesinde de hücreleri apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir. Ancak uygulanan dozların PI3K sinyal yolağı genlerinde protein seviyesinde PI3K, AKT ve mTOR'da baskıladıkları görülürken, gen seviyesinde indüklediği belirlenmiştir.

MDA-MB-453 hücre hattında da hem VA+DOX hem de VA+MIX kombinasyonlarında, BAX/BCL2 oranında artış, sitokrom-c, kaspaz-3 ve p53 seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Elde edilen bu qPCR sonuçları protein seviyesinde olduğu gibi gen seviyesinde de benzer sonuçlar sergilemiş, uygulanan dozların gen seviyesinde de hücreleri apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir. Ancak uygulanan dozların PI3K sinyal yolağı genlerinde protein seviyesinde PI3K, AKT ve mTOR'da baskıladıkları görülürken, gen seviyesinde indüklediği belirlenmiştir.

VA'nın insan epidermal keratinosit hücre hattı (HaCaT) üzerinde yara izi iyileşme deneyleri gerçekleştirilmiş ve HaCaT hücreleri üzerinde orta seviyeli bir yara kapanma etkisinin olduğu gösterilmiştir (Burlando vd., 2009). Kalın (2022) yaptığı çalışmasında ise meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-453) üzerinde VA'nın kontrol grubuna kıyasla önemli derecede hücre göçünü baskıladığını gözlemlemiştir (Kalın vd., 2022).

Literatürde VA ile ilgili çalışmalarda yara iyileştirme çalışmaları oldukça sınırlı olup, VA ile kemoterapötik ilaçların kombinasyonel şekilde sinerjik etki sergilediği dozlarla meme kanseri hücre hatları üzerindeki migratif etkisine dair literatürde herhangi bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise, Vulpinik Asit (VA) ile kemoterapötik ilaçların (Doxorubisin -DOX, Mitaksantron – MIX) sinerjik etki gösteren kombinasyon dozları (VA+DOX ve VA+MIX) MDA-MB-453 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının migrasyonu üzerine etkisini belirlemek için migrasyon testi (wound healing / yara iyileştirme) yapıldı. Hücreler arasında oluşturulan boşluğun (yaranın) alanlarının karşılaştırılması Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir. Şekil 1'de MDA-MB-231 hücre hattı üzerine uygulanan sinerjik etki dozlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubuna kıyasla hücrelerin oluşturulan yara alanının yüzdesini artırarak migrasyonu önemli bir şekilde baskıladığı ($p<0,05$), benzer şekilde Şekil 2'de de MDA-MB-453 hücre hattına yapılan uygulama sonucunda aynı zaman aralığında kontrol grubuna kıyasla hücrelerin oluşturulan yara alanının yüzdesini artırarak migrasyonu baskıladığı ($p<0,05$)

belirlenmiştir. Her iki hücre hattı üzerinde 24 ve 48 saatlik sinerjik etki dozlarının hücrelerin migrasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği belirlendi.

VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 üzerindeki sinerjik antikanser etkilerinin moleküler seviyede araştırılması ilk kez gerçekleştirilmiş olup literatürde henüz bu kapsamda bir çalışma mevcut değildir. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonunun MCF-7 hücre hattında sergilediği antagonistik etki sonucu da oldukça önemlidir. Öncelikle VA'nın, doz ve zaman bağımlı olarak canlılık üzerine etkisi incelenmiştir ve meme kanser hücre hatlarından MCF-7, MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücrelerinde etkin dozları belirlenmiştir. Aynı şekilde kemoterapötik ilaçlar (DOX, MIX, DOC, CİS) da meme kanseri hücre hatları üzerinde farklı dozlarda uygulanmış ve etkin dozları belirlenmiştir. VA'nın kemoterapötik ilaçlar ile potansiyel sinerjik antikanser etkileri kombinasyon İndeks (CI) değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. CI dozları ile muamele edilen hücrelerdeki ROS miktarı, apoptotik yolak, PI3K/AKT sinyal yolağı ve hücre döngüsündeki değişimler hem flow stometrik ve hem de moleküler seviyede araştırılmıştır.

