

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SÜLFORAFANIN 769-P İNSAN BÖBREK KANSER HÜCRE DİZİSİNDE
APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ VE HÜCRE MİGRASYONUNUN İNHİBİSYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Güzin GÖKAY

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aydan DAĞ

OCAK 2019

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SÜLFORAFANIN 769-P İNSAN BÖBREK KANSER HÜCRE DİZİSİNDE
APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ VE HÜCRE MİGRASYONUNUN İNHİBİSYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Güzin GÖKAY
(160305002)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aydan DAĞ

OCAK 2019

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 160305002 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Güzin GÖKAY, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “SÜLFORAFANIN 769-P İNSAN BÖBREK KANSER HÜCRE DİZİSİNDE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ VE HÜCRE MİGRASYONUNUN İNHİBİSYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Aydan DAĞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Binnur AYDOĞAN TEMEL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Muhammet Übeydullah KAHVECİ
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **21 Şubat 2019**
Savunma Tarihi : **21 Ocak 2019**



Sevgili Beyza ve Sezen'e,

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sürecinde benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Aydan Dağ'a,

Bu zorlu sürece başladığım günden itibaren bütün aşamalarında desteğini her zaman hissettiğim, bana her konuda yardımcı olan, yeni şeyler öğrenmeme imkan sağlayan ve deneyimleriyle hep yanımda olan, tezimi bitirebilmemi sağlayan, değerli Dr. Beyza Göncü'ye,

Çalışmam süresince uzun uğraşlarla ve her aşamasında destek veren, yardım ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen değerli Arş. Gör. Sezen Atasoy'a,

Tezimin ilerlemesi için her zaman moral veren, imkan ve desteklerini esirgemeyen Dr. Emrah Yücesan'a,

Ne zaman yardıma ihtiyacım olsa yanımda olan sevgili Sevde Hasanoğlu ve Arş. Gör. Dilek Öztürk'e,

Tez çalışmam için her zaman insiyatif gösteren Doç. Dr. Zühal Gücin, Doç Dr. Nur Büyükpınarbaşılı ve Uzm. Dr. Melin Özgün Geçer'e,

Tez yazım süreci boyunca manevi olarak destekleyen iş arkadaşlarım Seval Turna, Çağla Mutlu'ya,

Hayatım boyunca beni maddi ve manevi her konuda koşul gözetmeksizin destekleyen, sevgilerini, ilgilerini hep hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 6.2017/47 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ocak 2019

Güzin GÖKAY
(Moleküler Biyolog)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Güzin GÖKAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	iv
BEYAN	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kanser	4
2.1.1 Kanser gelişiminde rol oynayan hücresel mekanizmalar	6
2.1.1.1 Hücre döngüsü	6
2.1.1.2 Programlanmış hücre ölümü (Apoptoz).....	8
2.2 Böbrek Kanseri.....	9
2.2.1 Böbrek kanseri etiyolojisi	11
2.2.2 Böbrek kanseri evrelendirmesi ve sınıflandırması.....	12
2.2.2.1 Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom.....	14
2.3 Diyet ve Kanser Kemoprevensiyonu	15
2.3.1 Fitokimyasallar.....	16
2.3.2 Sülföröfan	17
2.3.2.1 Sülföröfanın kemoprevensiyon mekanizmaları	18
2.3.2.2 Sülföröfan ve hücre döngüsü.....	20
2.3.2.3 Sülföröfan ve apoptoz	21
2.4 Hücre Canlılığın Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1 Malzemeler.....	25
3.2 Cihazlar	25
3.3 Çalışma Materyali	26
3.4 Hücre Kültürü.....	26
3.4.1 Besiyerlerinin hazırlanması.....	26
3.4.2 Hücrelerin kültüre edilmesi.....	26
3.5 Sülföröfan Dilüsyonlarının Hazırlanması	27
3.6 MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığın Belirlenmesi	27
3.7 LDH Yöntemi ile Hücre Sitotoksitesinin Belirlenmesi.....	28

3.8 Anneksin V Yöntemi ile Apoptoz Tayini	30
3.9 Hücre Döngüsü Analizi.....	30
3.10 Hücre Migrasyon Analizi	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
4.1 MTT Canlılık Deneyi Sonuçları.....	32
4.2 LDH Sitotoksosite Deneyi Sonuçları.....	36
4.3 Annexin V Deneyi Sonuçları	39
4.4 Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları.....	44
4.5 Migrasyon Analiz Sonuçları	50
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ.....	63



KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
BHK	: Böbrek Hücreli Karsinom
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDKI	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
CYP	: Sitokrom P450
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dk	: Dakika
g	: Gram
HIF	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör
ITC	: İzotiyosiyanat
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MTT	: Metiltiazol Difenil Tetrazolyum
mL	: Mililitre
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
RNA	: Ribonükleik Asit
SFN	: Sülforafan
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
UV	: Ultraviyole
VHL	: Von Hippel-Lindau
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1	: Böbrek hücreli karsinomun TNM (2017) evrelendirme sistemi.....	13
Tablo 4.1	: 769-P hücre hattı MTT % canlılık değerleri.....	33
Tablo 4.2	: 769-P hücre hattı IC ₅₀ değerleri.....	33
Tablo 4.3	: 293T hücre hattı MTT % canlılık değerleri.....	34
Tablo 4.4	: 293T hücre hattı IC ₅₀ değerleri.....	35
Tablo 4.5	: 769-P hücre hattı LDH % sitotoksisite değerleri.....	37
Tablo 4.6	: 293T hücre hattı LDH % sitotoksisite değerleri.....	38
Tablo 4.7	: 769-P hücre hattı erken ve geç apoptotik hücre % değerleri.....	40
Tablo 4.8	: 293T hücre hattı erken ve geç apoptotik hücre % değerleri.....	42
Tablo 4.9	: 769-P hücre hattı hücre döngüsü (%) değerleri.....	46
Tablo 4.10	: 293T hücre hattı hücre döngüsü (%) değerleri.....	49

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: Hücre döngüsü kontrol noktaları.....	7
Şekil 2.2	: Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom.....	14
Şekil 2.3	: Glukosinolat ve ürünleri (a) Glukosinolatın mirosinaz enzimi tarafından hidrolizi ve reaksiyon sonucu oluşan ürünler (b) Glukorafanın hidrolizi sonucu Sülforafan oluşumu.	17
Şekil 2.4	: Sülforafanın (SFN) karsinogenez sürecinin farklı aşamalarına etki ederek kemopreventif ve kemoterapötik ajan olarak etkisi.....	19
Şekil 4.1	: 769-P hücre hattı canlılık sonuçları (24. , 48. ve 72. saat).	32
Şekil 4.2	: 769-P hücre hattı 24. , 48. ve 72. saat IC ₅₀ grafiği.....	33
Şekil 4.3	: 293T hücre hattı canlılık sonuçları (24. ,48. ve 72. saat).....	34
Şekil 4.4	: 293T hücre hattı 24. ,48. ve 72. saat IC ₅₀ grafiği.	35
Şekil 4.5	: 769-P hücre hattı LDH sitotoksisite sonuçları.	37
Şekil 4.6	: 293T hücre hattı LDH sitotoksisite sonuçları	38
Şekil 4.7	: 769-P hücre hattı Annexin V sonuçları.....	39
Şekil 4.8	: 769-P hücre hattı Annexin V yöntemi sonucunda canlı ve erken/geç apoptotik hücre % değerleri.....	41
Şekil 4.9	: 293T hücre hattı Annexin V sonuçları	41
Şekil 4.10	: 293T hücre hattı Annexin V yöntemi sonucunda canlı ve erken/geç apoptotik hücre % değerleri.....	43
Şekil 4.11	: 769-P hücre hattı hücre döngüsü sonuçları.	44
Şekil 4.12	: 769-P hücre hattı % G0/G1, S ve G2/M evreleri % hücre sonuçları.	46
Şekil 4.13	: 293T hücre hattı hücre döngüsü sonuçları	47
Şekil 4.14	: 293T hücre hattı % G0/G1, S ve G2/M evreleri % hücre sonuçları.....	49
Şekil 4.15	: Farklı zaman aralıklarında hücre göçü analizinin mikroskopik görüntüleri	51

SÜLFORAFANIN 769-P İNSAN BÖBREK KANSER HÜCRE DİZİSİNDE APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ VE HÜCRE MİGRASYONUNUN İNHİBİSYONU

ÖZET

Kanser görülme sıklığı dünyada giderek artmaktadır. Sağlıklı hücrelerde meydana gelen fenotipik ve genotipik değişiklikler sonucunda kanser meydana gelmektedir. Kontrolsüz hücre proliferasyonu sebebiyle hücreler anormal şekilde çoğalarak invazyon ve metastaz özelliği kazanırlar. Böbrekler metabolizma tarafından üretilen artık maddelerin vücuttan uzaklaştırılmasında ve homeostazın sağlanmasında önemli fonksiyonlara sahiptir. Böbrek kanseri; ürogenital kanserler içerisinde yer almakta ve insidansı gittikçe artmaktadır.

Son yıllarda bitkisel kaynaklı besinlere olan ilgi artmaktadır ve geleneksel tedavileri desteklemek amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir. Tarih boyunca da tedavilerde bitkisel gıdalar kullanılmış olup biyoaktif bileşenlerin aynı zamanda kanserin önlenmesinde farmakolojik ve fizyolojik etkilerinin olduğu savunulmaktadır. Diyetle alınan besinlerdeki kemopreventif bileşikler; hücre içi sinyal iletim yollarını düzenleme veya kanser oluşum sürecini uzatarak çeşitli koruyucu etkiler meydana getirmektedir.

Brokoli, karnabahar, beyaz ve karalahana, Brüksel lahanası gibi Brassicaceae olarak da bilinen turpgiller ailesindeki sebzeler 'glukosinolat ' adı verilen bileşik içerirler. Glukosinolatlar, mirosinaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyona girerler. Parçalanma ürünü ise izotiyosiyanatın karakteristik bir bileşiği sülforafan (SFN)'dir. SFN kemopreventif etkileri sayesinde son yıllarda büyük ilgi görmektedir.

Çok sayıda epidemiyolojik araştırmalar ile *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, SFN'nin kanseri önleyici ya da riskini azaltıcı potansiyeli olduğunu belirlemiştir. SFN'nin çeşitli hücre hatları üzerindeki proapoptotik etkileri tanımlanmıştır fakat literatürde böbrek kanserinde apoptoz üzerine olan etkisi için yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada SFN'nin 769-P insan böbrek kanser hücre hattı üzerindeki etkisi araştırılmış ve kontrol grubu olarak 293-T insan böbrek epitel hücre hattı kullanılmıştır. Bu amaçla çeşitli SFN konsantrasyonları hazırlanmış ve hücre hatları üzerinde etkileri incelenmiştir. Hücre proliferasyonu üzerine etkisinin gözlenmesi için MTT [3-(4, 5-dimetil tiyazol-2-il)-2, 5 difenil tetrazolyum bromid] testi (24, 48, 72. saat) ve sitotoksik etkinin belirlenebilmesi için LDH (Laktat dehidrojenez) testi uygulanmıştır. Analizler sonucu seçilen konsantrasyonlarda hücre döngüsü inhibisyonları saptanmıştır. SFN'nin hücrelerde meydana getirdiği apoptotik etkinin belirlenebilmesi için erken ve geç apoptotik hücreler Anneksin V yöntemi ile analiz edilmiştir. 769-P insan böbrek kanser hücre hattında ise doza bağımlı şekilde hücre migrasyonunun inhibisyonu incelenmiştir.

EFFECT OF SULFORAPHANE ON APOPTOSIS IN 769-P HUMAN KIDNEY CANCER CELL LINE AND INHIBITION OF CELL MIGRATION

SUMMARY

The frequency of cancer falls in the World and it occurs in phenotypic and genotypic conditions that occur in healthy cells. Because of uncontrolled cell proliferation, cells gain abnormalities and gain invasion and metastasis. Kidneys have factors related to metabolism and homeostasis is sufficient. Kidney cancer; urogenital cancers are involved and the incidence is increasing.

In recent years, interest in plant-derived foods has increased and is often preferred to support traditional treatments. Throughout history, plant foods have been used in the treatment and bioactive components are also claimed to have pharmacological and physiological effects in the prevention of cancer. Chemopreventive compounds in dietary foods; by modulating the intracellular signal transduction pathways or prolonging the cancer formation process.

Broccoli, cauliflower, white and black cabbage, Brussels sprouts such as Brassicaceae vegetables contain in the compound called glucosinolate. Glucosinolates react by catalyzing the enzyme myrosinase. The disintegration product is a characteristic compound of isothiocyanate, sulforaphane (SFN). Due to its chemopreventive effects, SFN has received great interest in recent years.

In vivo and *in vitro* studies with numerous epidemiological investigations have identified the potential of SFN to prevent or reduce cancer. The proapoptotic effects of SFN on various cell lines have been described, but there is insufficient study in the literature on the effect of apoptosis on kidney cancer. In this study, the effect of SFN on 769-P human kidney cancer cell line was investigated and 293-T human renal epithelial cell line was used as control group. Various SFN concentrations were prepared for this purpose and the effects on cell lines were examined. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] test (24, 48, and 72 hours) and LDH (Lactate dehydrogenase) for the detection of cytotoxic effect on cell proliferation test was applied. Cell cycle inhibitions were determined at the selected concentrations. In order to determine the apoptotic effect of SFN in cells, early and late apoptotic cells were analyzed by Annexin V method. In the 769-P human kidney cancer cell line, inhibition of cell migration in a dose-dependent manner was investigated.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser günümüzde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya genelinde nüfusun hızla artması ve yaş ortalamasının yükselmesi ile birlikte birçok ülkede en önemli ölüm nedeni ve halk sağlığı sorunu olarak öne çıkmaktadır. Kanser; genlerdeki mutasyonlar ve patolojik hücre içi sinyal iletimi sonucu farklı organlarda kontrolsüz çoğalan hücrelerin oluşmasıyla karakterize bir hastalıktır [1].

Böbrek içinde kötü huylu hücrelerin çoğalarak kitle oluşturmasıyla ortaya çıkan böbrek kanserinde insidans ve mortalite oranları sosyoekonomik özellikleri farklı olan birçok ülkede gittikçe arttığı bildirilmiştir [2]. 2018 Dünya Kanser İstatistiklerine göre 403.262 (%2.2) kişi böbrek kanserine yakalanmış ve 175.098 (%1.8) kişi böbrek kanseri sebebiyle hayatını kaybetmiştir [1]. Böbrek kanseri kontrolsüz çoğalma, lokal dokulara invazyon ve metastaz aşamalarıyla birlikte, çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikleri içeren çok basamaklı bir süreçtir.

Kanser kemoprevensiyonu, hastalığın klinik olarak oluşmasından önce diyet veya farmakolojik ajanların kullanılması ve bu sayede tümör gelişimini engellemek, bloke etmek ve tersine çevrilmesi olarak ifade edilmektedir [3]. Epidemiyolojik ve patolojik çalışmalardan elde edilen bulgular kanserlerin önlenebileceğini veya ilerlemesinin durdurulabileceğini göstermektedir [3]. Tarih boyunca kanser tedavisinde diyetle alınan bitkisel gıdalar kullanılmış, aynı zamanda kanserin önlenmesinde de faydalı olabileceği düşünülmüştür. Bitkilerde bulunan biyolojik olarak aktif fitokimyasal bileşenlerin varlığı, botanik tedavilerin farmakolojik ve fizyolojik etkilerini desteklemektedir. Çok sayıda epidemiyolojik araştırmalar ile *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, aktif fitokimyasalların kanseri önleyici ya da riskini azaltıcı potansiyeli olduğunu belirlemiştir [4]. Özellikle diyetle alınan sebze ve meyveler, düşük toksisiteye sahip oldukları için oldukça ilgi görmekle birlikte kemopreventif bileşiklerin zengin kaynakları olarak kabul edilmiştir [5].

Brokoli, karnabahar, beyaz ve karalahana, Brüksel lahanası gibi Brassicaceae olarak da bilinen turpgiller grubundaki sebzelerin tüketimi, genel sebze tüketimi ile kıyaslandığında kansere karşı çok daha güçlü bir koruyuculuk sağlamaktadır.

Turpgiller grubunda kanser kemoprevensiyonu ile ilgili olarak en çok çalışılan biyoaktif bileşenlerden biri glukosinolatlardır. Glukosinolatlar kimyasal olarak tanımlanmış olup, enzimatik olarak hidrolize olmadığı sürece aktif olmayan bileşiklerdir [6]. Bu gruptaki glukosinolatların hidroliz ürünleri bitki türüne göre çeşitlilik göstermektedir ve hidroliz sonucu oluşan izotiyosiyanatlardan en karakterize olanlardan biri Sülforafan (SFN)'dir [7]. *In vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalar ile SFN'nin tümör gelişimine karşı olarak hücre döngüsünü inhibe etmesi veya apoptozu (programlanmış hücre ölümü) uyarması gösterilmiştir. Kolon, prostat ve meme gibi birçok kanser hücresinde hücre döngüsünün inhibisyonu ve apoptozun indüksiyonu saptanmıştır [8]. Apoptozun moleküler mekanizması oldukça kompleks olup farklı şekillerde başlayabilmektedir. Apoptozun başlama süreci, ölüm reseptörleriyle (ekstrinsik) olabildiği gibi, mitokondriyal (intrinsik) yolak ile de başlayabilmektedir. Ayrıca bu iki başlatıcı yolak dışında T hücre aracılı, perforin granzim bağımlı bir apoptotik yolak daha vardır. Kaspaz ailesi adı verilen proteaz enzimlerin aktivasyonları ile sonlanmaktadır [9]. Apoptoz kontrolsüz hücre bölünmesinde kritik bir rol oynar. Kanser hücrelerinin yaygın özelliklerden biri hücre ölüm sinyal yollarını bloke ederek apoptozdan kaçabilmeleridir. Sinyal yollarının açıklığa kavuşturulmasıyla kanser hücrelerini seçici olarak öldüren veya öldürülmesini sağlayan terapötik ajanların geliştirilmesi için aşamalar kaydedilmiştir [10]. *In vivo* premalign ve malign tümör hücreleriyle yapılan çalışmalar çeşitli kemopreventif ajanların Bcl-2 gen ailesi üyelerinin ekspresyonunu veya mitokondri gerçirgenlik potansiyelini etkileyerek apoptozu indüklediğini göstermiştir [11]. SFN, apoptotik yolda birden çok molekülü etkilemektedir. Anti-apoptotik, pro-apoptotik gen regülasyonlarını ve kaspaz protein ailesi üyelerinin aktivasyonunu değiştirmektedir [12].

İlk olarak SFN ve apoptoz ilişkisi HT29 ve Caco-2 kolon kanser hücrelerinde belirlenmiştir [13]. Daha sonra prostat LNCaP hücrelerinde kaspaz aktivasyonu tanımlanmıştır [14]. İnsan medulloblastom hücreleri, PC-3, DU-145, fare embriyonik fibroblastlar ve insan glioblastoma hücrelerinde kaspaz aktivasyonu ile apoptozu indüklediği saptanmıştır [8, 15-18]. Ancak özellikle böbrek kanseri için literatürde *in vivo* ve *in vitro* SFN indüklü apoptozun etkin terapötik düzeyi hakkında yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada SFN aracılı apoptozun 769-P ve kontrol olarak 293T böbrek epitel hücre hattındaki sitotoksik ve apoptotik etkisini

karşılaştırarak araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla SFN'nin sitotoksik etkilerini göstermek için metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) ve laktat dehidrojenaz (LDH) testleri, apoptotik özelliklerini göstermek için Annexin V ve hücre döngüsü testi ve migrasyon özelliklerini göstermek için ise migrasyon testi yapılmıştır. Çalışmada kullanılan 769-P hücre hattı, böbrek kanseri içerisinde en sık görülen tip olan berrak hücreli adenokarsinom kökenlidir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser günümüzde sıklığının azalmaması ve bazı tiplerinde belirgin artış gözlenmesi nedeniyle önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya genelinde nüfusun hızla artması ve yaş ortalamasının yükselmesi ile birlikte birçok ülkede en önemli ölüm nedeni ve halk sağlığı sorunu olarak öne çıkmaktadır [19]. Kanseri; genlerdeki mutasyonlar ve patolojik hücre içi sinyal iletimi sonucu farklı organlarda kontrolsüz çoğalan hücrelerin oluşmasıyla karakterize bir hastalıktır. Kanseri oluşumu; tek bir hücredeki mutasyon ya da mutasyon dışı kalıtsal sebeplerle başlayarak, hücre soyu ilerledikçe yeni mutasyonlarla invaziv ve metastatik özellik kazanan klonal bir süreçtir [20].

Genel olarak kanseri gelişimini tanımlayan karsinogenez, çevresel faktörler ve genetik değişikliklerle beraber hücrenin kontrolsüz bölünme ve çoğalmasına yol açan karmaşık bir süreçtir. Bu sürecin 3 farklı adımda geliştiği düşünülmektedir; kontrolsüz çoğalma, lokal dokulara invazyon ve metastaz. Kontrolsüz çoğalma aşaması; normal hücrelerin karsinojene maruziyeti ile genomik DNA'sında meydana gelen hasarlar sonucunda hücrelerin dış uyarılardan bağımsız olarak bölünebildikleri ve geri dönüşümü olmayan bir olaydır. İnvazyon aşamasında aktif olarak çoğalan hücrelerin hızla bölünmeye ve yayılmaya başladığı nispeten uzun ve tersine çevrilebilir bir işlemdir. Metastaz aşaması ise neoplastik transformasyonun son aşaması olup, biriken mutasyonlar sonucu farklı özellikler kazanan tümör hücrelerinin kan dolaşımına geçerek uzak dokulara yayıldığı durumdur [21, 22].

Normal hücrelerin kanseri hücresine dönüşümü DNA molekülündeki bir ya da daha fazla sayıda mutasyon sonucu ortaya çıkar, mutasyon sonucunda etkilenen hücresel mekanizmalar; büyüme ve çoğalmayı etkileyen protoonkogenlerin aktivasyonu, bölünmeyi denetleyen tümör süpresör (baskılayıcı) genlerin inhibisyonu, DNA tamir mekanizmalarının etkisiz hale gelmesi ve apoptozun gerçekleşmemesidir [23].

Tümör süpresör genler ilk kez nadir görülen çocukluk tümörü olan retinoblastomun incelenmesiyle keşfedilmiştir. Tümör süpresör genler hücre proliferasyonunu ve sağ kalımını baskılar. Bu genlerin inaktivasyonu tümör gelişimine sebep olmaktadır. Kanser olgularında en sık rastlanan genetik değişikliklerden biri p53 tümör baskılayıcı genindeki mutasyonlardır [24]. Lösemi, lenfoma, meme, akciğer karsinomları gibi çeşitli kanserlerde sıklıkla işlev kaybı görülmüştür. Normal koşullarda p53 proteini hücre döngüsü regülasyonunda negatif yönde etkileyen düzenleyici bir protein olarak işlev görür, DNA'da meydana gelen bir hasar olduğunda p53 sentezi indüklenir. p53, DNA replikasyonunu ve hücre döngüsünü durdurur (arrest fazı) ve tamir mekanizmaları ile onarılamayan DNA hasarı apoptozu başlatır.

p53 mutasyonu veya gen kaybı; hücre döngüsü arrestini ortadan kaldırarak mutasyon sıklığının artmasına, DNA hasarına rağmen apoptozun gerçekleşmemesine ve hücre genomundaki kararsızlığa neden olur. Akciğer, prostat kanseri ve melanom gibi görülme sıklığı fazla olan kanserlerde tümör süpresör gen ürünlerinden olan Rb, PTEN, WT1 gibi proteinler çeşitli sinyal yollarında görevlidirler. Bu proteinler hücre döngüsünün düzenlenmesinde, transkripsiyon regülasyonunda, apoptozun düzenlenmesi gibi birçok hücre fonksiyonu sağlamaktadır [25].