6. ÖNERİLER

- VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonları MCF-7 hücreleri üzerinde antagonistik etki gösterdi. VA+DOX, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde bir kombinasyon dozunda hafif sinerjik etki, VA+MIX ise aynı hücre hattı üzerinde uygulanan ilk dört kombinasyonda sinerjik etki gösterdi. VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonları MDA-MB-453 hücreleri üzerine uygulanan tüm kombinasyonlarda güçlü sinerjik etki gösterdi.
- Bileşiklerin uygulanan kombinasyonları MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatlarında ROS miktarını artırmıştır. ROS miktarlarının artışına sebep olan kombinasyonların antioksidan savunma sistemleri üzerindeki etkileri (Glutasyon sistem, Tioredoksin sistem) incelenebilir.
- VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatlarında migratif etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Anti-migrasyon etkileri invazyon ve migrasyon etkileriyle ilgili yolaklarda rol alan markır protein ve gen çalışmaları ile belirlenebilir.
- VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarının MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerinde bağışıklık sisteminde meydana getirebilecek etkilerinin belirlenebilmesi için bağışıklık sistemi ile ilişkili yolaklar çalışılabilir.
- MDA-MB-231 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerine uygulanan VA+DOX ve VA+MIX kombinasyonlarından elde edilen sonuçlar *in-vivo* çalışmalara kapı aralamıştır. Bu bağlamda belirlenen kombinasyonlar *in-vivo* hayvan deneyleri yapılarak organizma üzerindeki etkileri incelenebilir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman, O. (2020). "Efficacy and toxicity outcomes of elderly castrate-resistant prostate cancer patients treated with docetaxel—A pooled analysis of 3 randomized studies", *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 38 (4), 210-215.
- Abraham, J., and Staffurth, J. (2016). "Hormonal therapy for cancer", *Medicine*, 44(1), 30-33.
- Aktaş, G. (2014). "Antibiyotik kombinasyonları ve sinerjistik etkileşimleri" *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 44(2), 47-55.
- Aldossary, S. A. (2019). "Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin", *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1), 7-15.
- Altay, A., Caglar, S., Caglar, B., & Sahin, Z. S. (2019). "Novel silver (I) complexes bearing mefenamic acid and pyridine derivatives: Synthesis, chemical characterization and in vitro anticancer evaluation", *Inorganica Chimica Acta*, 493, 61-71.
- Altay, A., Kılıc Suloglu, A., Sagdicoglu Celep, G., Selmanoglu, G., & Bozoglu, F. (2019). "Anatolian sage *Salvia fruticosa* inhibits cytosolic glutathione-s-transferase activity and colon cancer cell proliferation", *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 1390-1399.
- Altay, A., Yeniçeri, E. K. K., Taslimi, P., Taskin-Tok, T., Yılmaz, M. A., & Köksal, E. (2022). "Phytochemical Analysis and Biological Evaluation of *Hypericum linarioides* Bosse: in Vitro and in Silico Studies", *ChemistrySelect*, 7(23), e202200039.
- Altun, S., & Budak, H. (2021). "The protective effect of the cardiac thioredoxin system on the heart in the case of iron overload in mice", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 64, 126704.
- Amaral, R. G., dos Santos, S. A., Andrade, L. N., Severino, P., & Carvalho, A. A. (2019). "Natural products as treatment against cancer: a historical and current vision", *Clinical Oncology*, 4(5), 1562.
- Ashrafizadeh, M., Mirzaei, S., Hashemi, F., Zarrabi, A., Zabolian, A., Saleki, H., Hushmandi, K. (2021). "New insight towards development of paclitaxel and docetaxel resistance in cancer cells: EMT as a novel molecular mechanism and therapeutic possibilities", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111824.
- Atashzar, M. R., Baharlou, R., Karami, J., Abdollahi, H., Rezaei, R., Pourramezan, F., Zoljalali Moghaddam, S. H. (2020). "Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications", *Journal of Cellular Physiology*, 235(2), 790-803.

- ATCC. (2023). The Global Bioresource Center | ATCC. Retrieved from <https://www.atcc.org/>, Son erişim tarihi: 05.03.2023.
- Ayhancı, A., & Gültekin, G. (2008). “*In Vivo* ve *In Vitro* Şartlarda Cyclophosphamide Mutajenitesi ile Verapamil Etkileşiminin Umu Test Sistemi ile Ratların İdrarlarında İncelenmesi”, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 113-130.
- Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L., & Vogt, P. K. (2005). “Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation”, *Nature Reviews Cancer*, 5(12), 921-929.
- Baytop, T. (1999). “Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present) ”, *Publication of the istanbul University*, 312, 2-3.
- Bebert, J. (1831). “Sur une nouvelle substance découverte dans le lichen vulpinus”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17, 696-700.
- Bektaş, H. A., & Akdemir, N. (2009). “Kanserli bireylerde fonksiyonel durumun önemi”, *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12(3), 54-60.
- Belyi, V. A., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., & Levine, A. J. (2010). “The origins and evolution of the p53 family of genes”, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(6), a001198.
- Bhattacharyya, S., Deep, P. R., Singh, S., & Nayak, B. (2016). “Lichen secondary metabolites and its biological activity”, *American Journal of PharmTech Research*, 6(6), 1-7.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Greenberg, M. E. (1999). “Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor”, *cell*, 96(6), 857-868.
- Budak, B., Kalın, Ş. N., & Yapça, Ö. E. (2023). “Antiproliferative, antimigratory, and apoptotic effects of diffractaic and vulpinic acids as thioredoxin reductase 1 inhibitors on cervical cancer”, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1-11.
- Burdick, A. D., Davis, J. W., Liu, K. J., Hudson, L. G., Shi, H., Monske, M. L., & Burchiel, S. W. (2003). “Benzo (a) pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells”, *Cancer research*, 63(22), 7825-7833.
- Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F., & Verotta, L. (2009). “Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds”, *Planta medica*, 75(06), 607-613.
- Calaf, G. M., Ponce-Cusi, R., & Carrión, F. (2018). “Curcumin and paclitaxel induce cell death in breast cancer cell lines”, *Oncology Reports*, 40(4), 2381-2388.