Hücre proliferasyonunu doğrudan baskılayan genler bekçi (gatekeeper) tipi genler olarak adlandırılmaktadır. Bu tümör süpresör genlerin her iki kopyasının hasar görmesi durumunda genler işlevlerini kaybederek, artan hücre büyümesi ve döngünün kontrolünün gerçekleşmemesi sonucunda tümör oluşumu meydana gelmektedir. Hücre döngüsünü dolaylı olarak etkileyen diğer genler ise genom bütünlüğü, DNA tamir mekanizmasıyla ilgili ve mutasyon oluşumunun engellenmesinde görevli olan, bakıcı (caretaker) tipi tümör süpresör genlerdir. Kanserde yanlış eşleşmeden kaynaklı tamir mekanizmaları haricinde, genomik instabilitenin (kararsızlık) de yeri büyüktür. Kromozomal translokasyonlar, kromozom segmentlerinin delesyonu, duplikasyonu, anöploid ve diğer kromozomal anomaliliklerinin artması ve azalması genomik instabilite içerisinde yer almaktadır. Meydana gelen bu değişiklikler birçok kanser türünün gelişmesi ve ilerlemesine sebep olmaktadır. Bu kromozomal kararsızlıklar birçok yolla kanserin ilerlemesine katkıda bulunur [26].

Protoonkogenler genellikle hücrelerin normal şekilde büyümesinin ve temel hücre işlevlerinin düzenlenmesinde doğrudan rol oynarlar. Bilinen onkogenlerin birçoğu hücre büyüme kontrol yollarına katılan normal hücre genlerinden yani

protoonkogenlerden türetilir. Onkogenler, protoonkogenlerin mutasyona uğramış formlarıdır. Örneğin; Ras geni bir hücre içi sinyal proteinini kodlayan bir protoonkogendir. Ras geninde meydana gelen bir mutasyon sonucu oluşan mutant ras geni ve ürünü olan onkoprotein kontrolsüz büyüme sinyallerine destek olmaktadır [27].

Onkogenler genellikle baskın karaktere sahiptir ve gerçekleşen mutasyon sonucu var olan iki kopyadan bir tanesi etkilendiğinde etkisi fenotipik olarak ortaya çıkmaktadır. Bir protoonkogenin bir onkogene dönüşmesi veya aktivasyonu, genellikle fonksiyonel bir mutasyonla gerçekleşir. Nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları, inversiyon ve translokasyon gibi genetik düzenlemeler onkogen dönüşümünü sağlamaktadır [27, 28].

2.1.1 Kanser gelişiminde rol oynayan hücresel mekanizmalar

Kanser gelişimi; genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile oluşan, birçok değişkene bağlı bir durumdur. Çevresel faktörler ve yaşam tarzı; sigara tüketiminden, beslenme alışkanlığı, kilo etkisi, virüsler, bakteriler, parazitler, kimyasallar ve fiziksel etkenlere (UV, radyasyon) kadar birçok etkiyi kapsamaktadır. Genetik faktörler ise kalıtsal ailevi riskleri ve hastalığa yatkınlık oluşturan genlerdeki yeniden düzenlenmeleri içermektedir. Bu faktörlerin oluşturduğu etkiler sonucunda genetik materyalde hasar meydana gelmektedir. Hasarın meydana gelmesiyle hücre döngüsü, büyümesi, farklılaşması ve apoptoz mekanizmaları etkilenmektedir [29].

2.1.1.1 Hücre döngüsü

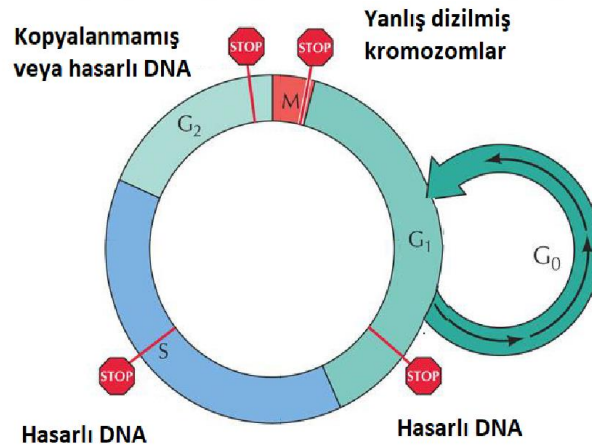
Ana hücreden bölünerek oluşacak yavru hücrelerin eksiksiz genoma sahip olmasını sağlamak için hücre büyümesi ve DNA replikasyonu denetlenmelidir. Hücre bölünme mekanizması hücrelerin çoğalmasını denetleyen faktörler tarafından organizmanın gereksinimleri doğrultusunda hücre bölünmesine imkan vererek düzenlenir.

Hücre bölünme döngüsü birbiriyle bağlantılı olarak; interfazdaki G1, S, G2 evreleri ve mitoz (M) evresinden oluşmaktadır. Bu süreç içerisinde DNA replikasyonu, genetik materyalin hücrelere eşit biçimde dağılması ve hücre bölünmesi (sitokinez) gerçekleşmektedir [25].

Tümör hücrelerinin ayırt edici özelliklerinden birisi hücre döngüsü düzenleme mekanizmalarındaki bozukluklardır. DNA'da meydana gelen bir hasar sonrası hücre

döngüsünün bloke edilmesi genomik bütünlüğün korunması açısından çok önemlidir. Hücre döngüsündeki farklı evrelerin bir düzen içerisinde ilerlemesi ve gerektiğinde döngünün durdurulması için kontrol noktaları yer almaktadır [30].

G₁/S, S/G₂ ve G₂/M fazları arasındaki geçişler kontrol noktaları olarak işlev görmektedir (Şekil 2.1). G₁ kontrol noktasında hasarlı DNA'nın S evresine girmeden onarılması sağlanır. Hücre döngüsünün devam etmesi için uygun büyüme faktörleri bulunmuyorsa hücre G₀ evresine girer. Bu evre de hücre büyümesi durur ve bölünmeden yaşamına devam eder. Hücre dışı sinyallerle uyarıldıklarında ise hücre bölünme döngüsüne devam eder. DNA'daki hataların düzeltilemeyeceği durumlarda ise hücre S evresine geçmeden apoptoza girmesi sağlanır. S kontrol noktasında DNA hasar kontrolü gerçekleşir. G₂ kontrol noktasında DNA replikasyonu tamamlanmadan mitozun başlangıcına engel olur. M kontrol fazında ise mitozda kromozomların iğ ipliklerine düzgün dizilimlerinin kontrolü sağlanır [25]. Bu döngüde ve kontrol noktalarında görev alan siklinler, siklin-bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve CDK inhibitörleri (CDI'lar) arasındaki denge, hücre döngüsünün düzenlenmesini ve ilerlemesini sağlamaktadır [12, 31].



Şekil 2.1 Hücre döngüsü kontrol noktaları [25].

Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücrede meydana gelmiş olan hasarın onarılmasını sağlamak ve hasarlı genetik materyalin yeni hücrelere geçmesini önlemek açısından oldukça önemlidir. Kontrol noktaları sayesinde döngü geçici olarak durdurulabilir ancak hasar onarılamazsa kontrol noktası sinyalleri apoptoz yollarını aktive edebilir. Tümör hücrelerinin hızlı bir şekilde çoğalması, bu noktalardaki kontrol kaybından kaynaklanmaktadır ve hasarlı genomun devamını engellemek için hücre kontrol

noktalarında bölünmenin durdurulmasının ne kadar önemli olduğu bir kez daha vurgulanmaktadır [30].

2.1.1.2 Programlanmış hücre ölümü (Apoptoz)

Apoptoz, çok hücreli organizmaların normal gelişiminin gerçekleşmesi için embriyogenezden itibaren doku homeostazisinin devamı için gerekli olan hücrelerin programlı olarak ölümüdür. Apoptoz, hasarlı veya zarar görmüş, gerekli olmayan hücrelerin dokuyu tahrip etmeden, fizyolojik olarak ortadan kaldırılmasıdır [32]. Apoptoz sırasında nükleer kondensasyon ve parçalanma, kromozomal DNA'nın internükleozomal ayrılması, ölen hücrelerin plazma membranı yıkımı olmadan apoptotik cisimler halinde paketlenmesi ve apoptotik cisimlerin fagositik hücreler tarafından tanınarak uzaklaştırılması gibi ATP gerektiren sıralı birçok olay gerçekleşmektedir [33].

Apoptoz, kaspaz adı verilen (sistein proteazları) proteaz ailesi proteinlerinin fonksiyonu ve DNAazların aktivasyonu aracılığıyla DNA'nın parçalanarak hücrenin yıkımı olayıdır. Fosfotidilserinin hücre membran iç yüzeyinden dış yüzeyine yerleşimi ile gözlenen membran değişiklikleri, fagositik hücrelerin apoptoz olacak hücreyi tanınması ile devam eder [34]. Apoptotik sinyaller, genomik bütünlüğün korunmasına yardımcı olmaktadır. Bu sinyallerin düzensizliği sadece tümörögenezini teşvik etmekle kalmayıp, aynı zamanda tedaviye dirençli kanser hücrelerini de üretebilir. Hücrelerin, apoptozdan kaçması, kanserin belirgin bir göstergesidir [35].

Apoptozun gerçekleştiği mekanizmalarda meydana gelen düzensizlikler hastalıkların patogenezinin anlaşılması için oldukça önemlidir. Bu durum belirli apoptotik genleri veya apoptotik yolları hedef alan ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabilir. Apoptoz mekanizmaların başlangıçları farklı olsa da, süreç kaspazlar ile sonlanmaktadır. Kaspazlar apoptotik süreçte hem başlatıcı hem de uygulayıcı olarak görev yapmaktadırlar [36].

Kaspaz zincirinin aktivasyonunu ve apoptozu başlattığı bilinen 3 yol vardır. Hücrenin tercih ettiği yol; başlangıç ölüm sinyaline, ilgili hücre tipine ve pro-apoptotik/anti-apoptotik sinyaller arasındaki dengeye bağlıdır. Ölüm reseptörü aracılı (ekstrinsik) ve mitokondriyal (intrinsik) olan iki yol ile ayrıntılı olarak ele alınırken, üçüncü yol endoplazmik retikulumu içeren içsel bir yoldur. Bu yolun, hücresel strese yanıt olarak ortaya çıkan patolojik olarak uygun bir apoptoz formu olduğuna inanılmaktadır [37].

Ölüm reseptörü aracılı yolla, ölüm ligandları ilgili reseptörlerine bağlandığında apoptoz başlar. Ölüm reseptörleri tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinin (tip I TNF reseptörü ve Fas) üyeleridir. Reseptörler ile ilişkili adaptör proteinlerde bir bağlanma alanının oluşmasıyla ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi meydana gelir. Bu kompleks ilgili kaspazları aktive eder ve apoptotik yolağın devamı sağlanır. Mitokondriyal yolla ise hipoksi, genetik hasar, yüksek konsantrasyonda kalsiyum iyonları, aşırı oksidatif stres gibi faktörler mitokondriyal membran geçirgenliğinin artmasına neden olur. Mitokondriyal membrandaki bu değişiklikler Bcl ailesi genlerinden olan proapoptotik genlerin aktivasyonu ile gerçekleşir ve mitokondriyal iç zardan sitoplazmaya sitokrom c salınır. Sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF-1) bağlanır ve kaspaz 9 aktivasyonunu gerçekleştirir. Kaspaz 9, kaspaz 3, 6 ve 7'yi aktive ederek önemli hücre içi proteinlerin bozulmasıyla morfolojik değişimlere ve apoptotik hücrelerin fenotipine yol açar [38].

Kanser hücrelerinin çoğunda apoptoz görülmediğinden dolayı yaşam süreleri normal hücrelerden daha fazladır. DNA'da meydana gelmiş olan hasarlara rağmen kanser hücreleri apoptozla gitmezler. Kanser hücrelerini apoptozdan koruyan mekanizmalar; pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesinin bozulması, kaspaz fonksiyonlarının azalması veya inhibe edilmesi ve ölüm reseptörleri yolağı sinyallerinin inhibisyonudur [25, 36].

2.2 Böbrek Kanseri

Böbreklerin her ikisi de karın boşluğunda retroperitoneal aralıkta 12. toraksik ve 3. lumbal vertebralar arasında bulunan, bir fasulye tanesini andıran kahverengi renkte organlardır. Sağ böbreğin üst kısmında karaciğer bulunduğu için biraz daha aşağı konumdadır. Sol böbrek ise 1 cm daha uzundur ve ortalama ağırlıkları 150 gram'dır [39].

Böbrekler travmalardan korunması için retroperitoneal yağ dokusu ile sarıdır ve kalın, dayanıklı yapıdaki böbrek kapsül yapısına sahiptir. Her iki böbreğin üst polünde, böbreküstü bezleri mevcuttur. Böbrekler nefron adı verilen ve böbreğin fonksiyonel en küçük ünitesi olarak bilinen yapılardan, toplama kanallarından ve kılcal damarlardan oluşmaktadır. Her böbrekte yaklaşık bir milyon nefron bulunmaktadır. [39, 40].

Böbrekler, metabolizma tarafından üretilen ya da üretilmiş atık maddelerin vücuttan atılmasını sağlamak, vücut sıvı hacmini ve bileşimini kontrol etmek gibi önemli fonksiyonlara sahiptir. Vücuttaki elektrolitlerin alımı ve çıkışı arasındaki dengeyi korumak, aynı zamanda düzenlenmesini sağlayarak plazmanın filtrelenmesini, istenmeyen maddelerin süzülerek idrardan atılmasını ve kanın geri dönüşümünü sağlayarak vücut homeostazisinin devamlılığının sürdürülmesini sağlar. Ayrıca glukoneogenezin gerçekleşmesinde de önemli bir yeri vardır [41].

Böbrek fonksiyonlarında geri dönüşümsüz olarak ortaya çıkan kronik böbrek rahatsızlıkları ve böbrek yetmezliğinin yanı sıra böbrekte oluşan kitleler de sağlık açısından önem arz etmektedir. Birçok böbrek kitlesi, hastalığın geç evrelerine kadar asemptomatiktir ve fiziksel muayene ile tespit edilememektedir. Çoğu kitleler, çeşitli ilgisiz semptomlara sahip olmakla birlikte, sıklıkla görüntüleme muayenesi kullanımıyla tesadüfen saptanmaktadır [42]. Tanı ve tedavi yöntemleri, teknolojideki gelişmelerle oldukça artmıştır; bilgisayarlı tomografi, abdominal ultrasonografi ve diğer görüntüleme yöntemleri birçok farklı hastalıkta kullanıldığı gibi böbrek kitlelerinin de tespitinde kullanılmaktadır [43].

Böbrek hücreli karsinomlar (BHK) tüm böbrek malignitelerinin %90'ını oluşturmaktadır ve en sık görülen solid lezyondur [44]. Böbrekte oluşan kitlelerin bazıları tedavi veya takip gerektirmeyecek basit kitleler olmasına rağmen vakaların büyük bir çoğunluğu iyi huylu renal lezyonlar veya kötü huylu renal hücreli karsinomlardır [43]. Lezyonların çoğu küçük dereceli tümörler olmasına rağmen, böbrek karsinomları uzak metastazlara sahiptir. Böbrek karsinomunun en sık metastaz yaptığı organlar; akciğer (%45), kemik (%30), lenf nodları (%22), karaciğer (%20), böbrek üstü bezleri (%9) ve beyindir (%8) [45].

Ürogenital kanserler içerisinde yer alan ve yüksek mortaliteye sahip olan böbrek kanserleri erkeklerde kadınlara oranla daha yaygındır, çocuklarda ise nadir olarak görülmektedir [2, 46]. İnsidansı her yıl %2-4 oranında artmakla birlikte, en yüksek insidans 60 ila 70 yaş aralığındadır [44, 46]. Kuzey ve Doğu Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya ülkelerinde görülme sıklığı en fazladır. Morbiditesi ise ülkelerin sosyoekonomik gelişmişlik düzeyi ile ters orantılı bir şekilde ilerlemektedir [2].

2.2.1 Böbrek kanseri etiyolojisi

BHK'nın etiyolojisinde pek çok faktör yer almaktadır ancak hala kesin olarak bilinmemektedir. Vaka kontrol ve kohort çalışmalarıyla birlikte çeşitli risk faktörleri ortaya konmuştur.

Yaş: Böbrek hücreli kanserlerin insidansı yaşla birlikte artmaktadır. 6. ve 7. dekatlarda görülen artış ile hastaların %80'i 40-69 yaş aralığını kapsamaktadır [47].

Obezite: Hu J. ve arkadaşları [48] obezite ve aşırı kilo ile böbrek hücreli karsinom arasındaki ilişkiyi vaka kontrol çalışması ile değerlendirmişlerdir. Hem erkeklerde hem de kadınlarda aşırı kilo ve obezite ile artmış böbrek hücreli karsinom riski ortaya çıkmıştır. Obezitenin böbrek hücreli karsinomu etkilediği birkaç mekanizma sunulmuştur ancak hala belirsizdir. Steroid hormonlarda meydana gelen değişiklikler, endokrin reseptör aracılı etkileri olduğundan renal hücre proliferasyonunu etkilemektedir [2, 49].

Sigara tüketimi: Akciğer ve mesane kanseri kadar etkisi olmasa da sigara tüketimiyle böbrek hücreli kanser arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. İçilen sigara miktarı ve kanser riski arasında bir orantı vardır [2, 49].

Hipertansiyon: Hipertansiyon ve tedavisinde kullanılan diüretik ilaçlarda dahil anti hipertansif ilaçların böbrek hücreli karsinomlarla ilişkili olduğu bulunmuştur [2, 49].

Böbrek Transplantasyonu ve Diyaliz: Uzun süreli böbrek diyalizi geçiren hastalarda genel popülasyona kıyasla yıllık ortalama renal hücreli karsinom insidansı da artmaktadır. Son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada transplantasyon sonrası kanser riski ile ilgili büyük ölçüde artan kazanılmış renal kistik hastalık ve renal hücre kanseri riskini ortaya çıkarmıştır [50].

Mesleki ve çevresel karsinojenler: Trikloretilen, birçok sanayide yağ giderici kimyasal olarak kullanılmaktadır ve maruziyetinin kanseri indüklediği de çeşitli deneylerle gösterilmiştir. Berrak hücreli böbrek kanseriyle önemli bir ilişkisi olduğu ifade edilmiştir.

Bu risk faktörlerinin haricinde böbrek hücreli kanserlerde; beslenme alışkanlığı, idrar yolu enfeksiyonu, iyonize radyasyon, kronik böbrek yetmezliği ve aile öyküsünün etiyolojide etkili olabileceği düşünülmektedir [2, 49].

2.2.2 Böbrek kanseri evrelendirmesi ve sınıflandırması

Kanserin tanısında yaygınlığı ve evresinin belirlenmesi prognoz, tedavi sonuçları ve klinik araştırmalar açısından en kritik anahtar faktördür. Kliniklerin ve uzmanların - ihtiyaçları değerlendirildiğinde çok sayıda evreleme sistemi yapılmıştır. En kullanışlı evreleme sistemi “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) ve “The International Union for Cancer Control” (UICC) tarafından birlikte geliştirilen tümör-nod-metastaz (TNM) sistemidir. TNM evreleme sistemi kanserleri; primer tümörün boyut ve uzanımı (T), bölgesel lenf nodu tutulumu (N) ve uzak metastazın olup olmaması (M) ile anatomik olmayan prognostik faktörleri de ekleyerek sınıflandırmaktadır (Tablo 2.1). Böbrek kanserlerinin prognozunda tümör ve hastayla ilişkili faktörler ile birlikte laboratuvar testleri de dikkate alınmaktadır [51].

Tarih boyunca böbrek hücreli karsinom kendine özgü belirtileri olan karakterize bir hastalık olarak görülmüştür. Ancak günümüzde Dünya Sağlık Örgütü’ne (WHO) göre böbrek hücreli karsinomlar kendine özgün morfolojik özellikleri, farklı histolojik yapıları, birbirlerine benzemeyen klinik seyirleri ve farklı genetik anomalilerden kaynaklanan heterojen bir kanser ailesi olarak tanımlanmış ve sınıflanmıştır [52]. Böbrek hücreli kanserlerin 2016 WHO sınıflandırılması aşağıdaki gibidir [2]. Böbrek hücreli karsinomlar da meme, prostat, kolon ve birçok kanser türü gibi kalıtsal veya sporadik olarak gelişmektedir. Renal hücreli karsinomların çoğu sporadik olsa da %2 oranında kalıtsal olarak ortaya çıkmaktadır. Bazı genetik bozukluklar böbrek kanserleriyle ilişkilidir ve böbrek kanseri olan bir bireyin birinci derece akrabası için bu risk iki katı kadardır [2, 53]. Böbrek hücreli kanser 2016 WHO histolojik sınıflandırılması:

Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom,

Papiller böbrek hücreli karsinom,

Kromofob böbrek hücreli karsinom,

Düşük malign potansiyelini multiloküler kistik böbrek neoplazma,

Kalıtsal leiomyomatozis ve renal hücre karsinom ilişkili böbrek hücresi karsinomu,

Multiloküler kistik böbrek hücreli karsinom,

Toplayıcı kanal karsinomu MiT ailesi translokasyonu böbrek hücreli karsinomlar,

Meduller karsinom,

Süksinat dehidrojenaz eksikliği böbrek hücresi karsinomu,

Müsinöz tübüler ve iğsi hücreli karsinom,

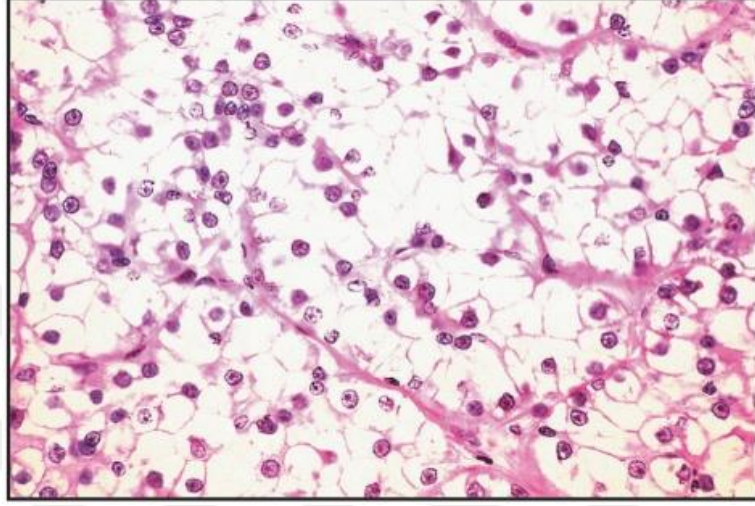
Tübulo Kistik böbrek hücreli karsinom,
 Nöroblastom ile ilişkili böbrek hücreli karsinom,
 Papiller adenom, Onkositom,
 Sınıflandırılmayan böbrek hücreli karsinom şeklindedir [2].

Tablo 2.1 Böbrek hücreli karsinomun TNM (2017) evrelendirme sistemi [54].

T Kategorisi	T (Primer Tümör) kriterleri
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait bulgu yok
T1	≤ 7 cm böbreğe sınırlı T1a : ≤ 4 cm T1b : > 4 cm, ancak ≤ 7 cm
T2	>7 cm böbreğe sınırlı T2a: > 7 cm ancak ≤ 10 cm T2b: > 10 cm
T3	Tümör büyük venler veya perinefrik dokulara uzanıyor T3a: Renal ven veya dallarına, perinefrik yağlı dokuya ya da renal sinüsteeki yağ dokusuna uzanıyor, ancak gerotada sınırlı T3b: Tümör, diyaframın altındaki vena kavaya uzanır. T3c: Tümör, diyaframın üstündeki vena kavaya uzanır veya vena kava duvar invazyon
T4:	Tümör Gerota fasyasını aşmış (ipsilateral adrenal bez tutulumu dahil)
N Kategorisi	N (Bölgesel lenf nodları) kriterleri
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
M Kategorisi	M (Uzak metastaz) kriterleri
M0	Uzak metastaz yok
cM1(klinik sınıflama)	Uzak metastaz var
pM1 (patolojik evre gruplaması)	Uzak metastaz var, mikroskopik olarak doğrulanan

2.2.2.1 Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom

Berrak hücreli BHK böbrek kanserlerinin %65-70'ini oluşturmaktadır. Tümör hücreleri, büyük, açık sitoplazmalı, küçük yuvarlak ve hiperkromatik bazal çekirdeklidir (Şekil 2.2) [55]. Bu neoplazmlar tipik damar oluşumuna ve karakteristik bir moleküler değişime sahiptirler [2].



Şekil 2.2 Berrak hücreli böbrek hücreli karsinom [55].

Berrak hücreli karsinomların %96'sı sporadik %4'ü aileseldir. Neredeyse tüm ailesel berrak hücreli karsinomlar 3. kromozomun p kolunda bulunan Von Hippel-Lindau (VHL) tümör baskılayıcı genindeki kalıtsal bir mutasyondan ve hipoksiyle indüklenen faktör (HIF) indüklenmesinden kaynaklanır [46]. VHL geni, HIF olarak adlandırılan transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu düzenleyen bir protein (pVHL) kodlar. HIF hücresel cevabını oksijen varlığına göre düzenler. Normoksik koşullarda pVHL, HIF ile etkileşir ve ubikütinasyonuna sebep olur. Sonuçta proteozomlar tarafından degradasyonu sağlanır. Hipoksik koşullarda, HIF birikmesi meydana gelir ve hipoksiye karşı hücre adaptasyonu ile ilişkili genler transkribe edilir. Bu genlerin transkripsiyonu, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF) alfa ve beta ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) aktivasyonu ile anjiyogenez, hücre büyümesi ve glikolizi arttırmaktadır [56].

Birçok biyomedikal araştırmada çeşitli hücre hatları kullanılmaktadır ve *in vitro* modeller üzerinde yapılan çalışmalarla, oldukça kompleks bir hastalık olan kanserin tedavisinde de birçok keşif yapılmıştır. Böbrek kanserinde de terapötik ajanlar böbrek türevli hücre hatları üzerinde denenmektedir. 1970'lerin ortasından 1980'lerin sonuna kadar böbrek hücre hatları, alt tiplerinin henüz ayırt edilemediği bir dönemde

oluşturulmuştur. Ancak sonraki dönemlerde giderek artan veriler, genetik profil analizi, immünohistokimya ve gen dizilemesi de dahil olmak üzere birçok belirteç böbrek hücreli kanserin alt sınıflandırılması için yardımcı olmuştur. 769-P hücre hattı da (ATCC® CRL-1933™, Manassas, VA, ABD) berrak hücreli böbrek kanseri fenotipini düşündüren VHL gen mutasyonu içerir ve aynı zamanda yüksek seviyede VEGF salgılar [57].

2.3 Diyet ve Kanser Kemoprevensiyonu

Dünya genelinde, tıbbi tedavilerdeki modern gelişmelere, erken teşhis ve farkındalığın artmasına rağmen kanser görülme sıklığı da gittikçe artmaktadır. Kanser gelişiminde etkili olan, genetik yatkınlık gibi birçok risk faktörünün değiştirilememesinden dolayı kanserin önlenmesinde yeni yaklaşımlara ilgi artmaktadır [58].

Kemoprevensiyon, kimyasal bileşiklerle kanser gelişiminin engellenmesini ifade etmektedir. Bu kimyasallar ya sentetik olarak elde edilip ilaç olarak alınır ya da doğal yollardan diyet ile alınır [59]. İlk olarak Lee Wattenberg [60] tarafından önerilen klasik sınıflandırmaya göre, kemopreventif ajanlar; bloke edici ve baskılayıcı ajanlar olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmıştır. Bloke edici ajanlar, karsinojenlerin hedef bölgelere ulaşmasını, metabolik aktivasyondan geçmesini veya daha sonra DNA, RNA ve protein gibi kritik moleküllerle etkileşmesini önler. Baskılayıcı ajanlar ise hücrelerin başlangıç aşamasından, gelişme ve ilerleme aşamalarına malign transformasyonunu inhibe eder [61]. Birçok kemopreventif ajan, başlangıç aşamasını engelleyen bloke edici ajanlar olarak ya da kanser proliferasyonunu, farklılaşmasını, yaşlanmasını veya apoptozunu kontrol eden önemli faktörleri etkileyerek, kanserin ilerlemesini durduran ya da tersine çeviren baskılayıcı ajanlar olarak sınıflandırılabilir [31].

Yaygın hastalıkların oluşum risklerini belirlenmesinde genler kadar çevresel faktörlerin de etkisi önemlidir. Epidemiyolojide diyet ve hastalıklar arasındaki ilişkinin oldukça uzun bir geçmişi olsa da, diyetin hastalık risklerini arttırabileceği veya azaltabileceği konusundaki mekanizmalar hala kesin değildir. Yapılan çalışmalar ile diyetin epigenetik değişikliklere yol açarak gen düzenlenmesinde değişiklikler meydana getirebileceği ve hastalık riskleriyle ilişkili olabileceği yakın zamanda fark edilmiştir [62].

Dünya Kanser Araştırma Fonu (WCRF) diyet ile kanser riski ilişkisine dair; karaciğer kanseri ile aflatoksinler, kırmızı et veya işlenmiş et ile kolorektal kanser, alkol ve sigara için gastrointestinal sistem, β -karoten ile akciğer kanseri arasında çeşitli spesifik kanıtlar bildirmiştir [63].

Epidemiyolojik çalışmalar, meyve ve sebzeler açısından zengin olan sağlıklı beslenmenin, beslenmenin ötesinde kanser ve kardiyovasküler hastalıklara, diyabet, diğer kronik hastalıklara da karşı koruduğunu öngörmektedir. Bu koruma mekanizması bitkilerde bulunan lezzet, tat ve renkten sorumlu olan sekonder metabolitler sayesinde gerçekleşmektedir. Bu doğal bileşiklerin çok büyük bir sınıfı olan fitokimyasalların sağlığa faydalı etkileri kanıtlanmış olup oldukça çeşitlidir [64].

2.3.1 Fitokimyasallar

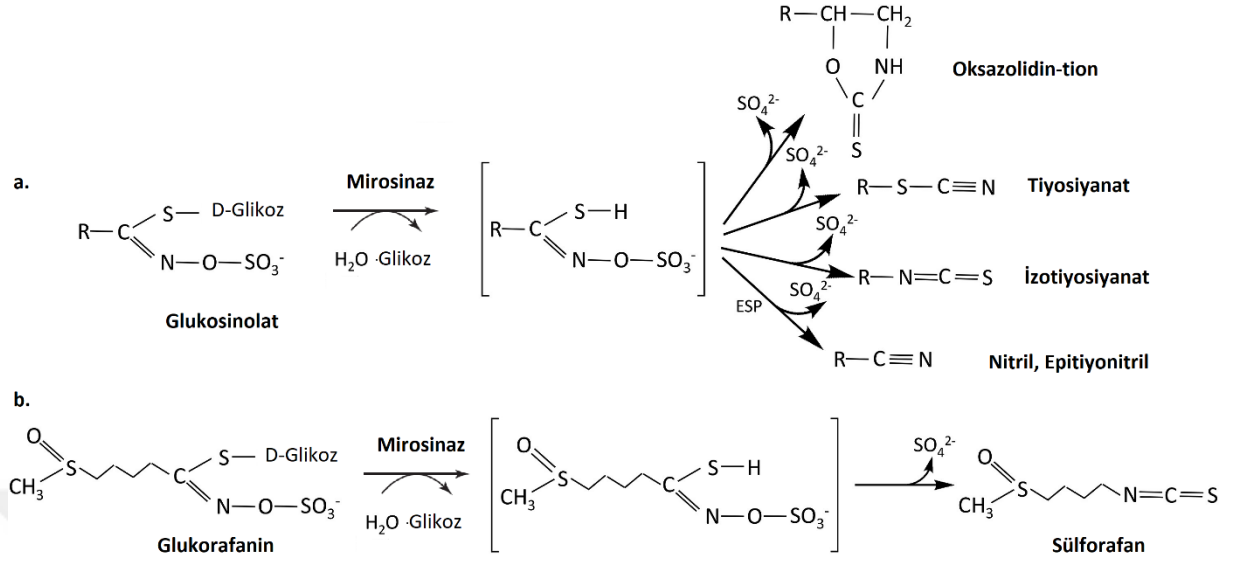
Fitokimyasallar, bitkisel kimyasallar olup, meyve, sebze ve tahıllarda 5000'den fazla sayıda tanımlandığı tahmin edilmektedir. Fitokimyasallar; karotenoidler, fenolikler, alkaloidler, azot içeren bileşikler ve organosülfür bileşikleri olarak sınıflandırılabilir. Organosülfür bileşiklerin ise izotiyosiyanatlar, indoller ve allilik sülfür bileşikleri olmak üzere üç çeşidi vardır [65].

İlk glukosinolat beyaz hardal tohumlarından izole edilmiştir ve o zamandan itibaren en çok sayıda glukosinolat yapıları turpgillerden elde edilmiştir [66].

Turpgiller ailesi 120'den fazla benzersiz amino asit yan zincirine sahip olan , β -tioglukozit N-hidroksisülfatları içeren yüksek glukosinolata sahiptir. Turpgiller ailesinin acı tadından sorumlu olan glukosinolatlar, farmasötik faaliyette ana işlev görürler. SFN ve diğer izotiyosiyanatlar, inaktif glukosinolat prekürsörleri şeklinde bitkilerde sentezlenir ve depolanır [67]. Glukosinolatlar glikoz ve sülfür içeren organik anyonlar olup, pH, sıcaklık ve demir varlığı gibi reaksiyon koşullarına bağlı olarak, enzimatik olmayan, moleküller arası yeniden düzenlemelerin bir sonucu olarak tiyosiyanatlar ve nitrilleri içeren diğer reaksiyon ürünlerini de oluşturulabilir (Şekil 2.3.a) [68-70].

Bitkinin yaralanması, çiğnenmesi, hasatı, donması ya da çözülmesi gibi doku hasarı gerçekleştiğinde, mirosin hücrelerinde lokalize olduğu düşünülen bir β -tiyogluko-hidrolaz enzimi olan mirosinaz enzimi serbest bırakılır [67]. Glukosinolatların mirosinaz enzimleri ile hidrolizi sonucunda oluşan ürünlerden bazıları böcekler, bitkiler,

mantarlar ve bakteriler gibi çok çeşitli organizmalara karşı biyosidal aktiviteye sahiptir [70].



Şekil 2.3 (a) Glukosinolatın mirosinaz enzimi tarafından hidrolizi ve reaksiyon sonucu oluşan ürünler **(b)** Glukorafanin hidrolizi sonucu SFN oluşumu [70].

Mirosinaz reaksiyonunun kinetiği, türden türe göre büyük oranda farklıdır ve enzimin çeşitli formları, aynı bitki içerisinde bile mevcut olabilir. Mirosinaz enzimi bitkilerin yanı sıra mantar ve insan bağırsak mikroflorası ile ilişkili birçok bakteride de (*Enterobacter cloacae*, Tani ve arkadaşları, 1974 [71]) bulunmaktadır [72].

2.3.2 Sülforafan

SFN [1-izotiyosiyano-4-(metilsülfünil)bütan, (C₆H₁₁NOS₂)], brokoli ve diğer turpgillerden elde edilen bir izotiyosiyanattır (ITC) ve bir glukosinolat çeşidi olan glukorafaninin endojen mirosinaz enzimi ile hidrolizi sonucu oluşmaktadır (Şekil 2.3.b) [69, 73].

Kuru ağırlık miktarı olarak daha yüksek seviyedeki glukosinolatlar fidelerden birkaç gün sonra oluşan brokoli filizleri içerisinde bulunmaktadır [12]. Klinik olarak yapılan araştırmaların çoğu, brokolinin filizlerine ilişkindir, bu alandaki çalışmaların ilki 1990'ların başında Johns Hopkins Üniversitesi'nde Fahey ve arkadaşları tarafından yapılmıştır ve 3 günlük brokoli filizlerinin, olgun bitkilerden 10–100 kat daha yüksek glukosinolat konsantrasyonu içerdiğini göstermiştir [74, 75]. Daha yüksek miktarda glukosinolat içeren, brokoli filizleri özel olarak yetiştirilmektedir [12].

Oral olarak alınan brokoli filizleri veya tohum ekstraktları, hidrolizi gerçekleştirmek için mirosinaz enzimi barındırmazlar. Sağlıklı insan bağırsak mikroflorasında yer alan mirosinaz enzimi üreten bakteriler tarafından metabolize edilmektedir. Bireyler arasında bağırsaklardaki mikrobiyal flora ve dolayısıyla mirosinaz enzimi açısından farklılık göstermektedir. Araştırmalar sonucu yaklaşık SFN'nin %74'ünün jejunumdan emildiği ve merkaptirik asit metabolizma yolunu kullanmakta olduğu ifade edilmiştir [76].

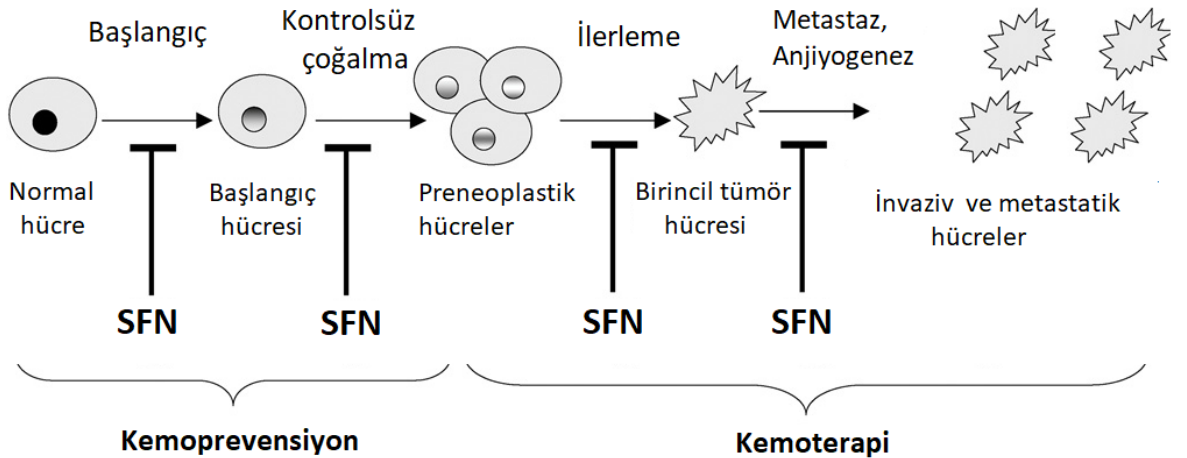
2.3.2.1 Sülfurafan'ın kemoprevensiyon mekanizmaları

SFN'nin karsinogenez aşamasına bağlı olarak gösterdiği çeşitli moleküler etkileşimler ve kemoprevensiyon mekanizmaları çeşitli çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (Şekil 2.4) [12]. Son çalışmalar SFN'nin moleküler hedeflerinin; kanserin aşamasına ve hedef dokuya bağlı olarak değiştiğini, aynı zamanda çoklu hedeflerinin olduğunu göstermiştir. İlk olarak 1992'de potansiyel bir ajan olarak tanımlanan SFN ile ilgili yapılan çalışmalar, Faz II enzim indüksiyonu ve karsinogen aktivasyonunda rol oynayan enzimleri inhibe ettiğini göstermiştir. SFN'nin tümör gelişimine karşı koruma ve kanser gelişimini baskılama mekanizmalarının etkilerine özellikle ilgi gösterilmektedir [77].

Kimyasallarla uyarılan karsinogenezin önlenmesinde sitokrom P450 enzimlerinin (CYP) görev yaptığı Faz I metabolizmasının önemli bir yeri vardır. Diyetle alınan bileşikler ve çevresel karsinogenler; ilaç metabolizma enzimleriyle oksidasyon reaksiyonu sırasında önemli moleküllere bağlanabilen ve yüksek derecede reaktif ara ürünlere dönüşebilen prokarsinogenlerdir. Bu reaksiyonlar CYP enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir ve enzimlerin işlev, fonksiyonlarını düzenleyebilen bileşikler de karsinogenezin aşamalarında etkili olmaktadır. SFN ise Faz I metabolizması enzimlerinin aktivitesini direkt etkileşim veya mRNA seviyelerinin düzeylerinde yaptığı değişikliklerle düzenleyebilmektedir [78]. Yapılan çalışmalarla, sıçan hepatositlerinde CYP1A1 ve CYP2B1/2'nin SFN ile doza bağlı bir inhibisyonu görülürken, insan hepatositlerinde, mRNA seviyelerini azaltarak CYP3A4'ün aktivitesini azaltmıştır. SFN, çeşitli Faz I enzimlerinin seviyesini ve aktivitelerini değiştirerek prokarsinogenlerin aktivasyonunun azaltılmasına yol açacak şekilde düzenlemektedir [77].

Faz II enzimleri [Glutasyon transferazları (GSTler), NAD (P) H: kinon redüktaz (QR), epoksit hidrolaz, hemeoksijenaz, UDP-glukuronosiltransferaz] elektrofillerin detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır ve indüksiyonu, karsinogenez ve mutageneze karşı korur. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) anormal üretimine yol açan prooksidan/antioksidan dengesizliğinden kaynaklanmaktadır. ROS'un yüksek seviyelere ulaşmasıyla, hücre molekülleri ile reaksiyona girerek DNA, lipid ve proteinlere zarar verebilir. Hücredeki sinyal yollarını değiştirebilmektedir, hücresel dejenerasyona ve sonucunda da hücreyi apoptoza da götürebilmektedir [79].

Ancak SFN doğrudan bir antioksidan veya prooksidan değildir, çünkü izotiyosiyanat grubunun fizyolojik koşullar altında oksidasyon veya redüksiyon reaksiyonlarına katılması pek mümkün olmamakla birlikte, hücrelerin antioksidan kapasitesini ve oksidatif stresle başa çıkma yeteneklerini arttırmak için dolaylı olarak etkilediğine dair önemli ve artan kanıtlar vardır [80]. Çeşitli reaktif karsinojenleri, mutajenleri ve diğer toksinleri metabolize eden GST'ler ve NQO1 gibi Nrf2 düzenleyici enzimleri içeren Faz II ailesini kodlayan genleri uyarmaktadır [77].



Şekil 2.4 SFN'nin karsinogenez sürecinin farklı aşamalarına etki ederek kemopreventif ve kemoterapötik ajan olarak etkisi [12].

SFN alternatif kemoprevensiyon mekanizması olarak epigenetik hedefleri içeren histon modifikasyonunda da rol oynamaktadır [81]. Gen regülasyonunun önemli bir mekanizması; nükleer histonlarının asetilasyonudur. Histon asetil transferaz ve histon deasetilaz enzimlerinin arasındaki denge hücrelerin normal süreçlerini devam ettirmeleri için gereklidir. Var olan dengenin değişimi sonucunda kanser gelişimi gözlenebilmektedir [82]. Myzak ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile SFN'nin kolon

ve prostat kanseri hücrelerinde histon deasetilaz aktivitesinde azalma olduğunu saptamışlardır. Göstermiş oldukları modifikasyonla histon deasetilaz inhibitörlerinin aynı eğilime sahip olduğunu saptamışlardır [81].

Güncel SFN çalışmaları; anjiyogenezi baskıladığını, benign tümörlerin malign tümörlere gelişimini ve metastatik süreci engellediğini göstermiştir [78]. Ayrıca geleneksel kanser tedavisinde, kemoterapi ve radyoterapilerde hastalarda sistemik toksisite meydana gelmektedir. SFN'nin kemopreventif etkisi, kemoterapi ve radyoterapi ile kombin edildiğinde, dirençli kanser hücrelerinin duyarlılığını ve tedavi etkinliğini arttırmaktadır. SFN, gemsitabin ve sisplatin gibi kemoterapötik ajanlarla birlikte sinerjik olarak kullanıldığında, düşük dozlarda bile ajanların etkisini arttırdığı ve dolayısıyla sitotoksisiteyi azalttığı görülmüştür. Bu etkilerin yanı sıra antiproliferatif etkisiyle hücre döngüsünü durdurduğu ve proapoptotik etkilerinin de olduğu saptanmıştır [83].

2.3.2.2 Sülföröfan ve hücre döngüsü

Hücre döngüsü kontrol noktasındaki sinyallerin düzenlenmesi önemli klinik sonuçlara yol açmaktadır. Döngüdeki fonksiyon bozuklukları tümör hücrelerinin kemoterapötik ajanlara olan duyarlılığını etkileyebilir. Hücre döngüsünü düzenleyen mekanizmalarda görev alan molekülleri etkileyecek diyetle alınan kimyasal bileşiklerin etki potansiyeli ve tümörojenik hücrelerin proliferasyonunun bloke eden ajanlar gelecek için umut vadetmektedir [12, 31].

SFN uygulanan doz, tedavi süresi ve hücre tipine bağılı olarak hücre döngüsünde önemli rol oynayan siklinler, CDK'ler ve CDI'ları etkileyerek hücre proliferasyonunu etkilemektedir. SFN ile yapılan çalışmalarda hücre döngüsünün birçok fazını durdurduğu gösterilmiştir [84]. SFN ile yapılan mesane, meme, kolon, beyin ve pankreas kanser hücrelerinin *in vitro* deneylerinde hücre döngüsü durdurulmasında önemli rol aldığı gösterilmiştir [85]. PC-3 prostat hücre hattında siklin B1, Cdc25B ve Cdc25c seviyelerinin azalması ile G2/M geçişinde ve HCT116 insan kolon kanseri hücre hattında baskın bir G2/M hücre döngüsü arresti gözlenmiştir [86]. Aynı kanser türüne ait farklı hücre hatlarında SFN ile muamele sonucunda döngünün farklı fazlarında durduğu da gözlenmiştir. Örneğin prostat kanseri LNCaP hücre hattında G0/G1 fazında hücre döngüsü durdurulmuştur [14]. SFN ile indüklenen hücre döngüsü G2/M fazında durdurulması insan prostat kanseri hücrelerinde ve insan kolon

karsinom hücrelerinde siklin B1 ekspresyonu ve CDC2 kinaz aktivitesiyle ilişkilendirilmiştir. Ancak bu etki farklı hücre hatlarında farklı etkilerle gerçekleşmektedir. SFN ile muameleden sonra kolon kanseri hücrelerinde yüksek seviyelerde siklin B1 ve aktif cdc2 kinaz bulunurken, prostat kanseri hücrelerinde ise siklin B1 seviyelerini düşürdüğü ve radyasyonla indüklenen hücre hasarının bir sensörü olarak görev yapan ve hücre döngüsü regülasyonunda etkili olan ATM kinaz aktivasyonu ile cdc2 kinaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [87, 88]. DU145 hücre hattında ise yapılan çalışmalar sonucunda G0/G1 ve G2/M her iki fazında iken, UMUC-3 mesane tümör hücrelerinde ise S ve G2/M her iki fazda döngünün durduğu saptanmıştır [15, 89, 90]. G2/M fazında hücre döngüsünün durmasının gözlemlendiği bir başka çalışmada CDK1 aşağı regülasyon ve siklin B1/CDK1 kompleksinin ayrılması yoluyla insan yumurtalık kanseri hücre dizisi PA-1’de elde edilmiştir [91].