- Calcott, M. J., Ackerley, D. F., Knight, A., Keyzers, R. A., & Owen, J. G. (2018). "Secondary metabolism in the lichen symbiosis", *Chemical Society Reviews*, 47(5), 1730-1760.
- Canli, Ö., Nicolas, A. M., Gupta, J., Finkelmeier, F., Goncharova, O., Pesic, M., Sahin, U. (2017). "Myeloid cell-derived reactive oxygen species induce epithelial mutagenesis", *Cancer cell*, 32(6), 869-883. e865.
- Cansaran-Duman, D., Guney Eskiler, G., Colak, B., & Sozen Kucukkara, E. (2021). "Vulpinic acid as a natural compound inhibits the proliferation of metastatic prostate cancer cells by inducing apoptosis", *Molecular biology reports*, 48, 6025-6034.
- Cansaran-Duman, D., Yangin, S., & Çolak, B. (2021). "The role of vulpinic acid as a natural compound in the regulation of breast cancer-associated miRNAs", *Biological Research*, 54.
- Cantrell, D. A. (2001). "Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways", *Journal of cell science*, 114(8), 1439-1445.
- Chan, D. W., Liu, V. W., Tsao, G. S., Yao, K.-M., Furukawa, T., Chan, K. K., & Ngan, H. Y. (2008). "Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells", *Carcinogenesis*, 29(9), 1742-1750.
- Chen, Q., & Lesnefsky, E. J. (2006). "Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain", *Free Radical Biology and Medicine*, 40(6), 976-982.
- Chou, T.-C., & Talalay, P. (1984). "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors", *Advances in enzyme regulation*, 22, 27-55.
- Comşa, Ş., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). "The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research", *Anticancer research*, 35(6), 3147-3154.
- Costa, R. L., Han, H. S., & Gradishar, W. J. (2018). "Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review", *Breast cancer research and treatment*, 169, 397-406.
- Courtney, R., Ngo, D. C., Malik, N., Ververis, K., Tortorella, S. M., & Karagiannis, T. C. (2015). "Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K", *Molecular biology reports*, 42, 841-851.
- Çağlar, S., Altay, A., Çağlar, B., Yeniçeri, E. K. K., & Harurluoğlu, B. (2022). "In Vitro Cytotoxic Evaluation of a Silver (I) Complex Including Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Niflumic Acid and 3-Picoline on Human-Derived Cancer Cell Lines", *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 15(3), 736-748.

- D'Alessio, M., Cerella, C., De Nicola, M., Bergamaschi, A., Magrini, A., Gualandi, G., Ghibelli, L. (2003). "Apoptotic GSH extrusion is associated with free radical generation", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1010(1), 449-452.
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action", *European journal of pharmacology*, 740, 364-378.
- De Logu, A., Borgna, R., Uda, P., Sanna, A., Pellerano, M. L., & Saddi, B. (2003). "The 2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assay as rapid colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of clinical Mycobacterium tuberculosis isolates in liquid medium", *Clinical laboratory*, 49(7-8), 357-365.
- Demir, Y., Ceylan, H., Türkeş, C., & Beydemir, Ş. (2022). "Molecular docking and inhibition studies of vulpinic, carnosic and usnic acids on polyol pathway enzymes", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(22), 12008-12021.
- Demirci, S., Alp, C., Akşit, H., Ulutaş, Y., Altay, A., Yeniçeri, E., Yaylı, N. (2023). "Isolation, characterization and anticancer activity of secondary metabolites from *Verbascum speciosum*", *Chemical Biology & Drug Design*, 101 (6), 1273-1282.
- DeSantis, C. E., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2019). "Cancer statistics for african americans, 2019", *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(3), 211-233.
- DeVita Jr, V. T., & Chu, E. (2008). "A history of cancer chemotherapy", *Cancer research*, 68(21), 8643-8653.
- Dhyani, P., Quispe, C., Sharma, E., Bahukhandi, A., Sati, P., Attri, D. C., Mardare, I. (2022). "Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine", *Cancer cell international*, 22(1), 1-20.
- Djadjdikerta, A., Keshri, S., Pavel, M., Prestil, R., Ryan, L., & Rubinsztein, D. C. (2020). "Autophagy induction as a therapeutic strategy for neurodegenerative diseases", *Journal of molecular biology*, 432(8), 2799-2821.
- Drăgănescu, M., & Carmocan, C. (2017). "Hormone therapy in breast cancer", *Chirurgia*, 112(4), 413-417.
- Duman, D. C., Eskiler, G. G., Çolak, B., & Kucukkara, E. S. (2021). "Vulpinic Acid as a Natural Compound Inhibits the Proliferation of Metastatic Prostate Cancer Cell by Inducing Apoptosis", *Molecular Biology Reports*, 48, 6025-6034.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death", *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Emami, F., Pathak, S., Nguyen, T. T., Shrestha, P., Maharjan, S., Kim, J. O., Yook, S. (2021). "Photoimmunotherapy with cetuximab-conjugated gold nanorods

- reduces drug resistance in triple negative breast cancer spheroids with enhanced infiltration of tumor-associated macrophages”, *Journal of Controlled Release*, 329, 645-664.
- Emsen, B., Aslan, A., Turkez, H., Taghizadehghalehjoughi, A., & Kaya, A. (2018). “The anti-cancer efficacies of diffractaic, lobaric, and usnic acid: In vitro: inhibition of glioma”, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(5), 941-951.
- Epstein, R. M. (2007). “How doctors think”, *The Journal of Clinical Investigation*, 117(10), 2738-2738.
- Ergün, E., Toraman, E., Barış, Ö., Budak, H., & Demir, T. (2023). “Quantitative investigation of the bacterial content of periodontal abscess samples by real-time PCR”, *Journal of Microbiological Methods*, 213, 106826.
- Farha, N. G., & Kasi, A. (2019). “Docetaxel”, *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2023, PMID: 30725927.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., & Piñeros, M. (2020). “Global Cancer Observatory: Cancer Today”, *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer*.
- Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2008). “Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis”, *cell*, 135(7), 1161-1163.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Andrews, D. W. (2018). “Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018”, *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
- Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Palejwala, A., Tepikin, A. V., Petersen, O. H., & Watson, A. J. (2002). “Menadione-induced apoptosis: roles of cytosolic Ca²⁺ elevations and the mitochondrial permeability transition pore”, *Journal of cell science*, 115(3), 485-497.
- Globocan. (2023). Global Cancer Observatory cancer incidence. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/>, Son erişim tarihi: 12.07.2023.
- González-Burgos, E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2021). “Vinca alkaloids as chemotherapeutic agents against breast cancer”, *Discovery and Development of Anti-Breast Cancer Agents from Natural Products*, 69-101.
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). “Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy”, *Nature reviews Drug discovery*, 12(12), 931-947.
- Goryacheva, O. A., Pidenko, P. S., Markin, A. V., Markina, N. E., Tsupka, D. V., Mordovina, E. A., Strokin, P. D. (2023). “Current trends and challenges in the mitoxantrone measuring in biofluids and new pharmaceutical systems”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117373.

- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). "Cell death signaling", *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(12), a006080.
- Groeger, G., Quiney, C., & Cotter, T. G. (2009). "Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule", *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), 2655-2671.
- Guo, X.-L., Kang, X.-X., Wang, Y.-Q., Zhang, X.-J., Li, C.-J., Liu, Y., & Du, L.-B. (2019). "Co-delivery of cisplatin and doxorubicin by covalently conjugating with polyamidoamine dendrimer for enhanced synergistic cancer therapy", *Acta Biomaterialia*, 84, 367-377.
- Günaydın, Ş. (2021). "Liken asitlerinin insan akciğer kanser hücre hattı üzerine tiyoredoksin redüktaz hedefli antikanser etkisinin gen ve protein seviyesinde araştırılması / Investigation of thioredoxin reductase targeted anticancer effect of lichen acids on human lung cancer cell line at gene and protein levels", Yüksek Lisans, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, 1-131.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). "Free radicals in biology and medicine", *Oxford university press*, USA.
- Hampton, M. B., & Orrenius, S. (1997). "Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis", *FEBS letters*, 414(3), 552-556.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation", *cell*, 144(5), 646-674.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Cardoso, F. (2019). "Breast cancer", *Nature reviews Disease primers*, 5(1), 1-31.
- Harurluoglu, B., Altay, A., Caglar, S., Yeniceri, E. K. K., Caglar, B., & Şahin, Z. S. (2021). "Binuclear silver (I) complexes with the non-steroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid: Synthesis, characterization, cytotoxic activity and evaluation of cellular mechanism of action", *Polyhedron*, 202, 115189.
- Hettiarachchi, S. M., Thilakaratne, D., Dharmasena, D., Rathnapala, A., Abeysinghe, P., & Perera, E. (2021). "Docetaxel-induced interstitial lung disease among patients with breast cancer: a case series and review of literature", *Respirology Case Reports*, 9(7), e00802.
- Hirota, M., Ito, T., Okudela, K., Kawabe, R., Yazawa, T., Hayashi, H., Kitamura, H. (2002). "Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus", *Journal of oral pathology & medicine*, 31(4), 204-212.
- Horie, K., Urano, T., Ikeda, K., & Inoue, S. (2003). "Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 85(2-5), 101-104.

- Huck, B. R., & Mochalkin, I. (2017). "Recent progress towards clinically relevant ATP-competitive Akt inhibitors", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(13), 2838-2848.
- Huneck, S., Yoshimura, I., Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996). "Identification of lichen substances", *Springer*, Berlin Heidelberg, (pp. 11-123).
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Sollott, S. J., Der, C. J., Fearon, E. R., Goldschmidt-Clermont, P. J. (1997). "Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts", *Science*, 275(5306), 1649-1652.
- Jackson, J. H. (1994). "Potential molecular mechanisms of oxidant-induced carcinogenesis", *Environmental health perspectives*, 102(10), 155-157.
- Jiang, J., Wang, K., Chen, Y., Chen, H., Nice, E. C., & Huang, C. (2017). "Redox regulation in tumor cell epithelial-mesenchymal transition: Molecular basis and therapeutic strategy", *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), 1-12.
- Kalın, Ş. N. (2022). "İnsan meme kanser hücre hatları üzerine bazı liken asitlerinin tiyoredoksin sistem hedefli antikanser etkisinin gen ve protein seviyesinde araştırılması / Investigation of the anticancer effect of some lichen acids on human breast cancer cell lines at the gene and protein levels through thioredoxin system-targeting", Doktora, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, 1-150.
- Kalın, Ş. N., Altay, A., & Budak, H. (2022). "Inhibition of thioredoxin reductase 1 by vulpinic acid suppresses the proliferation and migration of human breast carcinoma", *Life Sciences*, 310, 121093.
- Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., Dini, L. (2002). "Cell death: apoptosis versus necrosis", *International journal of oncology*, 21(1), 165-170.
- Karaca, E. (2021). "İnsan karaciğer kanser hücre hattı üzerine liken asitlerinin tiyoredoksin redüktaz hedefli antikanser etkisinin gen ve protein seviyesinde araştırılması / Investigation of thioredoxin reductase targeted anticancer effect of lichen acids on human liver cancer cell line at gene and protein levels", Yüksek Lisans, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Atatürk Üniversitesi, 1-143.
- Karamanoğlu, K. (1971). "Türkiye'nin önemli liken türleri", *Ankara Eczacılık Fakültesi*, 1(53), 53-75.
- Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). "Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis", *Advances in protein chemistry and structural biology*, 125, 73-120.
- KEGGPATHWAY. (2023). "KEGG signaling pathways Database", Retrieved from <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> , Son erişim tarihi: 15.02.2023.
- Kelekar, A., & Thompson, C. B. (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis", *Trends in cell biology*, 8(8), 324-330.