SFN’nin hücre döngüsü inhibisyonu siklinler, CDK’lar ve CDI’lar haricinde bölünme aşamasında tübülün polimerizasyonunu inhibe edilmesi sonucunda mikrotübüllerin bozulmasından kaynaklandığı da saptanmıştır. Tübülün polimerizasyonunu önlediğine dair ilk kanıt, fare meme karsinomu hücre hattı F3II’de gözlenmiştir [92]. SFN ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde de maruziyet sonrası ekvatorial metafaz hizalamasını içermeyen kondanse kromozomlar gözlenmiştir [93].

2.3.2.3 Sülforafan ve apoptoz

Apoptoz doku homeostazının devamı için gerekli olan sessiz bir hücre yok etme mekanizmasıdır ancak düzensizliği nörodejeneratif hastalıklardan, organ yetmezliğine, otoimmün hastalıklardan kanser oluşumlarına kadar birçok rahatsızlığa neden olabilir. Çevresel stres ve toksik bileşikler de kapsayan birçok faktör apoptozda etkili olabilir [3]. Pre-neoplastik veya neoplastik hücreler, kontrolsüz hücre bölünmesi ve ölüm mekanizmalarına sahip oldukları için, kemopreventif bileşiklerin genetik olarak hasarlı bu hücrelerde apoptoz indüksiyonu oldukça önemsenmiştir. Kemopreventif bileşiklerin oluşturduğu stres sinyallerinin sitotoksik etkileri; mitokondri, kaspazlar ve diğer apoptoz ile ilişkili proteinlerin incelenmesiyle izlenebilir [31].

SFN’nin apoptoz indüksiyonu çeşitli hücre modellerinde çalışılmıştır. Örneğin, androjene bağımlı LNCaP hücrelerinde doza bağlı olarak DNA içeriğinde azalma görülmüş, kaspaz aktivasyonu ile hücrelerin apoptoza yönlendiği gözlenmiştir [14].

DU 145 hücrelerinde ise cleaved (kesilmiş) kaspaz 3 ve Bcl2 ekspresyonunda azalma ile apoptoz gözlenmiştir [90].

SFN kaspaz bağımlı intrinsik yolak üzerinden hücre apoptozunu indüklediği gibi kaspaz bağımsız olarak insan beyin glioblastom hücreleri T98G ve U-87MG'de birçok moleküler mekanizmanın aktivasyonu ile apoptozu indüklediği saptanmıştır [17]. PC-3 ve LNCaP hücreleri ile yapılan bir çalışmada tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyici ligandına (TRAIL) olan terapötik etkisi incelenmiş ve TRAIL reseptör-1 (TRAIL-R1 / DR4), TRAIL-R2 / DR5, Bax ve Bak protein ekspresyonlarını arttırdığı ve NF- κ B, P13K/AK ve MEK/ERK yollarının aktivasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir [94].

İnsan osteosarkom hücre hattı Saos-2'de cleaved Bid, kaspaz 8, 10, 9 ve 3 aktivasyonu, DR5 mRNA ekspresyonu ve protein seviyelerinde artış ile insan medulloblastoma hücre hattı DAOY'da belirgin olarak DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, kaspaz 3 ve 9 aktivitesiyle hücreler üzerinde proapoptotik etkileri gözlenmiştir [16, 95]. SFN'nin antiproliferatif ve apoptotik etkisinin p53'den bağımsız olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Yabani tip p53, mutasyona uğramış p53 ve p53 knockout fibroblastlarında SFN ile muamele sonucunda her üç fibroblast hattında da apoptozu ve HT-29 hücrelerinde G1 tutulumunu p53'den bağımsız bir şekilde uyarmıştır [96, 97].

2.4 Hücre Canlılığının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Hücre merkezli çalışmalar; kanser araştırmalarında, ilaç keşfi için yapılan çalışmalarda ve *in vitro* sitotoksosite belirlenmesinde kullanılırken, aynı zamanda genetik raportörlerin ifadesiyle hücresel bileşenlerin ve sinyal yollarının anlaşılması gibi biyolojik olayların analizi için de yaygın olarak kullanılır.

Yapılan çalışmalarda test edilen faktörün hücre canlılığı üzerindeki etkisini bilmek önemlidir. [98]. Sitotoksosite çalışmaları araştırılan maddelerin hücreler üzerindeki toksik etkisini anlamak için yapılmaktadır. Sitotoksosite belirleme yöntemlerinde kolorimetrik metodlardan biri mitokondriyal enzim aktivitesi ölçümüne bağlı olarak yapılan MTT [3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromid] yöntemi ve enzimatik yöntemlerde de laktat dehidrogenaz (LDH) yöntemi kullanılmaktadır.

Hücre ölümü belirteci olarak ve membran değişikliklerine bağlı olarak canlı ve apoptotik hücre ayırımını sağlayan Annexin V/7AAD boyaları kullanılmaktadır [99].

Tetrazolyum tuzlarından olan MTT bileşiği elektron alarak indirgendiğinde formazan yapısına dönüşmektedir. Bu dönüşüm aynı zamanda renk değişimini de meydana getirmektedir. Tetrazolyumun indirgenmesi ise aktif mitokondri fonksiyonuyla gerçekleşir. MTT bileşiği hücre membranından kolaylıkla geçebilir ve sitozolde indirgenme reaksiyonu gerçekleşir, oluşan formazan kristali hücre içerisinde çöker. Canlı hücrelerde kolorimetrik olarak mitokondriyal faaliyet sebebiyle renk dönüşümü gerçekleşirken, mitokondriyal fonksiyonları olmayan yani canlılığını yitirmiş olan hücreler ise renk değişimini gerçekleştirmezler. Hücre canlılığının ölçüsü olarak renk reaksiyonunun niceliksel değerini belirlemek için 570 nm'de absorban ölçümü gerçekleştirilir [98].

Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi, glikoliz sırasında laktatın pirüvata dönüşümüyle birlikte NAD^+ 'nin NADH 'a dönüşümünü katalize eden sitoplazmik bir enzimdir. Hücre plazma membranı zarar gördüğünde kültür ortamına LDH enzimi salınmaktadır. LDH salınımı, hücre dışı ortamda ve hücre kültürü ortamında stabilitesi göz önüne alındığında, doku ve hücrelerde hasar ve toksisitenin varlığını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. LDH aktivitesi, laktatı piruvat'a oksitleyerek dönüştürürken, renkli formazan oluşturmak için iyoditrotetrazolyum tuzu (INT) ile reaksiyona girer. Formazan seviyesi, sitotoksitenin göstergesi olan ortama salınan LDH miktarı ile doğru orantılıdır [100].

Sitotoksite sonucunda hücre ölümleri programlı hücre ölümü olan apoptoz veya nekroz şeklinde gerçekleşebilir. Apoptoz durumunda hücrede çeşitli değişiklikler meydana gelmektedir ve bunlardan biri hücre plazma membranında normalde iç kısımda lokalize olan negatif yüklü fosfatidilserinin (PS) dış tarafa transloke olmasıdır. Hücre zarının bozulmadan kaldığı apoptotik hücre ölümünün erken fazlarında meydana gelir. Annexin V, güçlü antikoagülan özellikleri olan bir vasküler protein olarak keşfedilmiştir ve PS için yüksek afiniteye sahip bir Ca^+ bağımlı fosfolipid bağlayıcıdır. Annexin V floresan bir madde ile işaretlenerek bu translokasyon sonucu apoptotik hücrelerin farkedilmesini sağlamaktadır [101]. Ancak bu translokasyon durumu nekroz olayında da meydana gelmektedir ve nekrotik hücrelerin de yüzeylerine Annexin V bağlanması görülebilmektedir. Apoptozun ilk aşamalarında membran bütünlüğü bozulmamışken nekrozda bütünlük bozulmaktadır. Annexin V

ile birlikte ikinci bir boya 7-AAD (Aminoaktinomisin) kullanılarak bu iki ölüm türü birbirinden ayırt edilmektedir.

7-AAD canlı hücre membranından geçemez sadece hasarlı hücrede yer alan çift zincirli DNA'ya bağlanarak apoptotik ve nekrotik hücre ayırımının yapılmasını sağlar [102]. Bu sayede Annexin V/7AAD yöntemi ile canlı hücrelerin, erken veya geç apoptotik ve ölü hücrelerin ayırımının yapılması kolaylaşmaktadır. Apoptotik olmayan hücreler: Annexin V ve 7-AAD boyanmaz, erken apoptotik hücreler: Annexin V ile boyanırken ve 7-AAD ile boyanmamaktadır, geç evre apoptotik ve ölü hücreler: Annexin V ve 7-AAD ile boyanmaktadır [103].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Malzemeler

769-P (ATCC® CRL-1933™, Manassas, Virginia, ABD), 293T (ATCC® CRL-3216™, Manassas, Virginia, ABD) , Sülforafan (CAS 4478-93-7, Cayman, Ann Arbor, Michigan, ABD), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco® Waltham, Massachusetts, ABD), RPMI 1640 (Gibco® Waltham, Massachusetts, ABD), Tripsin/Etilendiamin tetraasetik asit (Tripsin/EDTA) (Pan Biotech, Aidenbach, Bavaria, Almanya), Fetal Sığır Serum (FBS) (Pan Biotech, Aidenbach, Bavaria, Almanya), Penisilin/Streptomisin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD), Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck, Darmstadt, Almanya), Tripan Mavisi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD), Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (Gibco® Waltham, Massachusetts, ABD), Vybrant™ MTT Cell Viability Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD), Pierce® LDH Cytotoxicity Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD), Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit (Milipore, Merck, Darmstadt, Almanya), Muse® Cell Cycle Kit (Milipore, Merck, Darmstadt, Almanya), Etil Alkol (Merck, Darmstadt, Almanya) alındığı gibi kullanıldı.

3.2 Cihazlar

Laminar hava akışlı steril kabin (MN090/120, Nüve, Ankara, Türkiye) hücre kültürü işlemlerinin gerçekleştirilmesinde kullanıldı.

Karbondioksit İnkübatörü (EC 160 CO2, Nüve, Ankara, Türkiye) hücre inkübasyonlarının gerçekleşmesi için kullanıldı.

Su Banyosu (BM 30, Nüve, Ankara, Türkiye) hücre kültüründe kullanılan besiyerlerinin ısıtılması için kullanıldı.

Mikroplaka okuyucu (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) MTT ve LDH analizi sonuçlarının tayini için kullanıldı.

Muse® Cell Analyzer (Milipore, Merck, Darmstadt, Almanya) Annexin V yöntemi ile apoptotik hücrelerin saptanmasında ve hücre döngüsü analizinde kullanıldı.

İnverted Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Almanya) kültür aşamasında ve migrasyonun saptanmasında hücrelerin incelenmesi için kullanıldı.

Santrifüj (Z 306, Hermle, Wehingen, Almanya) kültür aşamasında hücrelerin çöktürülmesi için kullanıldı.

Thoma Lamı hücre sayımını gerçekleştirmek için kullanıldı.

3.3 Çalışma Materyali

Araştırmada 769-P insan böbrek adenokarsinomu epitel hücre hattı ve 293T insan böbrek epitel hücre hattı kullanılmıştır. Tez kapsamında yapılan deneylerin hepsi Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

3.4 Hücre Kültürü

3.4.1 Besiyerlerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan 769-P hücre hattı ticari olarak alınan RPMI 1640 besiyeri kullanılarak kültüre edildi. 293T hücre hattı ise ticari olarak alınan DMEM (4.5 g/L-glukoz) besiyeri kullanılarak kültüre edildi. RPMI 1640 ve DMEM besiyerleri %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin içerecek şekilde hazırlandı, kullanılabildiği kadar buzdolabında (+4°C) bekletildi.

3.4.2 Hücrelerin kültüre edilmesi

Sıvı azottan çıkarılan hücreler, 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Laminar hava akışlı kabin içerisinde 25 cm²'lik flasklara önceden 37 °C'de ısıtılmış olan besiyerlerinden 5 mL eklendi. Çözülen hücreler, mikropipet yardımıyla flasklara aktarıldı. Hücreler 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi.

Hücreler pasajlama öncesi inverted mikroskopta incelendi. Hücreler kültür kabının %80'ini kapladıklarında pasajlanarak kültürün devamı sağlandı. Hücreler pasajlanırken flasklardaki besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkandı. Yapışan hücreleri kaldırmak için Tripsin/EDTA solüsyonu eklendi ve flask inkübatörde 3 dakika bekletildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları mikroskopta kontrol edildikten sonra tripsinin etkisini nötralize etmek için üzerilerine besiyeri eklendi. Santrifüj tüpüne aktarılarak 1700 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Çöken hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Pellet, besiyeri ile süspanse edildikten sonra sayımı yapıldı. 1:1 dilüsyon olacak şekilde hücre süspanasyonu içerisinde 10 µL bir ependorf tüpe alındı. 10 µL Trypan Blue ile karıştırılarak homojen hale gelinceye kadar pipetaj yapıldı. Karışımdan 10 µL alınarak Thoma lamının her iki tarafına yayıldı. Lamın alt ve üst kısmındaki 16 büyük karedeki canlı hücreler mikroskopta sayılarak aritmetik ortalaması alındı. Hücrelerin sayımı tamamlandıktan sonra toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$1 \text{ mL'deki hücre sayısı} = 16 \text{ büyük karedeki hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4 \times \text{Toplam hacim}$$

Tamamlanan sayım işlemi sonrasında 75 cm²'lik flaska 15 mL besiyeri içerisine 2.1x10⁶ hücre eklenerek kültüre alındı. Flask 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.5 Sülföröfan Dilüsyonlarının Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan SFN'nin dilüsyonları iki hücre hattı için iki farklı besiyerinde hazırlandı. 2 mL etanol içerisinde çözülmüş olarak bulunan 141.0039 mM stok SFN'den DMEM ve RPMI 1640 besiyerleri içinde seri dilüsyon yapılarak; 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM, 1.56 µM, 0.78 µM, 0.39 µM, 0.19 µM, 0.095 µM, 0 µM'lık örnekler hazırlandı.

3.6 MTT [3-(4, 5-dimetil tiyazol-2-il)-2, 5 difenil tetrazolyum bromid] Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT testi uygulamasından bir gün önce 769-P ve 293T hücre hatları, 96 kuyulu mikropalakalara her bir kuyuda 200 µL besiyerinde 5x10³ hücre olacak şekilde ekildi. Her iki hücre hattı için her konsantrasyondan üç tekrar olmak üzere 24, 48 ve 72 saatlik deney grupları oluşturuldu.

Hücrelerin eşit olarak ekildiğinden emin olmak için mikroskopta kontrolü yapıldı. Hücrelerin yüzeye yapışması için plakalar 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 1 gün kültüre edildi. Kültür sonrası hücreler mikroskopta kontrol edildi ve kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırıldı. Kuyulara önceden hazırlanan 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM, 1.56 µM, 0.78 µM, 0.39 µM, 0.19 µM, 0.095 µM konsantrasyonlarda SFN içeren besiyerinden 96 kuyulu mikrolakaya içerisindeki her kuyuya 200 µL eklendi. Her konsantrasyon için 3 kuyu tekrarı yapıldı. Negatif kontrol olarak kullanılacak kuyulara SFN içermeyen besiyeri, pozitif kontrol olarak kullanılacak kuyulara ise 200 µL DMSO eklenerek mikrolakalar 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre alındı.

24., 48. ve 72. saatlerde inkübasyon süreleri tamamlanan gruplar inkübatörden çıkartılarak mikroskopta kontrol edildi. Mikrolakalar 1700 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra SFN içeren besiyerleri uzaklaştırıldı. Her kuyu 200 µL PBS ile yıkandı 96 kuyulu mikrolakaya 1700 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra PBS uzaklaştırıldı. Ticari olarak satın alınan MTT reaktifi 5 mg/mL olacak şekilde PBS içinde çözülüp 0.45 µm por çaplı filtreden geçirilip hazırlandı. MTT reaktifi %1 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisinli besiyeri ile 3:10 oranında bir falkonda karanlık ortamda karıştırıldı ve her kuyuya 100 µL eklenerek 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince mikrolakaların ışık almamasına dikkat edildi. İnkübasyon sonrası karanlık ortamda her kuyuya 100 µL DMSO eklendi ve negatif kontrol için ise 3 ayrı kuyuya aynı miktarda DMSO eklendi. Mikrolakalar 10 dk oda sıcaklığında ışıktan muhafaza edilerek inkübe edildi ve absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.7 LDH (Laktat Dehidrogenaz) Yöntemi ile Hücre Sitotoksitesinin Belirlenmesi

LDH testi uygulamasında, MTT işleminden önce yapılan hücre ekimi, konsantrasyonları bilinen SFN içeren besiyeri eklenme işlemleri tekrar yapıldı. İlk önce hücreler (769-P ve 293T) 96 kuyulu mikrolakalara her bir kuyuda 200 µL besiyerinde 5×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Her iki hücre hattı için her konsantrasyondan üç tekrar olmak üzere 24, 48 ve 72 saatlik deney grupları oluşturuldu. Hücrelerin eşit olarak ekildiğinden emin olmak için mikroskopta kontrolü yapıldı. Hücrelerin yüzeye yapışması için mikrolakalar 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 1 gün kültüre edildi. Kültür sonrası hücreler mikroskopta kontrol edildi ve kuyulardaki besiyerleri

uzaklaştırıldı. Kuyulara önceden hazırlanan 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM, 1.56 µM, 0.78 µM, 0.39 µM, 0.19 µM, 0.095 µM konsantrasyonlarda SFN içeren besiyerinden 96 kuyulu mikrolakaya içerisindeki her kuyuya 200 µL eklendi. Her konsantrasyon için 3 kuyu tekrarı yapıldı. Kontrol olarak kullanılacak olan hücre grubuna ise SFN içermeyen besiyerinden eklendi ve mikrolakalar 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre alındı.

İnkübasyon süresi tamamlanan gruplar inkübatörden çıkartılarak mikroskopta kontrol edildi. Bu aşamadan sonra ticari olarak satın alınan kit protokolü uygulandı:

1. LDH Reaksiyon Solüsyonu için 11.4 mL ultrasaf su bir falkona konuldu. LDH *Assay Buffer* oda sıcaklığında bekletilerek çözünmesi sağlandı. LDH *Assay Buffer*, *Substrat* ile karıştırılarak ultrasaf suya eklendi. Falkon ışık görmeyecek şekilde kapatıldı.
2. 10 mL %1 BSA içerisinde 1 µL LDH Pozitif kontrolden konularak 1X LDH Pozitif kontrolü hazırlandı.
3. LDH aktivite değerlerini ölçmek için;
 - i. Spontan değer için 3 kuyuya 50 µL enjeksiyonluk, ultrasaf su eklendi.
 - ii. Maksimum değer için 3 kuyuya 50 µL 10X Lizis Solüsyonundan eklendi. Mikrolakaya 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 40-45 dk bekletildi.
4. İnkübasyon sonrası 96 kuyulu mikrolakaya tabanına değmeden 50 µL besiyeri alındı ve yeni bir mikrolakaya aktarıldı.
5. Boş bir kuyuya hazırlanan pozitif kontrolden 50 µL eklendi.
6. Bütün kuyulara LDH Reaksiyon Solüsyonundan 50 µL karanlıkta eklendi ve oda sıcaklığında ışık görmeyecek şekilde 30 dk bekletildi.
7. İnkübasyon sonrası her bir kuyuya 50 µL LDH stop solüsyonundan eklendi.
8. Mikrolakanın absorbans değerleri 490/680 nm dalga boyunda ölçüldü ve sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ Sitotoksosite} = \frac{\text{Bileşik ile tedavi edilmiş LDH aktivitesi} - \text{Spontan LDH aktivitesi}}{\text{Maksimum LDH etkinliği} - \text{Spontan LDH aktivitesi}} \times 100$$

3.8 Annexin V Yöntemi ile Apoptoz Tayini

SFN'nin 769-P ve 293T hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini belirlemek için Annexin V yöntemi kullanıldı. 769-P ve 293T hattı hücreleri, 24 kuyulu mikrolakalara her bir kuyuda 1 mL besiyerinde 25×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Her iki hücre hattı için her konsantrasyondan 3 tekrar olmak üzere 48 saatlik deney grupları oluşturuldu. Hücrelerin yüzeye yapışması için plakalar 37°C 'de ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün kültüre edildi. İnkübasyon sonrası hücreler mikroskopta kontrol edildi. 48. saatten seçilmiş olan 6 konsantrasyon ($25\ \mu\text{M}$, $12.5\ \mu\text{M}$, $6.25\ \mu\text{M}$, $3.125\ \mu\text{M}$, $1.56\ \mu\text{M}$, $0.78\ \mu\text{M}$) stok SFN'den DMEM ve RPMI içerisinde hazırlandı. Bütün kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırıldı ve konsantrasyonları bilinen SFN içeren besiyerinden 1 mL eklendi. 48 saat muamele edilmek üzere 37°C 'de ve %5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı.

İnkübasyon süresi dolduktan sonra seçilmiş olan her konsantrasyon için etiketlenen falkonlara kuyulardaki besiyerleri toplandı ve kuyular PBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak için 1.5 mL Tripsin/EDTA eklendi ve 1 dk inkübatörde bekletildi. Tripsini inaktive etmek için besiyerinden eklendi. Pipetaj yapılarak kuyulardaki bütün besiyerleri falkonlara toplandı. Falkonlar 1500 rpm'de 15 dk santrifüjlendi.

Pelet $400\ \mu\text{L}$ taşıma solüsyonu ile süspanse edilerek ependorf tüplere aktarıldı. $100\ \mu\text{L}$ Muse™ Annexin V & Dead Cell reaktifinden örneklere eklendi. Tüpler ışık görmeyecek şekilde oda sıcaklığında 24 dk beklendi. Örneklerin ölçümü Muse® Cell Analyzer'da yapıldı.

3.9 Hücre Döngüsü Analizi

SFN'nin 769-P ve 293T hücre döngülerindeki etkisini belirleyebilmek için Muse™ Cell Cycle kiti kullanıldı. 769-P ve 293T hücreleri, 24 kuyulu mikrolakalara her bir kuyuda 1 mL besiyerinde 25×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Her iki hücre hattı için seçili olan 6 konsantrasyondan üç tekrar olmak üzere 48 saatlik deney grupları oluşturuldu. Hücrelerin yüzeye yapışması için plakalar 37°C 'de ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün kültüre edildi. İnkübasyon sonrası hücreler mikroskopta kontrol edildi. 48. saatten seçilmiş olan 6 konsantrasyon ($25\ \mu\text{M}$, $12.5\ \mu\text{M}$, $6.25\ \mu\text{M}$, $3.125\ \mu\text{M}$, $1.56\ \mu\text{M}$, $0.78\ \mu\text{M}$) stok SFN'den DMEM ve RPMI içerisinde hazırlandı. Bütün kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırıldı ve konsantrasyonları bilinen SFN içeren

besiyerinden 1 mL eklendi. 48 saat muamele edilmek üzere 37 °C’de ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

İnkübasyon süresi dolduktan sonra seçilmiş olan her konsantrasyon için etiketlenen falkonlara kuyulardaki besiyerleri toplandı ve kuyular PBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak için 1.5 mL Tripsin/EDTA eklendi ve 1 dk inkübatörde bekletildi. Tripsini nötralize etmek için besiyerinden eklendi. Pipetaj yapılarak kuyulardaki bütün besiyerleri falkonlara toplandı. Falkonlar 1500 rpm’de 15 dk santrifüjlendi. Peletler PBS ile yıkandı. Pelet hareket ettirilmeden süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreleri fikse etmek için her bir pelete yavaş bir şekilde 1 mL soğuk % 70 etanol eklendi. Örnekler -20 °C’de 3 saat inkübe edildi. 5 dk 300 xg’de santrifüjlendi ve 1X PBS ile bir kez yıkandı. Her tüpe 200 µL Muse™ Hücre Döngüsü reaktifi eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Örneklerin ölçümü Muse® Cell Analyzer’da yapıldı.

3.10 Hücre Migrasyon Analizi

SFN’nin hücre migrasyonu üzerine olan etkisini incelemek için 769-P hücreleri, 24 kuyulu mikropalakalara her bir kuyuda 1 mL besiyerinde 7×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 2 gün 37 °C’de ve %5 CO₂’de inkübe edildi. İverted mikrosopta incelererek hücre yoğunluğu %70-80’a ulaştığında kuyular 200 µL pipet ucu yardımıyla kuyu tabanlarına birbirlerine paralel olacak şekilde aynı yönde çizgi (yara) açıldı. Kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırıldı ve PBS ile kuyular 2 defa yıkandı. 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM stok SFN %1 FBS içeren RPMI’da hazırlandı ve yara açılan kuyulara 1 mL olacak şekilde eklendi. Kontrol olarak ise bir kuyuya SFN içermeyen besiyerinden 1 mL eklendi. Daha sonra her kuyunun görüntü koordinatları kaydedildi ve 0., 24. ve 48. saat mesafelerinin görüntüleri alındı.

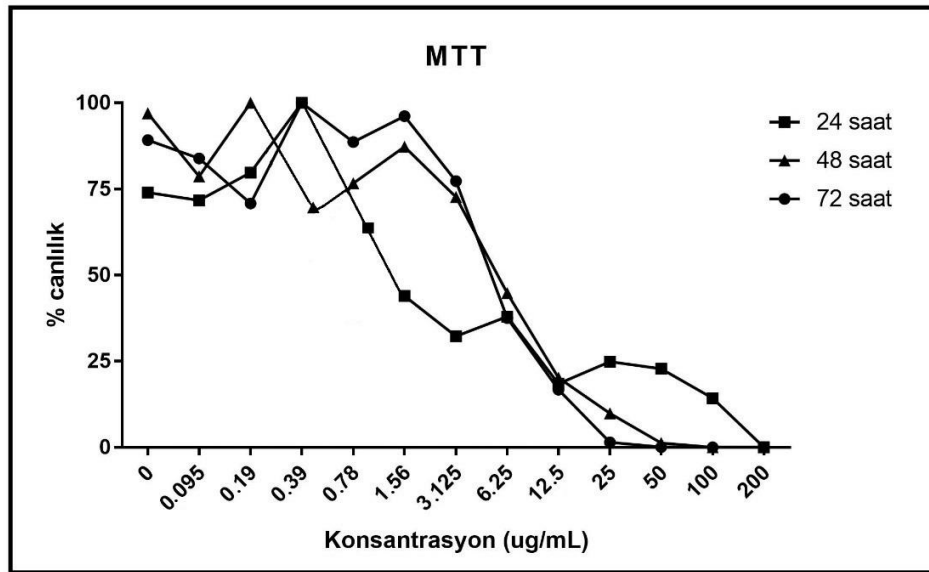
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 MTT Canlılık Deneyi Sonuçları

769-P ve 293T hücrelerinin 96 kuyulu mikropalakalara hücre ekiminden sonra 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM, 1.56 µM, 0.78 µM, 0.39 µM, 0.19 µM, 0.095 µM SFN konsantrasyonları ve kontrol olarak ise hücelere SFN içermeyen besiyeri eklendi. 24. , 48. ve 72. saat deney grupları oluşturuldu. Her bir konsantrasyon için 3 tekrar oluşturularak MTT canlılık deneyi gerçekleştirildi. 570 nm absorbans değerlerinden, formazan kristallerini çözmek için kullanılan DMSO absorbans değeri çıkartılarak % canlılık değerleri aşağıdaki formül uygulanarak belirlendi.

$$\% \text{ Canlılık} = 100 \times \frac{(\text{Muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama})}{(\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalama})}$$

769-P hücre hattı MTT testinden elde edilen bulgularla artan SFN konsantrasyonuna bağlı olarak belirtilen dozlarda doz-zaman bağımlı değişimi % canlılık cinsinden grafik halinde gösterildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 769-P hücre hattı canlılık sonuçları (24., 48. ve 72. saat).

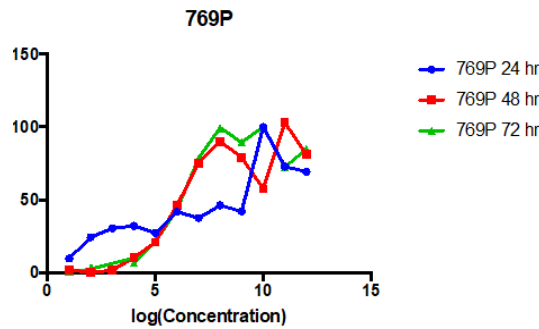
Şekil 4.1’de gösterilen MTT testi sonuçlarına göre 769-P hücre hattında en yüksek konsantrasyon olan 200 µM için 24., 48. ve 72. saat üç deney grubunda, 100 µM için ise 48. ve 72. saat deney gruplarında canlılık gözlenmedi.

769-P hücre hattı için 24., 48. ve 72. saat MTT % canlılık değerleri Tablo 4.1’ de özetlenmiştir.

Tablo 4.1 769-P hücre hattı MTT % canlılık değerleri.

Konsantrasyon (µM)	24. saat	48. saat	72. saat
200	0	0	0
100	14.3	0	0
50	22.8	1.3	0.1
25	24.9	9.9	1.5
12.5	18.5	20.2	16.8
6.25	38.3	44.8	37.6
3.125	32.3	72.7	77.3
1.56	44	87.3	96.2
0.78	60.3	76.7	88.7
0.39	100	68	100
0.019	79.8	100	70.8
0.095	71.7	78.7	83.9
0	74	97	89.2

MTT testi sonuçlarına göre SFN’nin 769-P hücre hattındaki IC₅₀ değerleri Graphpad uygulaması kullanılarak hesaplandı (Tablo 4.2). Sonuçlar Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

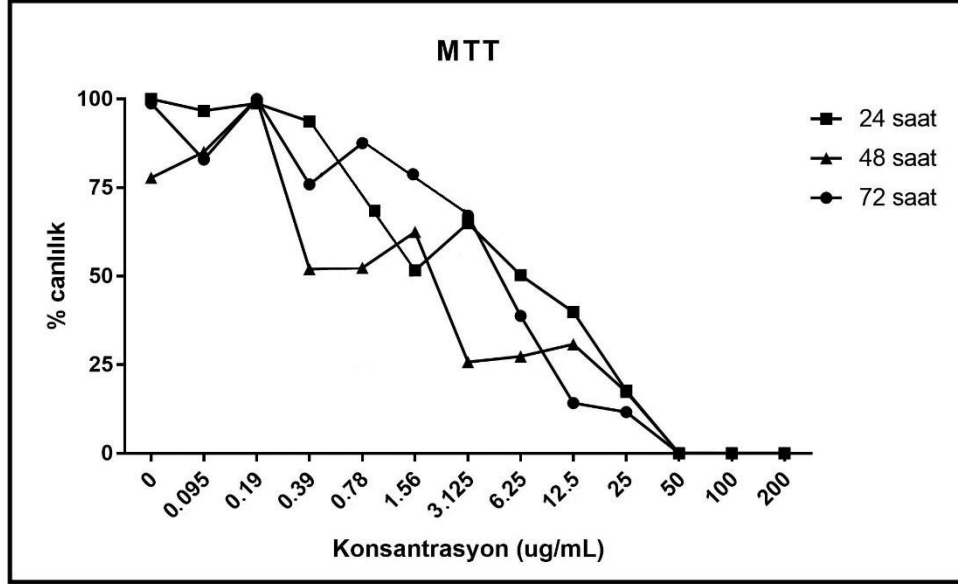


Şekil 4.2 769-P hücre hattı 24., 48. ve 72. saat IC₅₀ grafiği.

Tablo 4.2 769-P hücre hattı IC₅₀ değerleri.

IC ₅₀ (µM)	24. saat	48. saat	72. saat
Best-fit values	0.3117	0.3509	0.544
95% CI	0.7817	1.501	3.429

293T hücre hattı MTT testinden elde edilen bulgularla artan SFN konsantrasyonuna bağlı olarak belirtilen dozlarda doz-zaman bağımlı değişimi % canlılık cinsinden grafik halinde gösterildi (Şekil 4.3).



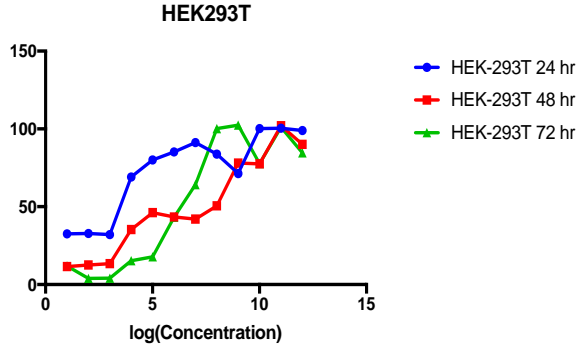
Şekil 4.3. 293T hücre hattı canlılık sonuçları (24.,48. ve 72. saat).

24., 48. ve 72. saat deney gruplarında 200 µM, 100 µM ve 50 µM konsantrasyonlarında canlılık gözlenmedi. 293T hücre hattı 24., 48. ve 72. saat MTT % canlılık değerleri Tablo 4.3'te özetlenmiştir.

Tablo 4.3 293T hücre hattı MTT % canlılık değerleri.

Konsantrasyon(µM)	24. saat	48. saat	72.saat
200	0	0	0
100	0	0	0
50	0	0	0
25	17.7	17.4	11.7
12.5	39.9	30.8	14.2
6.25	50.3	27.4	38.8
3.125	65	25.8	67.1
1.56	51.7	62.5	80.1
0.78	68	52.4	87.6
0.39	93.7	52	75.9
0.019	98.8	100	100
0.095	96.7	85	82.9
0	100	77.8	98.8

MTT testi sonuçlarına göre SFN'nin 293T hücre hattındaki IC₅₀ değerleri Graphpad uygulaması kullanılarak hesaplandı (Tablo 4.4). Sonuçlar Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4 293T hücre hattı 24., 48. ve 72. saat IC₅₀ grafiği.

Tablo 4.4 293T hücre hattı IC₅₀ değerleri.

IC ₅₀ (µM)	24.saat	48. saat	72.saat
Best-fit values	0.8158	0.2844	0.5546
95% CI	10.73	0.9807	2.524

Bu çalışmada SFN'nin böbrek hücre hatlarında 769-P ve 293T hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkilerine, hücre döngüsünde yarattığı antiproliferatif etkisiyle birlikte apoptotik etkisi incelenmiştir.

SFN'nin, hücre kültürü, deney hayvanı ve ksenograft modellerinde etkili bir terapötik ajan olduğu kanıtlanmıştır [100]. SFN'nin 769-P ve 293T hücrelerinde zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde antiproliferatif ve apoptotik etkileri olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda ilk olarak SFN'nin hücre canlılığı üzerine olan etkisi MTT yöntemiyle incelendi. 200, 100, 50 µM'lik konsantrasyonlarda her iki hücre hattında canlılığın belirgin düzeyde azaldığı, azalan konsantrasyonla birlikte canlılığın arttığı gözlemlendi. 25 µM ve artan konsantrasyonlarda canlılık oranı çok düşük olduğu için 25 µM maximum konsantrasyonu olmak üzere azalan konsantrasyonlar Annexin ve hücre döngüsü analizi için seçilmiştir. 24., 48. ve 72. saat deney grupları karşılaştırıldığında IC₅₀ değerlerine göre hücrelerin yaşayabilirlikleri, kontrollerle karşılaştırıldığında, 48. saat deney grubu sonraki analizler için seçilmiştir.

SFN'nin sitostatik etkisi için 1998 yılında L. Gamet Payratre ve arkadaşlarının HT29 ve Caco-2 insan kolon kanseri hücrelerinde yaptığı çalışmada 15 ve 50 µM ile tedavi sonucunda doza bağımlı olarak canlılığın azaldığı gözlemlenmiştir [13]. Lan H. ve arkadaşlarının 2017'de insan kolon adenokarsinom SW480 hücre hattı ve insan kolon kanseri HCT-116 hücre hattında yaptığı çalışmada 0-20 µM konsantrasyonlarda 48 saate kadar canlılıkların doza bağımlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir [104]. Rutz J.

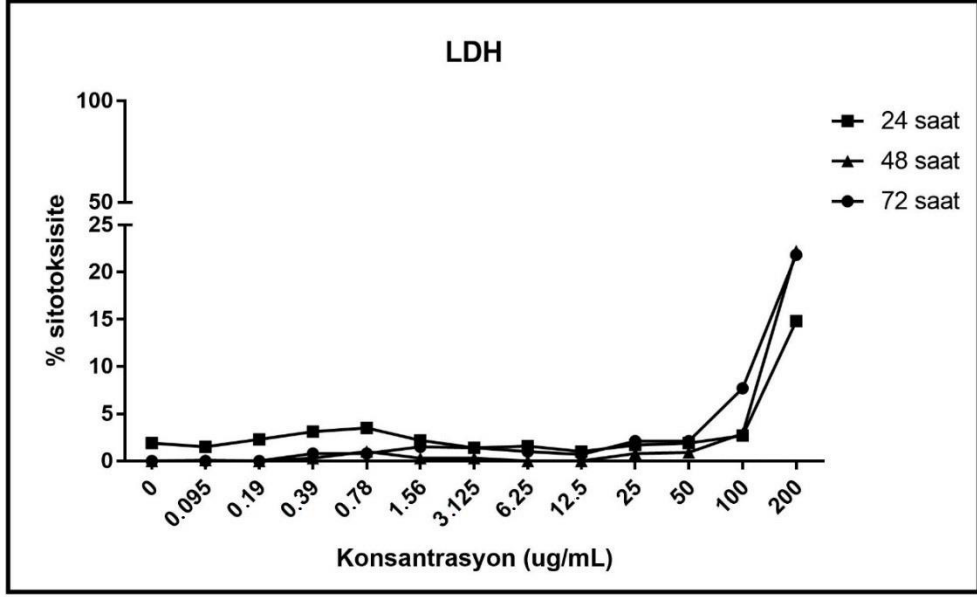
ve arkadaşları 2018 yılında A498 böbrek karsinom hücre hatlarında 24-72 saat süreli yapılan çalışmada da 5 µM SFN uygulamasının hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemiştir [105]. SFN'nin, domuz LLCPK1 böbrek tubüler hücrelerini nefrotoksiklere karşı koruması üzerine M. N.Guzman'ın yaptığı çalışmada 72 saat SFN muamelesinden sonra hücre ölümüne bağlı olarak formazan kristalleri mikroskopik olarak gözlenmiştir [106]. Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* kanser hücrelerinin progresif davranışlarının inhibisyonunu gösteren çalışmalarda kullanılan SFN konsantrasyonları hücre hatlarının çeşitliliğine ve süreye bağlı olarak değişmektedir [6].

Ayrıca çalışmamızda artan konsantrasyon ve süreyle beraber hücre ölümünün yanı sıra mikroskopik incelemelerde hücrelerde morfolojik değişimler de gözlenmiştir. Hsi Y. C. ve arkadaşlarının yaptığı insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinin 4-24 saat boyunca 20 µM SFN maruz kalmasıyla hücre morfolojilerinde değişiklikler meydana gelmiştir [107]. Aynı durum 24 saate kadar 10-40 µM SFN'ye maruz kalan U251MG glioblastoma hücrelerinde de gözlenmiştir [108]. J. M. P. De Oliveira ve arkadaşlarının normal koşullarda fibroblast yapısına benzer morfolojide bulunan osteosarkom MG-63 hücrelerinin SFN konsantrasyonunun artmasıyla ve zamana bağlı olarak hücreler yuvarlak morfolojik özellik göstermiştir [109].

4.2 LDH Sitotoksosite Deneyi Sonuçları

SFN'nin oluşturduğu hücre toksisitesi, laktat dehidrogenaz enzim varlığına bağlı olarak gerçekleştirilen LDH testi ile değerlendirildi. 769-P ve 293T hücrelerinin 96 kuyulu mikropalakalara hücre ekiminden sonra 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM, 1.56 µM, 0.78 µM, 0.39 µM, 0.19 µM, 0.095 µM SFN konsantrasyonları uygulandı. Maximum değer ölçümü için Lizis Buffer, spontan değer ölçümü için ise enjeksiyonluk ultra saf su eklenip absorbans değerleri 490/680 nm dalga boyunda ölçüldü. 24., 48. ve 72. saat deney grupları oluşturuldu. Her bir konsantrasyon için 3 tekrar oluşturularak LDH sitotoksosite deneyi gerçekleştirildi.

Elde edilen değerler belirtilmiş olan % sitotoksosite formülü ile hesaplandı. 769-P hücre hattı için LDH testinden elde edilen bulgularla artan SFN konsantrasyonuna bağlı olarak belirtilen dozlarda, doz-zaman bağımlı değişimi % sitotoksosite cinsinden grafik halinde gösterildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 769-P hücre hattı LDH sitotoksosite sonuçları (24., 48. ve 72. saat).

Bütün konsantrasyonlar için 24., 48. ve 72. saatlerde % sitotoksosite %25 'in altındadır. 24. saatte 200 μ M için %14.8, 48. saatte %22.2, 72. saatte ise %21.8 'dir.

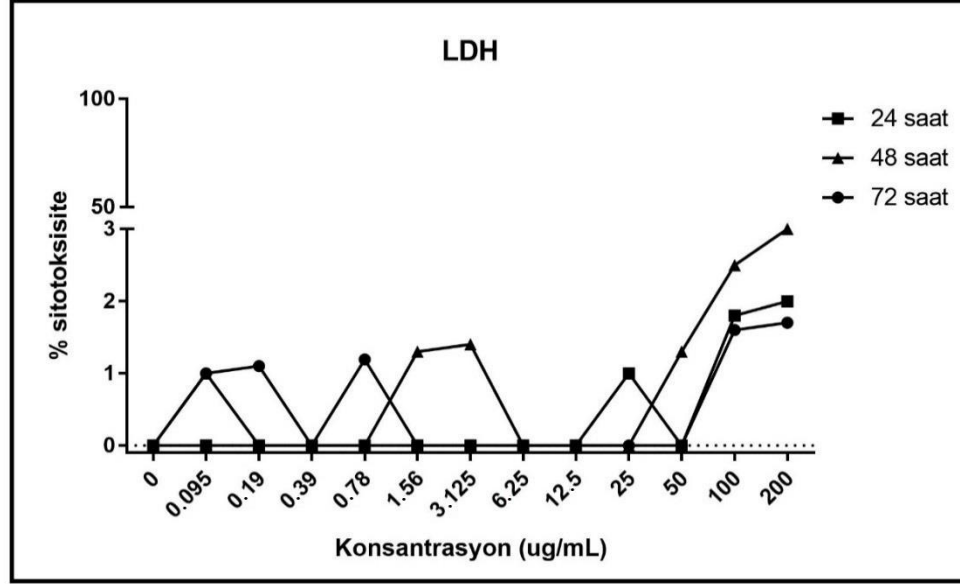
769-P hücre hattı için 24., 48. ve 72. saat LDH % sitotoksosite değerleri Tablo 4.5'te özetlenmiştir.

Tablo 4.5 769-P hücre hattı LDH % sitotoksosite değerleri.

Konsantrasyon(μ M)	24. saat	48. saat	72. saat
200	14.8	22.2	21.8
100	2.7	2.9	7.7
50	1.9	0.9	2.1
25	1.7	0.8	2.1
12.5	1	0	0.7
6.25	1.6	0	1
3.125	1.4	0.3	1.4
1.56	2.2	0.3	1.5
0.78	3.5	1	0.8
0.39	3.1	0.3	0.8
0.019	2.3	0	0
0.095	1.5	0.1	0
0	1.9	0	0

293T hücre hattında LDH testinden elde edilen bulgularla artan SFN konsantrasyonuna bağlı olarak belirtilen dozlarda, doz-zaman bağımlı değişimi % sitotoksosite cinsinden grafik halinde gösterildi (Şekil 4.6).

24., 48. ve 72. saat deney gruplarının tüm konsantrasyonları % sitotoksosite değeri %3'ün altındadır. Yalnızca 48. saat deney grubunun 200 μ M konsantrasyonu %3 olarak bulundu.



Şekil 4.6 293T hücre hattı LDH sitotoksosite sonuçları (24., 48. ve 72. saat).

293T hücre hattı için 24., 48. ve 72. saat LDH % sitotoksosite değerleri Tablo 4.6'da özetlenmiştir.

Tablo 4.6 293T hücre hattı LDH % sitotoksosite değerleri.