- Khavari, T. A., & Rinn, J. L. (2007). "Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia", *Cell cycle*, 6(23), 2928-2931.
- Kılıç, N., Aras, S., & Cansaran-Duman, D. (2018). "Determination of vulpinic acid effect on apoptosis and mRNA expression levels in breast cancer cell lines", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(14), 2032-2041.
- King, D., Yeomanson, D., & Bryant, H. E. (2015). "PI3King the lock: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma", *Journal of pediatric hematology/oncology*, 37(4), 245-251.
- Klein, E., Thompson, I., Tangen, C., Lucia, M., Goodman, P., Minasian, L., Karp, D. (2012). "Vitamin E and the risk of prostate cancer: Updated results of the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial", *Philpapers*.
- Klionsky, D. J. (2008). "Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve", *Autophagy*, 4(6), 740-743.
- Koc, S., Tufan-Cetin, Ö., Candan, M., Turk, A., & Çetin, H. (2021). "Larvicidal activity of lichen secondary metabolites atranorin and (-)-usnic acid against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*", *Fresenius Environmental Bulletin*, 30(11), 11938-11941.
- Koparal, A. T. (2015). "Anti-angiogenic and antiproliferative properties of the lichen substances (-)-usnic acid and vulpinic acid", *Zeitschrift für Naturforschung C*, 70(5-6), 159-164.
- Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S., Stanojković, T., & Ranković, B. (2013). "Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents", *Food and chemical toxicology*, 53, 112-118.
- Layosa, M. A. A., Lage, N. N., Chew, B. P., Atienza, L., Mertens-Talcott, S., Talcott, S., & Noratto, G. D. (2021). "Dark sweet cherry (*Prunus Avium*) phenolics enriched in anthocyanins induced apoptosis in Mda-Mb-453 breast cancer cells through mapk-dependent signaling and reduced invasion via Akt and Plcy-1 downregulation", *Nutrition and Cancer*, 73(10), 1985-1997.
- Lee, W. C., Choi, C. H., Cha, S. H., Oh, H. L., & Kim, Y. K. (2005). "Role of ERK in hydrogen peroxide-induced cell death of human glioma cells", *Neurochemical research*, 30, 263-270.
- Levy, J. M. M., Towers, C. G., & Thorburn, A. (2017). "Targeting autophagy in cancer", *Nature Reviews Cancer*, 17(9), 528-542.
- Liou, G.-Y., & Storz, P. (2010). "Reactive oxygen species in cancer", *Free radical research*, 44(5), 479-496.
- Liu, L.-Z., Hu, X.-W., Xia, C., He, J., Zhou, Q., Shi, X., Jiang, B.-H. (2006). "Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial

- growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells'', *Free Radical Biology and Medicine*, 41(10), 1521-1533.
- Maghzi, A.-H., Borazanci, A., McGee, J., Alexander, J. S., Gonzalez-Toledo, E., & Minagar, A. (2011). "Multiple sclerosis: pathophysiology, clinical features, diagnosis, and management'', *Neuroinflammation* (pp. 1-23): Elsevier.
- Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W., & Kurokawa, M. (2016). "Metabolic regulation of apoptosis in cancer'', *International review of cell and molecular biology*, 327, 43-87.
- Mazurski, J., Martelli, S., & Borowski, E. (1998). "The geometry of intercalation complex of antitumor mitoxantrone and ametantrone with DNA: molecular dynamics simulations'', *Acta Biochimica Polonica*, 45(1), 1-11.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Tafuri, A. (2007). "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance'', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1263-1284.
- Merad-Boudia, M., Nicole, A., Santiard-Baron, D., Saillé, C., & Ceballos-Picot, I. (1998). "Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease'', *Biochemical pharmacology*, 56(5), 645-655.
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Nikolić, M., Tošić, S., & Stojičić, D. (2011). "Lichens as source of versatile bioactive compounds'', *Biologica Nyssana*, 2(1), 1-6.
- Mogi, M., Walsh, K., Iwai, M., & Horiuchi, M. (2008). "Akt-FOXO3a signaling affects human endothelial progenitor cell differentiation'', *Hypertension Research*, 31(1), 153-159.
- Mohammadi, M., Bagheri, L., Badreldin, A., Fatehi, P., Pakzad, L., Suntres, Z., & van Wijnen, A. J. (2022). "Biological effects of gyrophoric acid and other lichen derived metabolites, on cell proliferation, apoptosis and cell signaling pathways'', *Chemico-Biological Interactions*, 351, 109768.
- Mokhtari, R. B., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). "Combination therapy in combating cancer'', *Oncotarget*, 8(23), 38022.
- Molnár, K., & Farkas, E. (2010). "Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review'', *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(3-4), 157-173.
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). "ROS signalling in the biology of cancer'', *Seminars in cell & developmental biology*, 80, 50-64.

- Mondal, S., Bandyopadhyay, S., K Ghosh, M., Mukhopadhyay, S., Roy, S., & Mandal, C. (2012). "Natural products: promising resources for cancer drug discovery", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 12(1), 49-75.
- Montemurro, F., Nuzzolese, I., & Ponzzone, R. (2020). "Neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in early breast cancer?", *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(9), 1071-1082.
- Moon, D.-O., Kim, M.-O., Choi, Y. H., Hyun, J. W., Chang, W. Y., & Kim, G.-Y. (2010). "Butein induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation", *Cancer letters*, 288(2), 204-213.
- Nash, T. H. (1996). "Lichen biology", *Cambridge University Press*.
- Nguyen, T. T. H., Dinh, M. H., Chi, H. T., Wang, S.-L., Nguyen, Q., Tran, T. D., & Nguyen, A. D. (2019). "Antioxidant and cytotoxic activity of lichens collected from Bidoup Nui Ba National Park, Vietnam", *Research on Chemical Intermediates*, 45, 33-49.
- Nicholson, K. M., & Anderson, N. G. (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy", *Cellular signalling*, 14(5), 381-395.
- Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.-C., Xu, P.-Z., Chen, M.-L., Tonic, I., Hay, N. (2008). "Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis", *Cancer cell*, 14(6), 458-470.
- Nohara, K., Wang, F., & Spiegel, S. (1998). "Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines", *Breast cancer research and treatment*, 48, 149-157.
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Williams Jr, J. H. (1996). "Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease", *New England Journal of Medicine*, 334(18), 1150-1155.
- Onal, C., Guler, O. C., Torun, N., Reyhan, M., & Yapar, A. F. (2020). "The effect of androgen deprivation therapy on 68 Ga-PSMA tracer uptake in non-metastatic prostate cancer patients", *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 47, 632-641.
- Osmanağaoğlu, Ö., Yıldız, A., & Saçılık, S. (2000). "Türkiye'deki farklı bölgelerden izole edilen likenlerin antimikrobiyal aktiviteleri", *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30, 17-19.
- Ozgencli, I., Budak, H., Ciftci, M., & Anar, M. (2018). "Lichen acids may be used as a potential drug for cancer therapy; by inhibiting mitochondrial thioredoxin reductase purified from rat lung", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(11), 1599-1605.

- Park, S.-A., Na, H.-K., Kim, E.-H., Cha, Y.-N., & Surh, Y.-J. (2009). "4-Hydroxyestradiol induces anchorage-independent growth of human mammary epithelial cells via activation of I κ B kinase: Potential role of reactive oxygen species", *Cancer research*, 69(6), 2416-2424.
- Pastorino, J. G., Tafani, M., & Farber, J. L. (1999). "Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway", *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 19411-19416.
- Pelicano, H., Carney, D., & Huang, P. (2004). "ROS stress in cancer cells and therapeutic implications", *Drug resistance updates*, 7(2), 97-110.
- Peltier, J., O'Neill, A., & Schaffer, D. V. (2007). "PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation", *Developmental neurobiology*, 67(10), 1348-1361.
- Phinney, N. H., Gauslaa, Y., & Solhaug, K. A. (2019). "Why chartreuse? The pigment vulpinic acid screens blue light in the lichen *Letharia vulpina*", *Planta*, 249, 709-718.
- Pienta, K. J. (2001). "Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer", *Seminars in oncology*, 28(15), 3-7.
- Pritchard, C. C., Mateo, J., Walsh, M. F., De Sarkar, N., Abida, W., Beltran, H., Eeles, R. (2016). "Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer", *New England Journal of Medicine*, 375(5), 443-453.
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., & Gabai, V. L. (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death? ", *Experimental cell research*, 283(1), 1-16.
- Qi, X.-J., Wildey, G. M., & Howe, P. H. (2006). "Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function", *Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 813-823.
- Raphael, J., Desautels, D., Pritchard, K. I., Petkova, E., & Shah, P. S. (2018). "Phosphoinositide 3-kinase inhibitors in advanced breast cancer: A systematic review and meta-analysis", *European Journal of Cancer*, 91, 38-46.
- Rapoport, R., Hanukoglu, I., & Sklan, D. (1994). "A fluorometric assay for hydrogen peroxide, suitable for NAD (P) H-dependent superoxide generating redox systems", *Analytical biochemistry*, 218(2), 309-313.
- Rappaport, S. M. (2012). "Discovering environmental causes of disease", *Journal of Epidemiology and Community Health*, 66(2), 99-102.
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). "Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling", *Cellular signalling*, 24(5), 981-990.

- Reddy, K. B., & Glaros, S. (2007). "Inhibition of the MAP kinase activity suppresses estrogen-induced breast tumor growth both in vitro and in vivo", *International journal of oncology*, 30(4), 971-975.
- Rock, K. L., & Kono, H. (2008). "The inflammatory response to cell death", *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3, 99-126.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., & Restifo, N. P. (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines", *Nature medicine*, 10(9), 909-915.
- Rossi, S. (2006). "Australian medicines handbook", Sydney, Australia: *Australian Medicines Handbook*.
- Roy, K., Wu, Y., Meitzler, J. L., Juhasz, A., Liu, H., Jiang, G., Doroshow, J. H. (2015). "NADPH oxidases and cancer", *Clinical science*, 128(12), 863-875.
- Roy, M., Mukherjee, S., Sarkar, R., & Biswas, J. (2011). "Curcumin sensitizes chemotherapeutic drugs via modulation of PKC, telomerase, NF- κ B and HDAC in breast cancer", *Therapeutic delivery*, 2(10), 1275-1293.
- Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X., & Choi, A. M. (2007). "Mechanisms of cell death in oxidative stress", *Antioxidants & redox signaling*, 9(1), 49-89.
- Sabuncuoğlu, S., & Özgüneş, H. (2011). "Kemoterapi, serbest radikaller ve oksidatif stres", *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2, 137-150.
- Sahin, E., Dabagolu Psav, S., Avan, I., Candan, M., Sahinturk, V., & Koparal, A. T. (2019). "Vulpinic acid, a lichen metabolite, emerges as a potential drug candidate in the therapy of oxidative stress-related diseases, such as atherosclerosis", *Human & Experimental Toxicology*, 38(6), 675-684.
- Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T.-C., Hinks, J. A., Tonks, N. K., & Barford, D. (2003). "Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate", *Nature*, 423(6941), 769-773.
- Sawyer, D. T., & Valentine, J. S. (1981). "How super is superoxide? ", *Accounts of Chemical Research*, 14(12), 393-400.
- Scotting, P., & Howard, P. (2013). "The biology of cancer", *Cancer Nursing Practice*, 12(4).
- Sekar, S., & Kandavel, D. (2010). "Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytes with medicinal plants—new avenues for phytochemicals", *Journal of Phytochemical Research*, 2(7), 91-100.
- Sever, A. (2018). "Mcf-7 hücrelerinde oksidatif hasara karşı cisplatin ile kombinasyonda resveratrolün sinerjik etkisi ve oksidatif stres indeksi", Yüksek Lisans, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Anadolu University (Turkey), 1-49.
- Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). "Genetics of breast cancer: a topic in evolution", *Annals of Oncology*, 26(7), 1291-1299.