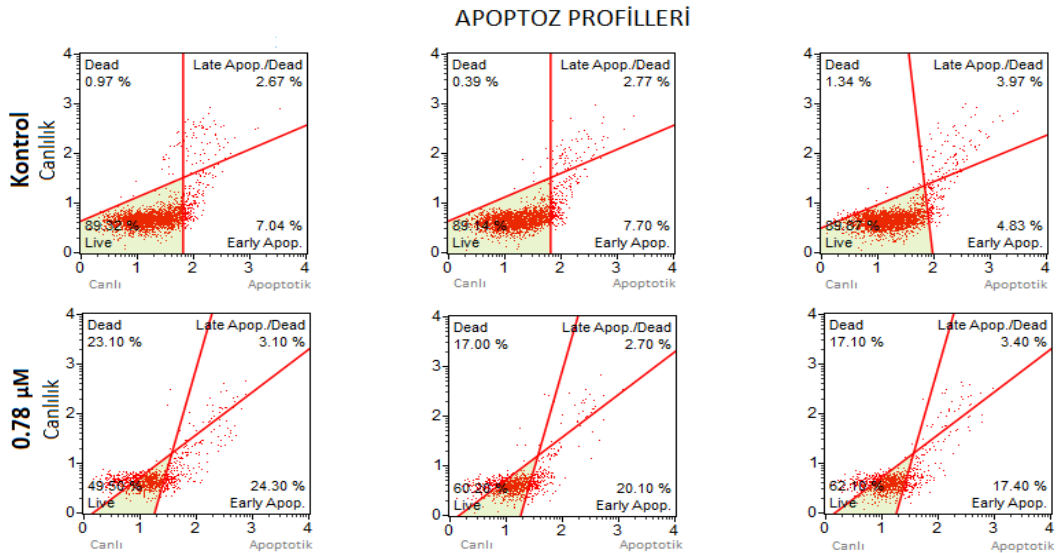
Konsantrasyon(μ M)	24. saat	48. saat	72. saat
200	2	3	1.7
100	1.8	2.5	1.6
50	0	1.3	0
25	1	0	0
12.5	0	0	0
6.25	0	0	0
3.125	0	1.4	0
1.56	0	1.3	0
0.78	0	0	1.1
0.39	0	0	0
0.019	0	0	1.1
0.095	0	1	1
0	0	0	0

MTT yöntemi ile elde ettiğimiz hücre canlılık verilerinin yanı sıra, hücre ölümünden dolayı kültür ortamına salınan LDH aktivitesi ile SFN'nin hücrelere göstermiş olduğu sitotoksik etki incelenmiştir. 769-P hücre hattı için en yüksek iki konsantrasyon olan 200 ve 100 μ M için hücre sitotoksitesini zamana bağlı olarak artmıştır, ancak en yüksek sitotoksik değer %25'in altındadır. 50 μ M ve azalan SFN dozları ile muamele

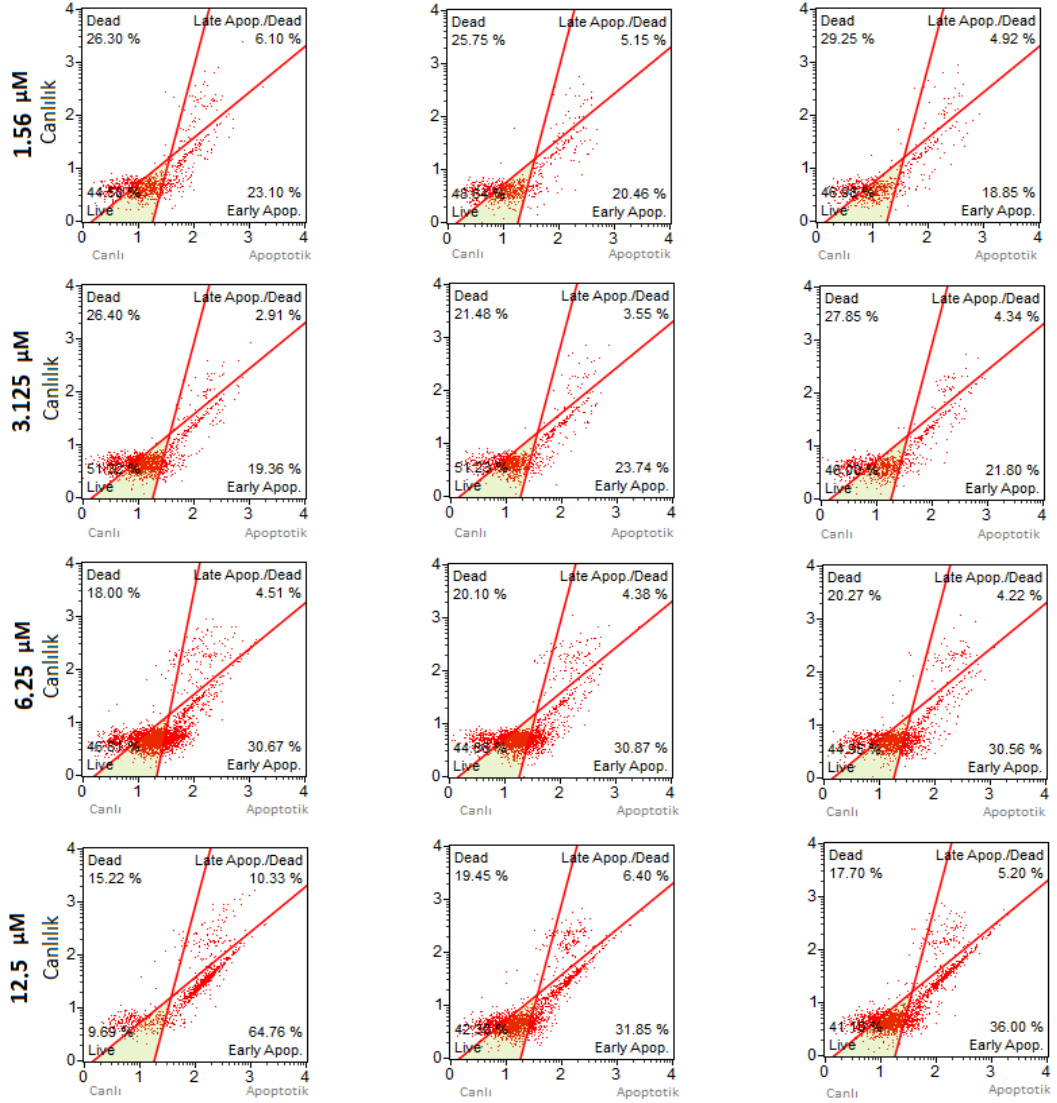
edildiklerinde önemli ölçüde azalmış olan LDH salgılanması ölçülmüştür. Bu konsantrasyonlarda SFN'nin hücre sitotoksitesi oldukça düşük değerlerdedir. Elde edilen değerlere göre 769-P için SFN'nin bir sitotoksik etkisinin olmadığı ifade edilebilir. 293T hücre hattında ise bütün konsantrasyonlarda % sitotoksite değeri % 5'in altındadır. En yüksek konsantrasyonlarda 200 ve 100 μM 'da MTT grafiklerinde (Şekil 4.1 ve Şekil 4.3) görüldüğü gibi azalan canlılığa uyumlu olarak artan LDH miktarıyla sitotoksite değerleri (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) gözlenmiştir. Nöral kök hücreler ile yapılan çalışmada 0,25 ila 10 μM arasında değişen konsantrasyonlarda beş gün boyunca SFN'ye maruz bırakılmıştır 10 μM 'de maksimum hücre ölümü gerçekleşmiş ve korele olarak LDH'nin ortama salınmasıyla maksimum değer ölçülmüştür [110].

4.3 Annexin V Deneyi Sonuçları

MTT ve LDH sonuçlarına göre seçilmiş olan 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.125 μM , 1.56 μM , 0.78 μM konsantrasyonlarının apoptotik etkisini belirleyebilmek için 769-P ve 293T hücre hatlarına Annexin V yöntemi uygulandı. 48 saatlik deney grubu oluşturuldu ve sonuçlar Muse® Cell Analyzer'da hücrelerin analizi yapıldı. 769-P hücre hattı Annexin V analiz sonuçları Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 769-P hücre hattı Annexin V sonuçları.



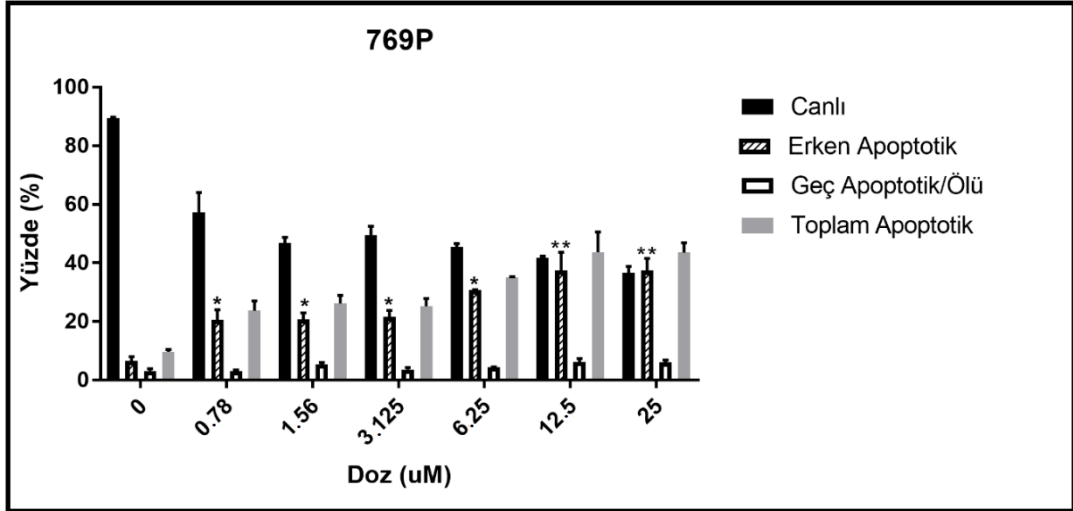
Şekil 4.7 (devam) 769-P hücre hattı Annexin V sonuçları.

769-P hücre hattı % erken apoptotik hücre sayısı ve % geç apoptotik hücre sayıları Tablo 4.7’de özetlenmiştir.

Tablo 4.7 769-P hücre hattı erken ve geç apoptotik hücre % değerleri.

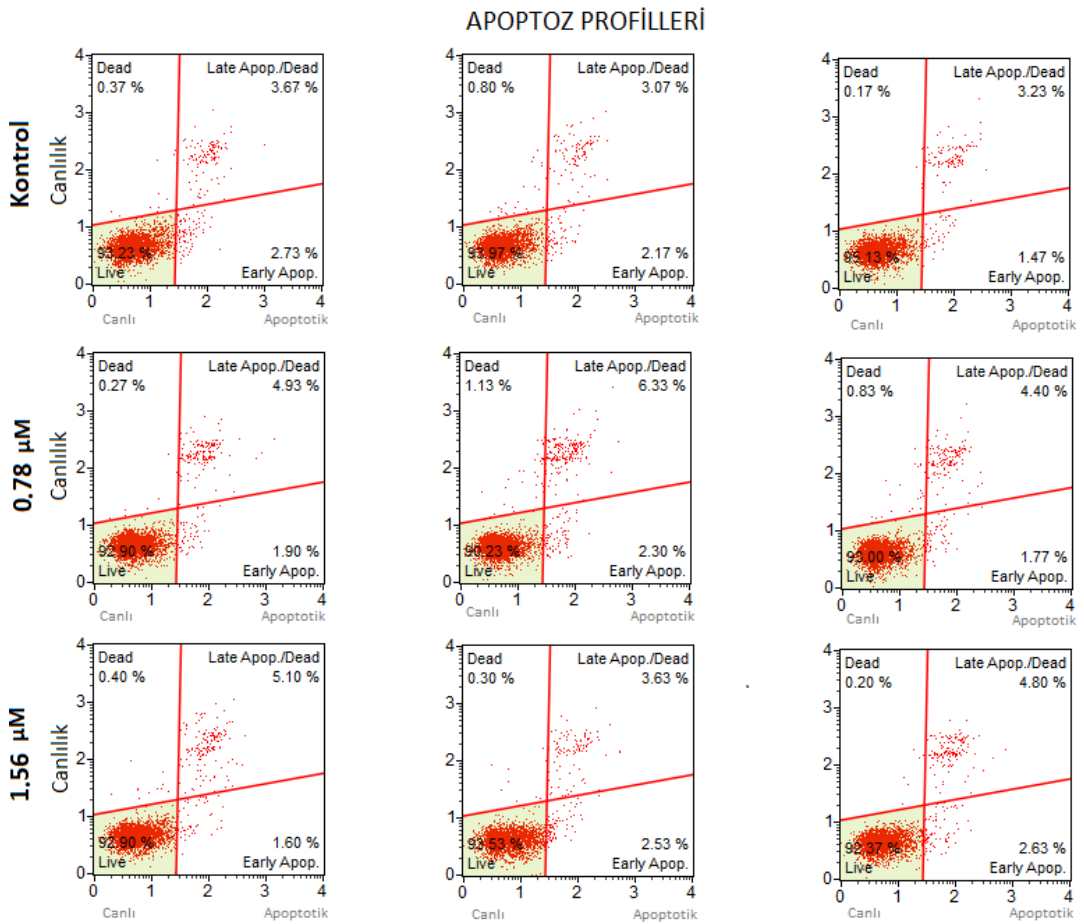
Konsantrasyon(μM)	% Erken apoptotik	% Geç apoptotik
Kontrol	6.52	3.13
0.78	20.6	3.06
1.56	20.8	5.39
3.125	21.63	3.6
6.25	30.7	4.37
12.5	44.2	7.2
25	37.4	6.11

Elde edilen sonuçlar artan SFN dozlarına karşı % cinsinden grafik halinde sunulmuştur (Şekil 4.8).

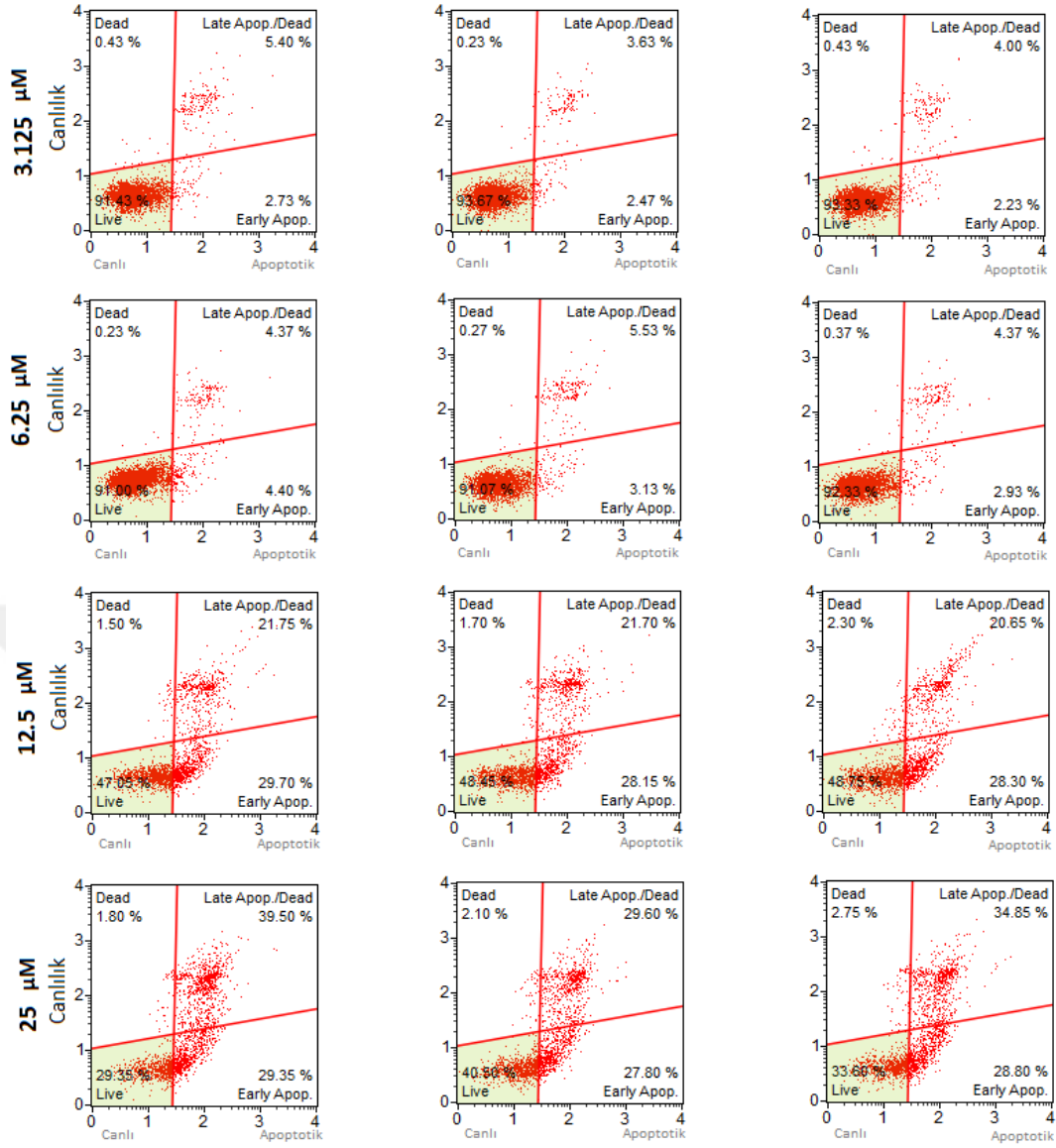


Şekil 4.8 769-P hücre hattı Annexin V yöntemi sonucunda canlı ve erken/geç apoptotik hücre % değerleri.

293T hücre hattı Annexin V analiz sonuçları Şekil 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 293T hücre hattı Annexin V sonuçları.



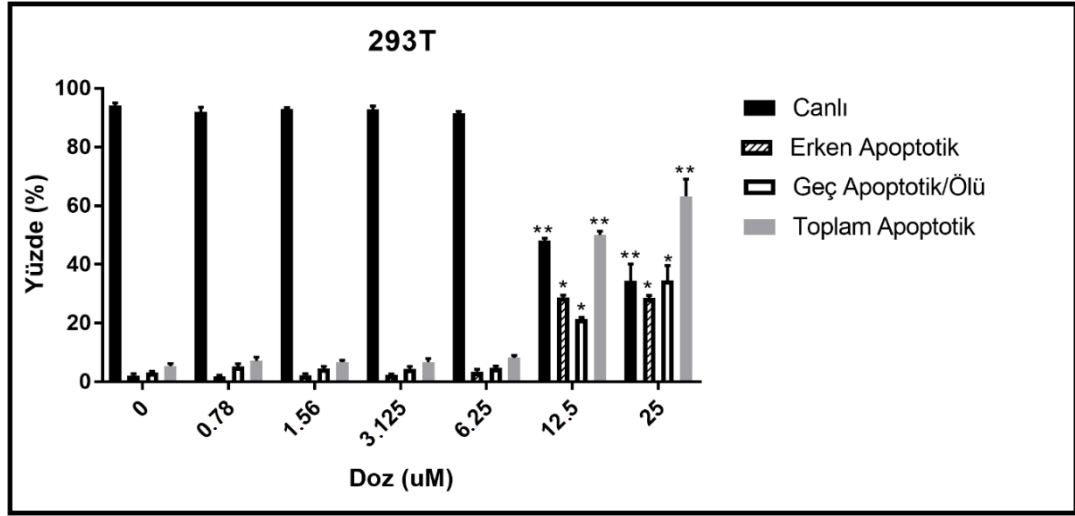
Şekil 4.9 (devam) 293T hücre hattı Annexin V sonuçları.

293T hücre hattı % erken apoptotik hücre sayısı ve % geç apoptotik hücre sayıları Tablo 4.8’de özetlenmiştir.

Tablo 4.8 293T hücre hattı erken ve geç apoptotik hücre % değerleri.

Konsantrasyon(µM)	% Erken apoptotik	% Geç apoptotik
Kontrol	2.12	3.32
0.78	1.99	5.22
1.56	2.25	4.51
3.125	2.47	4.34
6.25	3.48	4.75
12.5	28.7	21.3
25	28.65	34.65

Elde edilen sonuçlar artan SFN dozlarına karşı % cinsinden grafik halinde sunulmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 293T hücre hattı Annexin V yöntemi sonucunda canlı ve erken/geç apoptotik hücre % değerleri.

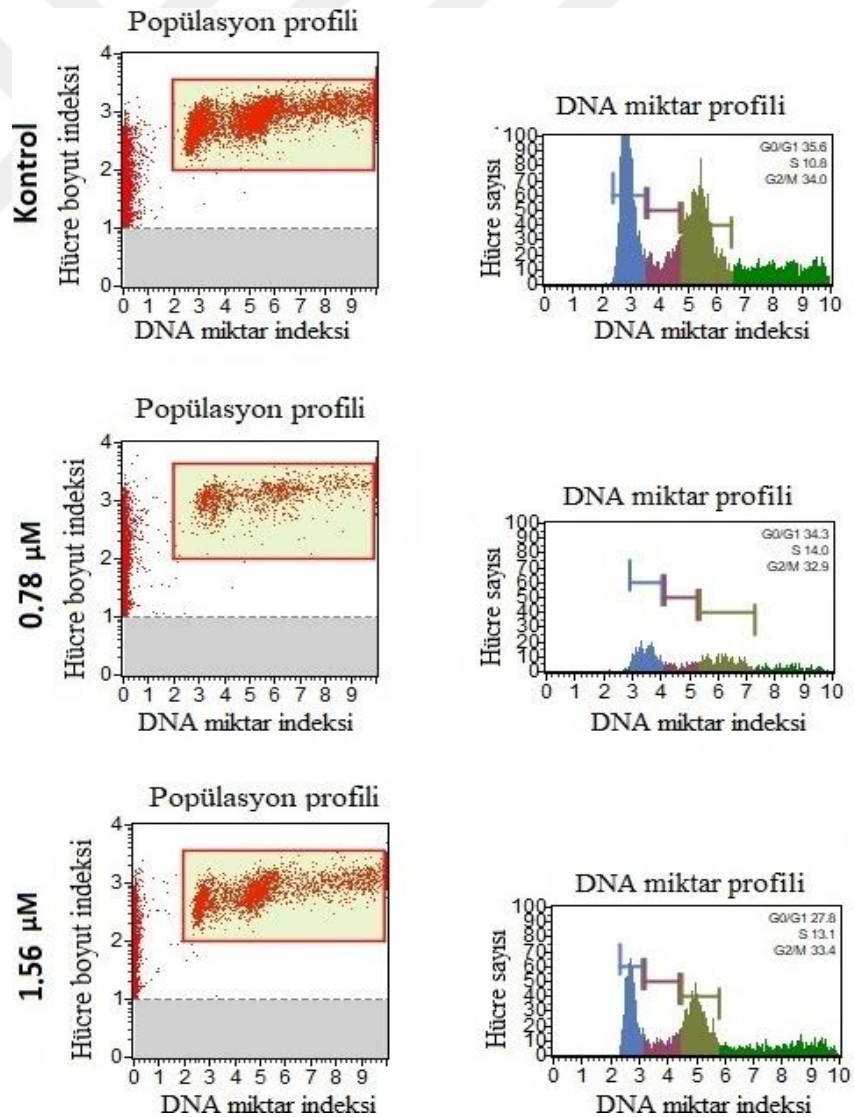
Çalışmamızda SFN ile indüklenen 769-P ve 293T hücrelerinin canlılığının inhibisyonunun apoptozun indüksiyonuna bağlı olup olmadığını belirlemek için, popülasyondaki apoptotik hücrelerin oranı Annexin V/7AAD yöntemiyle incelendi.