- Shrestha, G., & St. Clair, L. L. (2013). "Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs", *Phytochemistry reviews*, 12, 229-244.
- Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). "Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 20-31.
- Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Fedewa, S. (2012). "Cancer treatment and survivorship statistics, 2012", *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(4), 220-241.
- Sikora, T., Morawska, K., Lisowski, W., Rytel, P., & Dylong, A. (2022). "Application of Optical Methods for Determination of Concentration of Doxorubicin in Blood and Plasma", *Pharmaceuticals*, 15(2), 112.
- Silva, D., Quintas, C., Gonçalves, J., & Fresco, P. (2022). "Contribution of adrenergic mechanisms for the stress-induced breast cancer carcinogenesis", *Journal of Cellular Physiology*, 237(4), 2107-2127.
- Singh, D. B., Gupta, M. K., & Pathak, R. K. (2020). "Natural products in cancer chemoprevention and chemotherapy", *Frontiers in Natural Product Chemistry*, 6(6), 151-182.
- Solárová, Z., Liskova, A., Samec, M., Kubatka, P., Büsselberg, D., & Solár, P. (2020). "Anticancer potential of lichens' secondary metabolites", *Biomolecules*, 10(1), 87.
- Steelman, L. S., Abrams, S. L., Whelan, J., Bertrand, F. E., Ludwig, D., Bäsecke, J., Tafuri, A. (2008). "Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia", *Leukemia*, 22(4), 686-707.
- Storz, P. (2005). "Reactive oxygen species in tumor progression", *Frontiers in Bioscience*, 10(1-3), 1881-1896.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Supuran, C. T. (2016). "Drug interaction considerations in the therapeutic use of carbonic anhydrase inhibitors", *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 12(4), 423-431.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Loeffler, M. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor", *Nature*, 397(6718), 441-446.
- Taouji, S., Wolf, S., & Chevet, E. (2013). "Oligomerization in endoplasmic reticulum stress signaling", *Progress in molecular biology and translational science*, 117, 465-484.

- Tekin, Ç. (2021). “Mide Kanseri Hücrelerinde Olea Europaea Yaprak Özütünün Tedavi Edici Potansiyelinin Araştırılması”, Yüksek Lisans, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Bursa Uludag University (Turkey), 1-203.
- Temel, M. K. (2015). “Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi”, *Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi*, 30(1).
- Teoh-Fitzgerald, M., Fitzgerald, M., Zhong, W., Askeland, R., & Domann, F. (2014). “Epigenetic reprogramming governs EcSOD expression during human mammary epithelial cell differentiation, tumorigenesis and metastasis”, *Oncogene*, 33(3), 358-368.
- Terada, M., Hara, H., Daiko, H., Mizusawa, J., Kadota, T., Hori, K., Sakamoto, T. (2019). “Phase III study of tri-modality combination therapy with induction docetaxel plus cisplatin and 5-fluorouracil versus definitive chemoradiotherapy for locally advanced unresectable squamous-cell carcinoma of the thoracic esophagus (JCOG1510: TRIANgLE) ”, *Japanese journal of clinical oncology*, 49(11), 1055-1060.
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). “Reactive oxygen species in cell signaling”, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028.
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). “Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects”, *Pharmacogenetics and genomics*, 21(7), 440.
- Trachootham, D., Zhou, Y., Zhang, H., Demizu, Y., Chen, Z., Pelicano, H., Liu, J. (2006). “Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by β -phenylethyl isothiocyanate”, *Cancer cell*, 10(3), 241-252.
- Tsang, J. Y., & Gary, M. T. (2020). “Molecular classification of breast cancer”, *Advances in anatomic pathology*, 27(1), 27-35.
- Ueda, J.-i., Saito, N., Shimazu, Y., & Ozawa, T. (1996). “A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 333(2), 377-384.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., & Bilanges, B. (2010). “The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling”, *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(5), 329-341.
- Vargas, J. E., Puga, R., Lenz, G., Trindade, C., & Filippi-Chiela, E. (2020). “Cellular mechanisms triggered by the cotreatment of resveratrol and doxorubicin in breast cancer: a translational in vitro–in silico model”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Vineis, P., & Wild, C. P. (2014). “Global cancer patterns: causes and prevention”, *The Lancet*, 383(9916), 549-557.

- Vranic, S., Gatalica, Z., & Wang, Z.-Y. (2011). "Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies", *Oncology letters*, 2(6), 1131-1137.
- VulpinicAcid. (2023). Retrieved from <https://www.caymanchem.com/>, Son erişim tarihi: 13.07.2023.
- Wang, Y., Qi, H., Liu, Y., Duan, C., Liu, X., Xia, T., Liu, H.-X. (2021). "The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy", *Theranostics*, 11(10), 4839.
- WHO. (2021). "World Health Organization", Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, Son erişim tarihi: 22.12.2021.
- WHO. (2023). "World Health Organization Cancer Incidence", Retrieved from <https://www.who.int/>, Son erişim tarihi: 23.03.2023.
- Wu, H., Goel, V., & Haluska, F. G. (2003). "PTEN signaling pathways in melanoma", *Oncogene*, 22(20), 3113-3122.
- Wu, Y., Gan, D., Leng, X., He, W., Zhang, X., Li, C., Han, Y. (2022). "Anti-ageing and Anti-lung Carcinoma Effects of Vulpinic Acid and Usnic Acid Compounds and Biological Investigations with Molecular Modeling Study", *Journal of Oleo Science*, 71(2), 247-255.
- Yamaguchi, H., Wyckoff, J., & Condeelis, J. (2005). "Cell migration in tumors", *Current opinion in cell biology*, 17(5), 559-564.
- Yan, G., Elbadawi, M., & Efferth, T. (2020). "Multiple cell death modalities and their key features", *World Academy of Sciences Journal*, 2(2), 39-48.
- Yangın, S., Cansaran-Duman, D., Eskiler, G. G., & Aras, S. (2022). "The molecular mechanisms of vulpinic acid induced programmed cell death in melanoma", *Molecular biology reports*, 49(9), 8273-8280.
- Yu, Y., Zhou, Q., Hang, Y., Bu, X., & Jia, W. (2007). "Antiestrogenic effect of 20S-protopanaxadiol and its synergy with tamoxifen on breast cancer cells", *Cancer*, 109(11), 2374-2382.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). "The traditional medicine and modern medicine from natural products", *Molecules*, 21(5), 559.
- Zeman, E. M. (2016). "The biological basis of radiation oncology", *Clinical Radiation Oncology*, 4th ed. Philadelphia, PA, 2-40.
- Zhan, Y., Chen, Y., Liu, R., Zhang, H., & Zhang, Y. (2014). "Potentiation of paclitaxel activity by curcumin in human breast cancer cell by modulating apoptosis and inhibiting EGFR signaling", *Archives of pharmacal research*, 37, 1086-1095.
- Zyad, A., Leouifoudi, I., Tilaoui, M., Mouse, H. A., Khouchani, M., & Jaafari, A. (2018). "Natural products as cytotoxic agents in chemotherapy against cancer", *Cytotoxicity*, 10.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esmâ Kübra KAĞAN YENİÇERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Yıl
Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2014
Y. Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2016
Doktora	: Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Erzincan	2023