Her iki hücre hattında da % apoptoz oranı doza bağımlı bir şekilde artmıştır. 25 µM ve 12.5 µM SFN ile muamele edilen 293T hücre hattında apoptotik (erken ve geç) yanıt istatistiksel olarak $p < 0.001$ anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Azalan konsantrasyonlarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. 293T hücre hattında 25 µM ve 12.5 µM SFN hem apoptotik hem de nekrotik yanıt oluşturmuştur. 769-P hücre hattında tüm dozlarda erken apoptotik yanıt istatistiksel olarak $p = 0.001$ anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Azalan konsantrasyonlarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Canlılık paterni ve erken apoptotik yanıt birbirlerine zıttır ve canlılık paterninin azalmasıyla erken apoptotik hücre sayısında bir artış gözlenmiştir. 25 µM SFN ile muamele edilen 293T hücre hattında ortalama % erken apoptotik hücre yüzdesi %28.65 iken 769-P hücre hattında ise %37.4'dir. Aynı konsantrasyonla muamele edilen böbrek hücreli adenokarsinom hücrelerinin, sağlıklı epitel hücrelerinden erken apoptotik hücre sayısının daha fazla olması oluşturulan bu etkinin 769-P hücrelerinin daha duyarlı olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar, apoptoz için önemli bir marker olan erken apoptotik yanıtın 769-P hücrelerinde tüm SFN konsantrasyonlarında anlamlı olduğunu, 293T hücre hattında ise 25 µM ve 12.5 µM

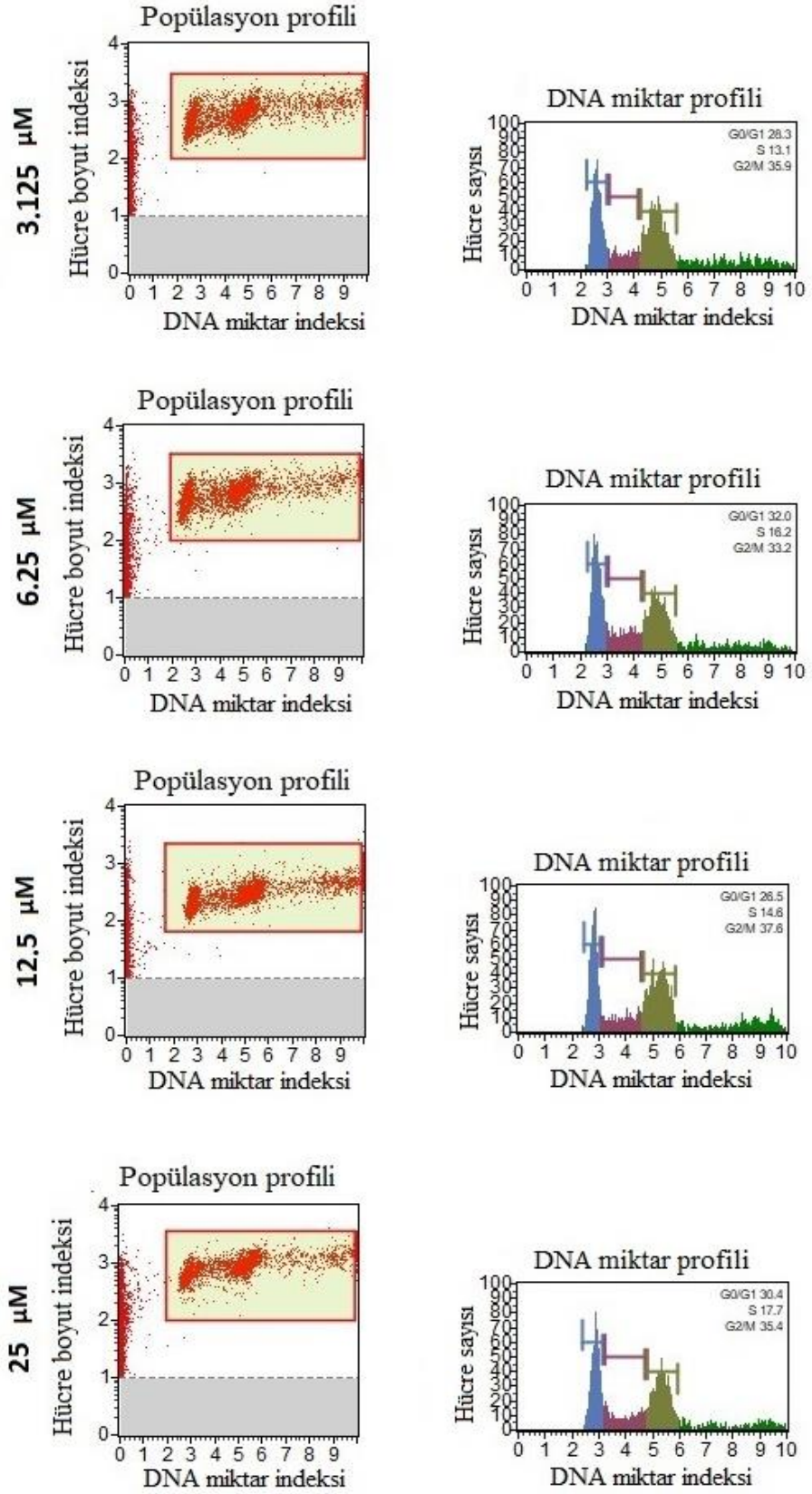
konsantrasyonlarında hem apoptotik hem de nekrotik yanıtı oluşturduğunu göstermiştir. MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında ve tümörjenik olmayan MCF10A hücre hattında 5 ve 20 μM SFN konsantrasyonlarında 72 saat muamelesi sonucu apoptozu indüklediği gösterilmiştir [111].

4.4 Hücre Döngüsü Analiz Sonuçları

25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.125 μM , 1.56 μM , 0.78 μM konsantrasyonlarının hücre döngüsü üzerinde olan etkisini belirleyebilmek için 769-P ve 293T hücre hatlarına Muse® Cell Cycle Kit protokolü uygulandı. Seçilen 6 konsantrasyon için 48 saatlik deney grubu oluşturuldu ve sonuçlar Muse® Cell Analyzer’da ölçüldü. 769-P hücresinin SFN’nin artan dozlarına göre popülasyonun hücre döngüsü evrelerinin yüzde dağılımı sonuçları Şekil 4.11 ‘de gösterilmiştir.



Şekil 4.11 769-P hücre hattı hücre döngüsü sonuçları.



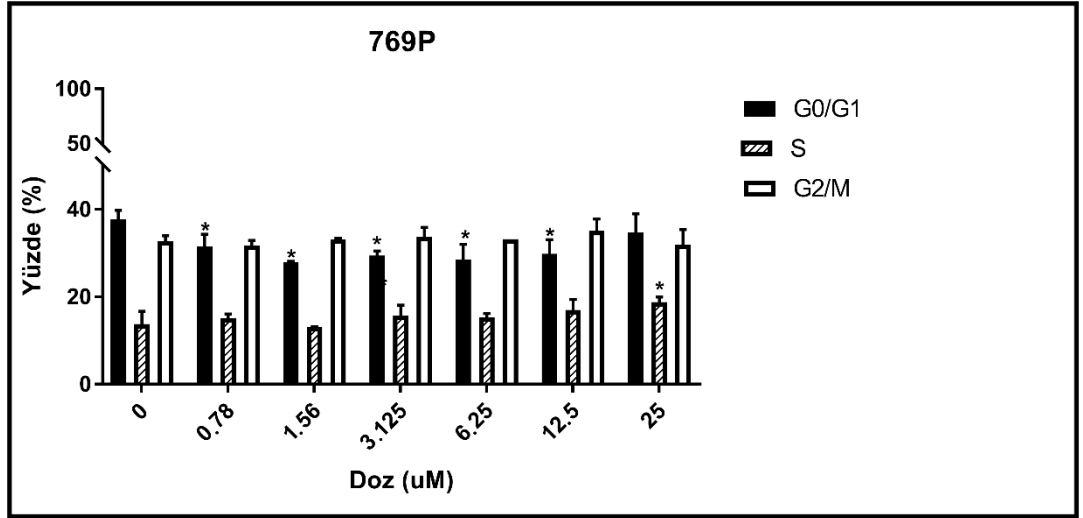
Şekil 4.11 (devam) 769-P hücre hattı hücre döngüsü sonuçları.

769-P hücre hattı %G0/G1 evresi hücre popülasyonu, %S evresi hücre popülasyonu ve %G2/M evresi hücre popülasyonu sonuçları Tablo 4.9’da özetlenmiştir.

Tablo 4.9 769-P hücre hattı hücre döngüsü (%) değerleri.

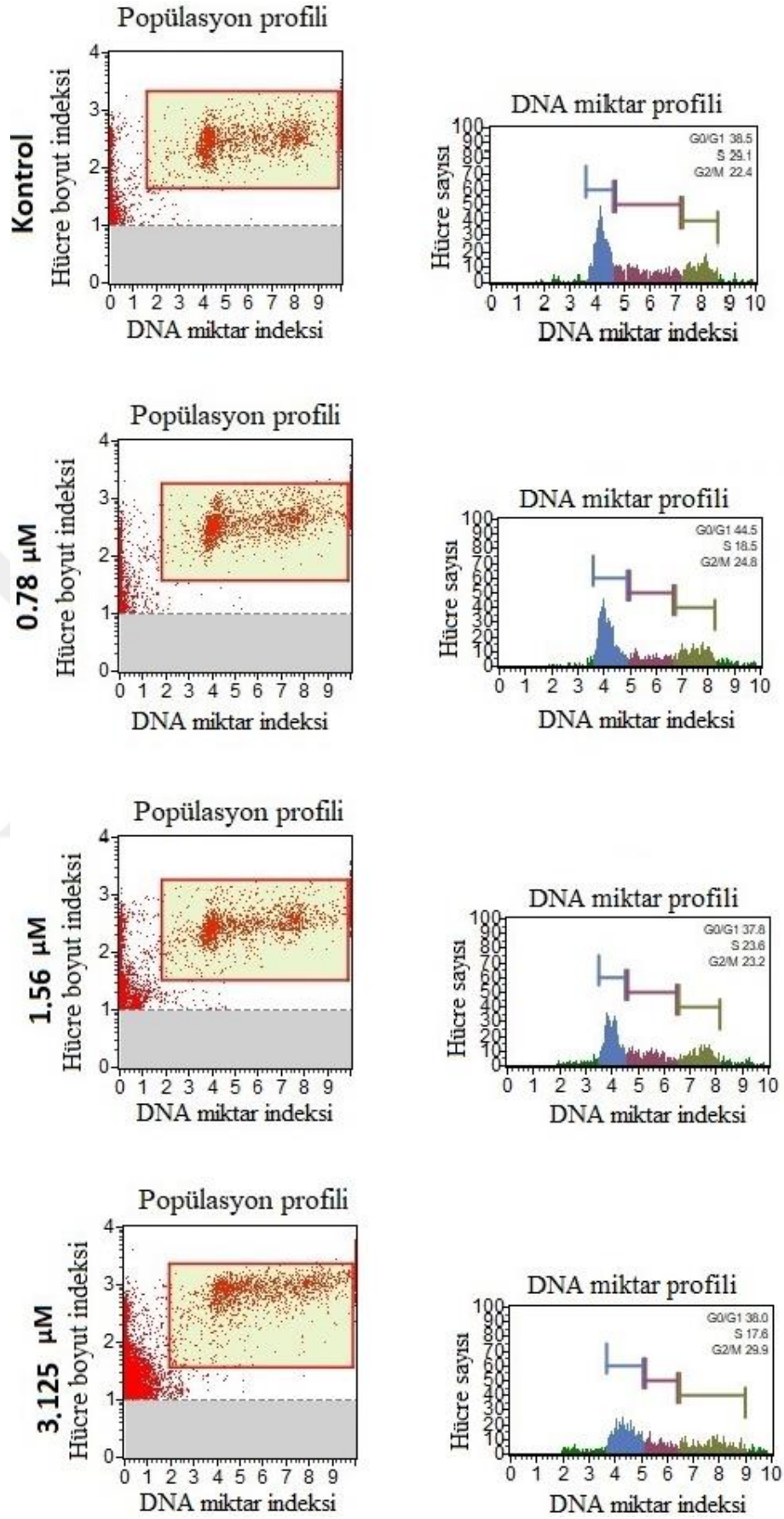
Hücre döngüsü (%)	Kontrol	0,78 μ M	1,56 μ M	3,125 μ M	6,25 μ M	12,5 μ M	25 μ M
G0/G1	35.6	34.3	27.8	28.3	32	26.5	30.4
S	10.8	14	13.1	13.1	15.9	14.6	17.7
G2/M	34	32.9	35.9	35.9	33.2	37.6	35.4

769-P hücresinin G0/G1, S ve G2/M evrelerinden elde edilen sonuçlar artan SFN dozlarına karşı % cinsinden grafik halinde sunulmuştur (Şekil 4.12).

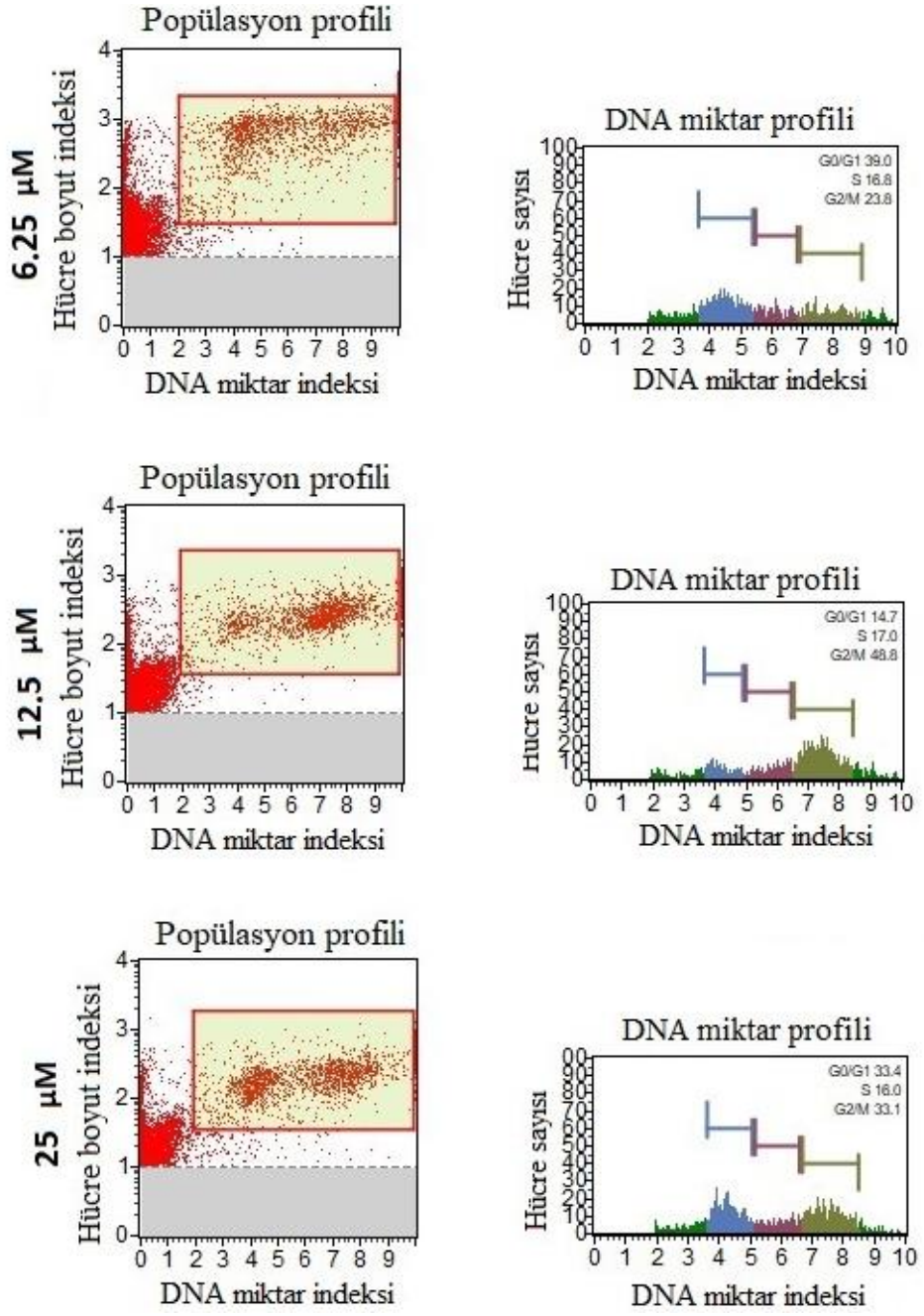


Şekil 4.12 769-P hücre hattı % G0/G1, S ve G2/M evreleri sonuçları.

293T hücresinin SFN'nin artan dozlarına göre popülasyonun hücre döngüsü evrelerinin yüzde dağılımı sonuçları Şekil 4.13 'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13 293T hücre hattı hücre döngüsü sonuçları.



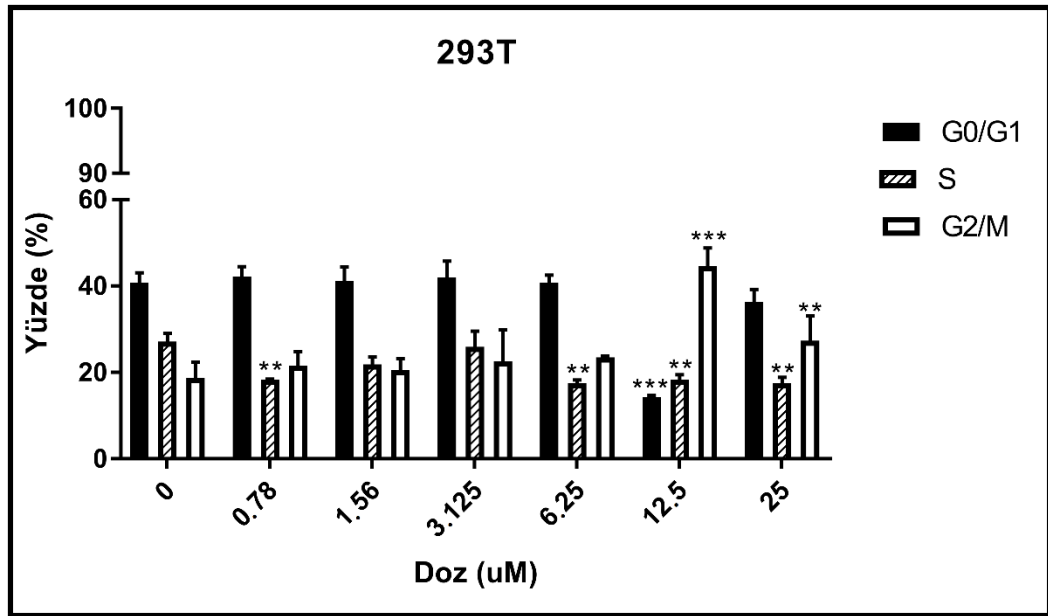
Şekil 4.13 (devam) 293T hücre hattı hücre döngüsü sonuçları.

293T hücre hattı %G0/G1 evresi hücre popülasyonu, %S evresi hücre popülasyonu ve %G2/M evresi hücre popülasyonu sonuçları Tablo 4.10'da özetlenmiştir.

Tablo 4.10 293T hücre hattı hücre döngüsü (%) değerleri.

Hücre döngüsü (%)	Kontrol	0,78 μ M	1,56 μ M	3,125 μ M	6,25 μ M	12,5 μ M	25 μ M
G0/G1	38.5	44.5	37.8	38	39	14.7	33.4
S	29.1	18.5	23.6	17.6	16.8	17	16
G2/M	22.4	24.8	23.2	29.9	23.8	48.8	33.1

293T hücresinin G0/G1, S ve G2/M döngülerinden elde edilen sonuçlar artan SFN dozlarına karşı % cinsinden grafik halinde sunulmuştur (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 293T hücre hattı % G0/G1, S ve G2/M evreleri sonuçları.

75 μ M konsantrasyonda SFN ile muamele edilen kolon kanseri Caco-2 hücrelerinde bax ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklediği ve G1/G2 hücre döngüsünü durdurduğu bildirilmiştir [112]. SFN'nin 15 μ M konsantrasyonunda ise HCT116 kolon kanseri hücrelerinde % 95'e kadar hücre proliferasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir. 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarında HCT116 hücrelerinde G1 evre hücre dağılımının azalması ve apoptozu indüklediği saptanmıştır [113].

DNA hasarına tepki olarak kontrol noktalarının aktivasyonu hücre döngüsü tutulmasına yol açtığı yaygın olarak kabul edilmektedir. Ancak ciddi hasar durumunda, hücre döngüsü durması apoptotik hücre ölümüne yol açar. SFN'nin etkileri bu model ile uyumludur.

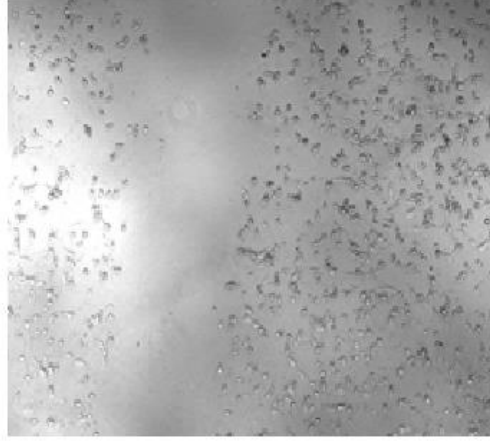
Çalışmamızda 769-P hücre hattında 25 µM konsantrasyonu hariç bütün konsantrasyonlarda G0/G1 evresinde 0. Konsantrasyona göre anlamlı bir şekilde hücre sayısında artma gözlenmiştir. 769-P hücre hattında G0/G1 evresinde bir arrest meydana gelmiştir. 293T hücre hattında kontrole göre 25 µM ve 12.5 µM konsantrasyonlarda anlamlı bir şekilde hücre sayısında G0/G1 evresinde azalma gözlenirken, buna bağlı olarak S evresinde anlamlı bir şekilde azalma gözlenmiştir. G2/M evresinde ise anlamlı bir şekilde hücre sayısında artış gözlenmiştir. G2/M evresindeki bu artış DNA miktarının fazlalığına bağlı olarak, hücrelerin nekroz sonucunda parçalanması ile ortaya çıkan DNA'lar ile ilişkilendirilebilir.

5 µM SFN maruziyeti ile Caki-1 ve A498 hücrelerinde hücre döngüsünün S evresinde hücre sayısını arttırdığı ve G0/G1 evresindeki hücre sayıları ise azalttığı gözlenmiştir. Caki1 hücreleri 20 µM SFN ile muamele edildiğinde hem S hem de G2/M evresinde hücre sayısının arttığı gözlenmiştir [105]. Osteosarkom hücreleri üzerinde yapılan deneyler, SFN'nin ≤10 µM konsantrasyonlarında bir G2/M evre bloğunu indüklediğini göstermiştir fakat >10 µM konsantrasyonlarında ise S ve G2/M evresinde döngüyü blokladığı gösterilmiştir [114].