YAYINLAR

1. **Yeniçeri, E.**, Altay, A., (2023). The Combined Effect of Vulpinic Acid and Doxorubicin in Breast Cancer MCF-7 Cells, Erzincan University Journal of Science and Technology 2023.
2. **Yeniçeri, E.**, Altay, A., Koksall, E., Altın, S., Taslimi, P., Yılmaz, M. A., ... & Kandemir, A. (2024). Phytochemical profile by LC-MS/MS analysis and evaluation of antioxidant, antidiabetic, anti-Alzheimer, and anticancer activity of Onobrychis argyrea leaf extracts. European Journal of Integrative Medicine, 102337.
3. Demirci, S., Alp, C., Akşit, H., Ulutaş, Y., Altay, A., **Yeniçeri, E.**, ... & Yaylı, N. (2023). Isolation, characterization and anticancer activity of secondary metabolites from Verbascum speciosum. Chemical Biology & Drug Design.
4. Altay, A., **Yeniçeri, E.**, Taslimi, P., Taskin-Tok, T., Yılmaz, M. A., & Koksall, E. (2022). A Biochemical Approach for Hedysarum candidissimum from Turkey: Screening Phytochemicals, Evaluation of Biological Activities, and Molecular Docking Study. Chemistry & Biodiversity, 19(9), e202200348.
5. Dadou, S., Altay, A., Koudad, M., Türkmenoğlu, B., **Yeniçeri, E.**, Çağlar, S., ... & Karrouchi, K. (2022). Design, synthesis, anticancer evaluation and molecular docking studies of new imidazo [2, 1-b] thiazole-based chalcones. Medicinal Chemistry Research, 31(8), 1369-1383.
6. ÇAĞLAR, S., ALTAY, A., ÇAĞLAR, B., **YENİÇERİ, E. K. K.**, & HARURLUOĞLU, B. (2022). In Vitro Cytotoxic Evaluation of a Silver (I) Complex Including Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Niflumic Acid and 3-Picoline on Human-Derived Cancer Cell Lines. Erzincan University Journal of Science and Technology, 15(3), 736-748.

-
7. Altay, A., **Yeniceri, E.**, Taslimi, P., Taskin-Tok, T., Yilmaz, M. A., & Koksall, E. (2022). LC-MS/MS analysis and diverse biological activities of *Hypericum scabrum* L.: In vitro and in silico research. *South African Journal of Botany*, 150, 940-955.
 8. Altay, A., **Yeniceri, E. K. K.**, Taslimi, P., Taskin-Tok, T., Yilmaz, M. A., & Köksall, E. (2022). Phytochemical Analysis and Biological Evaluation of *Hypericum linarioides* Bosse: in Vitro and in Silico Studies. *ChemistrySelect*, 7(23), e202200039.
 9. Caglar, S., Altay, A., Harurluoglu, B., **Yeniceri, E. K.**, Caglar, B., & Şahin, O. (2022). Synthesis, structural characterization and evaluation of anticancer activity of polymeric silver (I) complexes based on niflumic acid/naproxen and picoline derivatives. *Journal of Coordination Chemistry*, 75(1-2), 178-196.
 10. Harurluoglu, B., Altay, A., Caglar, S., **Yeniceri, E. K. K.**, Caglar, B., & Şahin, Z. S. (2021). Binuclear silver (I) complexes with the non-steroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid: Synthesis, characterization, cytotoxic activity and evaluation of cellular mechanism of action. *Polyhedron*, 202, 115189.
 11. ALTIN, S., AKYÜZ, S., **YENİÇERİ, E. K. K.**, KÖKSALL, E., ALTAY, A., & Cemalettin, A. L. P. (2021). Investigation of Antimicrobial Activity of *Lallemantia canescens* (L) Fisch & Mey. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 14(2), 849-856.
 12. Caglar, S., Altay, A., Harurluoglu, B., **Yeniceri, E. K. K.**, Caglar, B., & Şahin, O. Polymeric Silver (I) Complexes Based on Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (Niflumic Acid and Naproxen) and Picoline Derivatives: Synthesis, X-Ray Structure, Spectroscopic, Thermal Studies and Anticancer Activity Through Apoptosis. X-Ray Structure, Spectroscopic, Thermal Studies and Anticancer Activity Through Apoptosis.
-