4.5 Migrasyon Analiz Sonuçları

769-P hücrelerinin 24 kuyulu mikropalakalara ekiminden 1 gün sonra kuyulara paralel çizgiler oluşturuldu ve 3 farklı SFN konsantrasyonu uygulandı. Kontrol grubuna ise SFN içermeyen besiyeri eklendi. Kontrol ve SFN ile muamele edilmiş hücrelerin farklı zaman aralıklarındaki göçleri Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

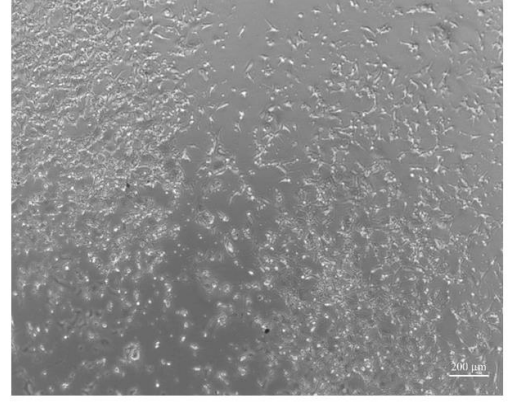
0. saat



24. saat

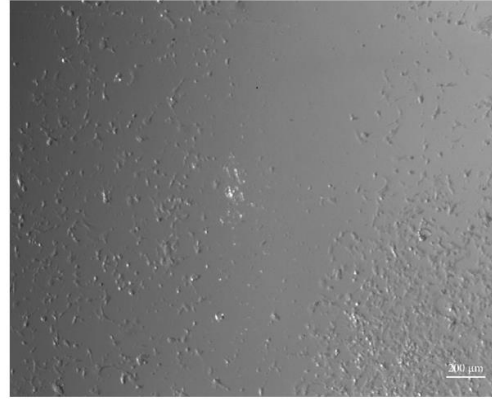


48. saat

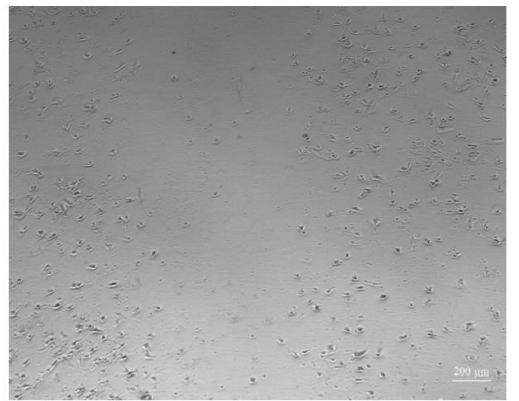


Kontrol

24. saat

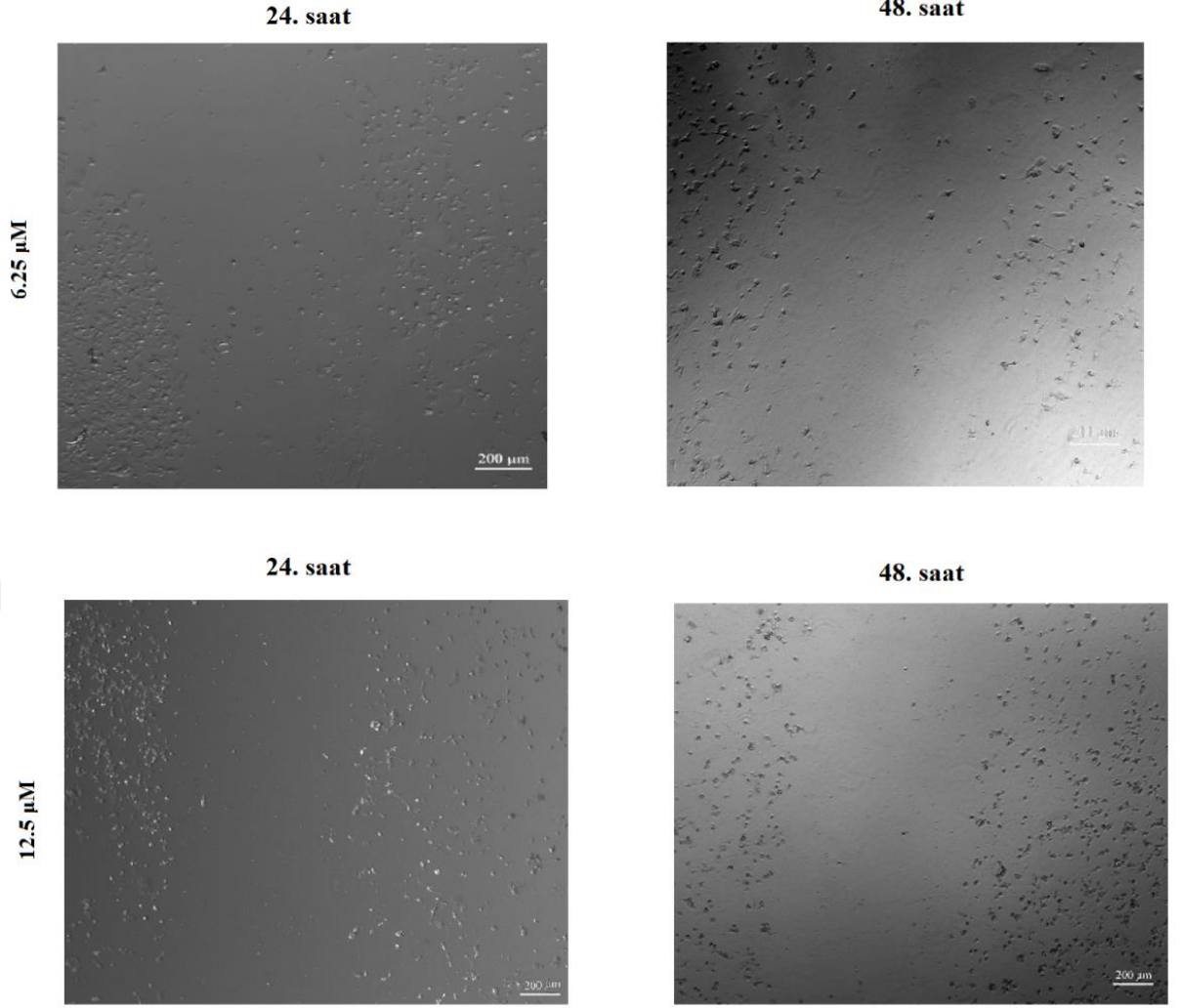


48. saat



3.125 µM

Şekil 4.15 Farklı zaman aralıklarında hücre göçü analizinin mikroskobik görüntüleri.



Şekil 4.15 (devam) Farklı zaman aralıklarında hücre göçü analizinin mikroskopik görüntüleri.

SFN ile 3 farklı konsantrasyon muamele ettiğimiz 769-P hücre hattında ise doza bağımlı bir şekilde hücre migrasyonu inhibe olmuştur. Kontrol grubunda 48. Saate kadar hücreler arasındaki mesafe neredeyse tamamlanmış ancak diğer gruplarda bulunan mesafede hiçbir değişim olmadığı gözlenmiştir. Konsantrasyon artışıyla beraber hücre ölümleri gerçekleşmiştir. İnsan mide kanseri hücresi (AGS) ile yapılan çalışmada en düşük konsantrasyon olan 1.5 μM 'da bile 24 saate kadar hücre migrasyonunun inhibe olduğu belirtilmiştir [115].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda beslenme ve kanser ilişkisi göz önüne alındığında, SFN mekanizma ve biyoaktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalar bu anlayışı desteklemektedir. Saf SFN vücuda alınamayacağından dolayı Turpgiller ve bu aileden olan brokoli, filizleri önemli SFN kaynağı olup insan sağlığında da bu takviyeyi yapabilen önemli besinlerdir. Çalışmamızda SFN'nin böbrek adenokarsinom kökenli 769-P ve böbrek epitel 293T hücre hatlarında apoptotik etkisinin olup olmadığını araştırdık. Bu etkiyi canlılık testleri, hücre proliferasyon testi ve hücre ölümlerinin belirlenmesini akım sitometri yöntemiyle gerçekleştirdik. SFN her iki böbrek hücre hattında doza bağımlı bir şekilde antiproliferatif ve apoptotik etki yaratmıştır.

SFN aracılığıyla apoptoza olan duyarlılık hücre döngüsü regülasyonu mekanizmalarına bağımlı olduğu için, doza bağımlı şekilde hücre döngüsünde aktif rol alan proteinler aynı zamanda hücre canlılığı ve oksidatif stresle arasındaki ilişki yolağın aydınlatılabilmesi için ilerleyen çalışmalarda incelenmelidir.

SFN'nin etkili ve güvenilir bir kemopreventif ajan olduğu birçok araştırmada kanıtlanmış olup, böbrek kanserinde de geleneksel tedavilere alternatif olabileceği ve böbrek kanseriyle mücadele de umut vaat etmektedir. Çalışmamız ile elde ettiğimiz veriler SFN'nin böbrek kanserindeki etkisinin ileride gerçekleşecek olan in vivo ve klinik çalışmalar için bir temel oluşturmaktadır. SFN terapötik dozları ile in vivo çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] **Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, RL., Torre LA. ve Jemal A.** (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6): p. 394-424.
- [2] **Moch, H., Humphrey, P.A., Ulbright, T.M. ve Reuter, V.E.** (2016). WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4. ed., International Agency for Research on Cancer (IARC).
- [3] **Jiang, X., Jiang, X., Liu, Y., Ma, L., Ji R., Qu, Y., Xin, Y. ve Lv, G.** (2018). Chemopreventive activity of sulforaphane. *Drug Des Devel Ther*, 12: p. 2905-2913.
- [4] **Gullett, N.P., Ruhul Amin, A.R., Bayraktar, S., Pezzuto, J.M., Shin, D.M., Khuri, F.R., Aggarwal, B.B., Surh, Y.J. ve Kucuk, O.** (2010). Cancer prevention with natural compounds. *Semin Oncol*, 37(3): p. 258-81.
- [5] **Cheung, K.L. ve Kong, A.N.** (2010). Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *AAPS J*. 12(1): p. 87-97.
- [6] **Fimognari, C. ve Hrelia, P.** (2007). Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutat Res*. 635(2-3): p. 90-104.
- [7] **Keck, A.S. ve Finley, J.W.** (2004). Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integr Cancer Ther*. 3(1): p. 5-12.
- [8] **Choi, S. ve Singh, S.V.** (2005). Bax and Bak are required for apoptosis induction by sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent. *Cancer Res*. 65(5): p. 2035-43.
- [9] **Elmore, S.** (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35(4): p. 495-516.
- [10] **Meng, X.W., Lee, S.H. ve Kaufmann, S.H.** (2006). Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept? *Curr Opin Cell Biol*. 18(6): p. 668-76.
- [11] **Sun, S.Y., Hail, N. Jr. ve Lotan, R.** (2004). Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst*, 96(9): p. 662-72.
- [12] **Juge, N., Mithen, R.F. ve Traka, M.** (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci*. 64(9): p. 1105-27.
- [13] **Gamet-Payraastre, L., Lumeau, S., Gasc N., Cassar G., Rollin P. ve Tulliez J.** (1998). Selective cytostatic and cytotoxic effects of glucosinolates hydrolysis products on human colon cancer cells in vitro. *Anticancer Drugs*. 9(2): p. 141-8.

- [14] **Chiao, J.W., Chung, F.L., Kancherla, R., Ahmed, T., Mittelman, A. ve Conaway, C.C.** (2002). Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 20(3): p. 631-6.
- [15] **Cho, S.D., Li, G., Hu, H., Jiang, C., Kang, K.S., Lee, Y.S., Kim, S.H. ve Lu, J.** (2005). Involvement of c-Jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by sulforaphane in DU145 prostate cancer cells. *Nutr Cancer.* 52(2): p. 213-24.
- [16] **Gingras D., Gendron, M., Boivin, D., Moghrabi, A., Théorêt, Y. ve Béliveau, R.** (2004). Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables. *Cancer Lett.* 203(1): p. 35-43.
- [17] **Karmakar, S., Weinberg, M.S., Banik, N.L., Patel, S.J. ve Ray, S.K.** (2006). Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells treated with sulforaphane. *Neuroscience.* 141(3): p. 1265-80.
- [18] **Singh, A.V., Xiao, D., Lew, K.L., Dhir, R. ve Singh, S.V.** (2004). Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis.* 25(1): p. 83-90.
- [19] **Siegel, R.L., Miller, K.D. ve Jemal, A.** (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 67(1): p. 7-30.
- [20] **Sverre, H. ve Mitelman, F.** (2015). *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells.* Wiley-Blackwell.
- [21] **Kotecha, R., Takami, A. ve Espinoza, J.L.** (2016). Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget.* 7(32): p. 52517-52529.
- [22] **Surh, Y.** (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res.* 428(1-2): p. 305-27.
- [23] **Demirelli, P.** (2003). *Kanserin Moleküler Genetik Temelleri. Güncel Klinik Onkoloji Sempozyum Dizisi.* 37: p. 9-15.
- [24] **Başaran, P.** (2003). *Tıbbi Genetik.* 8 ed. Nobel & Güneş Kitabevi.
- [25] **Geoffrey, M. Cooper ve Hausman, R.** (2006). *Hücre: Moleküler Yaklaşım.* 3 ed, ed. P.D.N.A. Prof. Dr. M. SAKIZLI. İzmir Tıp Kitabevi.
- [26] **Deininger, P.** (1999). Genetic instability in cancer: caretaker and gatekeeper genes. *Ochsner J.* 1(4): p. 206-9.
- [27] **Lodish, H., Berk, A., Lawrence Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D. ve Darnell, J.** (2000). *Molecular Cell Biology.* Vol. 4. W.H.Freeman.
- [28] **Rani Mol., P. ve Balan, A.** (2013). Oncogenes as Therapeutic Targets in Cancer: A Review. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences.* 5(2): p. 46-56.
- [29] **Peto, J.** (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *NATURE.* 411: p. 390-395.

- [30] **Stewart, Z.A., Westfall, M.D. ve Pietenpol, J.A.** (2003). Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 24(3): p. 139-45.
- [31] **Chen, C. ve Kong, A.N.** (2005). Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends Pharmacol Sci* 26(6): p. 318-26.
- [32] **Philchenkov, A.** (2004). Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med*8(4): p. 432-44.
- [33] **Edinger, A.L. ve Thompson, C.B.** (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 16(6): p. 663-9.
- [34] **Kumar, V.** (2004). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.*
- [35] **Hassan, M., Watari, H., Abu, Almaaty A., Ohba, Y. ve Sakuragi, N.** (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* p. 150845.
- [36] **Wong, R.S.** (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 30: p. 87.
- [37] **Mauria, A., O'Brien ve Rebecca, K.** (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.*18(6): p. 572-585.
- [38] **Anita, Sharma, H.P., Jain P. ve Amit, P.** (2014). Apoptosis (Programmed Cell Death) - A Review. *World Journal of Pharmaceutical Research.* 3(4): p. 1854-1872.
- [39] **Arınsay, T. ve Koçyiğit, İ.,** (2007). Böbrek Fiziopatolojisi, *Türk Nefroloji Derneği: Reaktif.*
- [40] **Floege, J., Johnson, R. ve Feehally, J.** (2010). *Comprehensive Clinical Nephrology.* 4 ed, ed. K. Dimock. Elsevier.
- [41] **Arthur, G. ve Hall, J.** (2007). *Medical Physiology.* 11 ed. The Body Fluids and Kidneys. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier.
- [42] **Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Rioux-Leclercq, N. ve Bex, A.** (2016). Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 27(suppl 5): p. v58-v68.
- [43] **Capitani, U. ve Montorsi, F.** (2016). Renal cancer. *Lancet* 387(10021): p. 894-906.
- [44] **Ljungberg, B., Bensalah, K., Canfield, S., Dabestani, S. ve Hofmann, F.** (2015). EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol.* 67(5): p. 913-24.
- [45] **Brufau, B.P., Cerqueda, C.S., Villalba, L.B., Izquierdo, R.S. ve González, B.M.** (2013). Metastatic renal cell carcinoma: radiologic findings and assessment of response to targeted antiangiogenic therapy by using multidetector CT. *Radiographics.* 33(6): p. 1691-716.
- [46] **Cairns, P.** (2010). Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark* 9(1-6): p. 461-73.

- [47] **Özveri, H.** (2015). Böbrek Kanserlerinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri: İnsidans Neden Giderek Artıyor? Kanser Gündemi. Türkiye Kanserle Savaş Vakfı.
- [48] **Hu, J., Mao, Y. ve White, K.** (2003). Overweight and obesity in adults and risk of renal cell carcinoma in Canada. *Soz Praventivmed* 48(3): p. 178-85.
- [49] **Murai, M. ve Oya, M.** (2004). Renal cell carcinoma: etiology, incidence and epidemiology. *Curr Opin Urol*.14(4): p. 229-33.
- [50] **McLaughlin, J.K., Lipworth, L. ve Tarone, R.E.** (2006). Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma. *Semin Oncol*. 33(5): p. 527-33.
- [51] **Carolyn, C., BYRD, D., Garcia-Aguilar, H. Kurtzman, J.S., Olawaiye, A. ve Washington, M.K.** (2013). *AJCC KANSER EVRELEME ATLASI*. 7 ed, ed. P.D.S. ERGÜNEY. Nobel Tip Kitabevleri.
- [52] **Klatte, T. ve Pantuck, A.J.** (2008). Molecular biology of renal cortical tumors. *Urol Clin North Am*. 35(4): p. 573-80; vi.
- [53] **Zambrano, N.R., Lubensky, I.A., Merino, M.J., Linehan, W.M. ve Walther, M.M.** (1999). Histopathology and molecular genetics of renal tumors toward unification of a classification system. *J Urol*. 162(4): p. 1246-58.
- [54] **Edge, S.B.** (2016). *AJCC Cancer Staging Manual*. 8 ed. American Joint Committee on Cancer.
- [55] **Baba, A.I. ve Catoi, C.** (2007). *Comparative Oncology*.
- [56] **Sanchez-Gastaldo, A., Kempf, E., González, Del Alba, A. ve Duran, I.** (2017). Systemic treatment of renal cell cancer: A comprehensive review. *Cancer Treat Rev*. 60: p. 77-89.
- [57] **Brodaczewska, K.K., Szczylik, C., Fiedorowicz, M., Porta, C. ve Czarnecka, A.M.** (2016). Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol Cancer*.15(1): p. 83.
- [58] **Singh, S.V. ve Singh, K.** (2012). Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research. *Carcinogenesis*. 33(10): p. 1833-42.
- [59] **Yalçın, A. S., Yılmaz, A.M., Altundağ, E.M. ve Koçtürk, S.** (2016). Kurkumin, Kuersetin ve Çay Kateşinlerinin Anti-Kanser Etkileri. *Marmara Pharmaceutical Journal* 21
- [60] **Wattenberg, L.W.** (1985). Chemoprevention of cancer. *Cancer Res*. 45(1): p.1-8.
- [61] **Surh, Y.J.** (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*. 3(10): p. 768-80.
- [62] **Sapienza, C. ve Issa, J.P.** (2016). Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. *Annu Rev Nutr*. 36: p. 665-81.
- [63] **Mayne, S.T., Playdon, M.C. ve Rock, C.L.** (2016). Diet, nutrition, and cancer: past, present and future. *Nat Rev Clin Oncol*. 13(8): p. 504-15.
- [64] **Braicu, C., Mehterov, N., Vladimirov, B., Sarafian, V., Nabavi, SM., Atanasov, A.G. ve Berindan-Neagoe, I.** (2017). Nutrigenomics in

cancer: Revisiting the effects of natural compounds. *Semin Cancer Biol.*46: p. 84-106.

- [65] **Liu, R.H.** (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 134(12 Suppl): p. 3479S-3485S.
- [66] **Dinkova-Kostova, A.T. ve Kostov, R.V.** (2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends Mol Med.* 18(6): p. 337-47.
- [67] **Herr, I. ve Buchler, M.W.** (2010). Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treat Rev.* 36(5): p. 377-83.
- [68] **Guerrero-Beltran, C.E., Calderón-Oliver, M., Pedraza-Chaverri, J. ve Chirino, Y.I.** (2012). Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp Toxicol Pathol.* 64(5): p. 503-8.
- [69] **Juengel, E., Erb, H.H., Haferkamp, A., Rutz, J., Chun, F.K. ve Blaheta, R.A.** (2018). Relevance of the natural HDAC inhibitor sulforaphane as a chemopreventive agent in urologic tumors. *Cancer Lett.* 435: p. 121-126.
- [70] **Vaughn, S. F. ve Berhow, M.A.** (2004). Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. Elsevier B.V.
- [71] **N. Tani, Ohtsuru, M. ve Hata, T.** (1974). Purification and general characteristics of bacterial myrosinase produced by *Enterobacter cloacae*. *Agricultural Biology and Chemistry.* 38(9): p. 1623-1630.
- [72] **Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. ve Talalay, P.** (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry.* 56(1): p. 5-51.
- [73] **Fimognari, C., Berti, F., Cantelli-Forti, G. ve Hrelia, P.** (2005). Effect of sulforaphane on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by four different mutagens. *Environ Mol Mutagen.* 46(4): p. 260-7.
- [74] **Fahey, J.W., Zhang, Y. ve Talalay, P.** (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA,* 94(19): p. 10367-72.
- [75] **Houghton, C.A., Fassett, R.G. ve Coombes, J.S.** (2016). Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxid Med Cell Longev.* p. 7857186.
- [76] **Sulforophane glucosinolate.** Monograph. (2010) *Altern Med Rev.* 15(4): p. 352-60.
- [77] **Clarke, J.D., Dashwood, R.H. ve Ho, E.** (2008). Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett.* 269(2): p. 291-304.
- [78] **Zappia, V., Panico, S., Russo, G.L., Budillon, A. ve Della Ragione, F.** (2014). *Advances in Nutrition and Cancer,* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- [79] **Tarozzi, A., Angeloni, C., Malaguti, M., Morroni, F., Hrelia, S. ve Hrelia, P.** (2013). Sulforaphane as a potential protective phytochemical against neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*, p. 415078.
- [80] **Fahey, J.W. ve Talalay, P.** (1999). Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol*, 37(9-10): p. 973-9.
- [81] **De Figueiredo, S.M., Binda, N.S., Nogueira-Machado, J.A., Vieira-Filho, S.A. ve Caligiorne, R.B.** (2015). The antioxidant properties of organosulfur compounds (sulforaphane). *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 9(1): p. 24-39.
- [82] **Myzak, M.C., Karplus, P.A., Chung, F.L. ve Dashwood, R.H.** (2004). A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase. *Cancer Res*. 64(16): p. 5767-74.
- [83] **Xu, T., Ren, D., Sun, X. ve Yang, G.** (2012). Dual roles of sulforaphane in cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem*. 12(9): p. 1132-42.
- [84] **Russo, M., Spagnuolo, C., Russo, G.L., Skalicka-Woźniak, K., Daglia, M. ve Sobarzo-Sánchez, E.** (2018). Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 58(8): p. 1391-1405.
- [85] **Zhang, Y. ve Tang, L.** (2007). Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical. *Acta Pharmacol Sin*. 28(9): p. 1343-54.
- [86] **Singh, S.V., Herman-Antosiewicz, A., Singh, A.V., Lew, K.L., Srivastava, S.K., Kamath, R., Brown, K.D., Zhang, L. ve Baskaran, R.** (2004). Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J Biol Chem*. 279(24): p. 25813-22.
- [87] **Gamet-Payrastre, L.** (2006). Signaling pathways and intracellular targets of sulforaphane mediating cell cycle arrest and apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets*6(2): p. 135-45.
- [88] **Parnaud, G., Li, P., Cassar, G., Rouimi, P., Tulliez, J., Combaret, L. ve Gamet-Payrastre, L.** (2004). Mechanism of sulforaphane-induced cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Nutr Cancer* 48(2): p. 198-206.
- [89] **Tang, L. ve Zhang, Y.** (2004). Dietary isothiocyanates inhibit the growth of human bladder carcinoma cells. *J Nutr*. 134(8): p. 2004-10.
- [90] **Wang, L., Liu, D., Ahmed, T., Chung, F.L., Conaway, C. ve Chiao, J.W.** (2004). Targeting cell cycle machinery as a molecular mechanism of sulforaphane in prostate cancer prevention. *Int J Oncol*. 24(1): p. 187-92.
- [91] **Chang, C.C., Hung, C.M., Yang, Y.R., Lee, M.J. ve Hsu, Y.C.** (2013). Sulforaphane induced cell cycle arrest in the G2/M phase via the blockade of cyclin B1/CDC2 in human ovarian cancer cells. *J Ovarian Res*. 6(1): p. 41.

- [92] Jackson, S.J. ve Singletary, K.W. (2004). Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis*. 25(2): p. 219-27.
- [93] Jackson, S.J. ve Singletary, K.W. (2004). Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J Nutr*. 134(9): p. 2229-36.
- [94] Shankar, S., Ganapathy S. ve Srivastava, R.K. (2008). Sulforaphane enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer orthotopic model through regulation of apoptosis, metastasis, and angiogenesis. *Clin Cancer Res*.14(21): p. 6855-66.
- [95] Matsui, T.A., Sowa, Y., Yoshida, T., Murata, H., Horinaka, M. ve Wakada, M. (2006). Sulforaphane enhances TRAIL-induced apoptosis through the induction of DR5 expression in human osteosarcoma cells. *Carcinogenesis*. 27(9): p. 1768-77.
- [96] Fimognari, C., Sangiorgi, L., Capponcelli, S., Nüsse, M. ve Fontanesi, S. (2005). A mutated p53 status did not prevent the induction of apoptosis by sulforaphane, a promising anti-cancer drug. *Invest New Drugs*. 23(3): p. 195-203.
- [97] Shen, G., Xu, C., Chen, C., Hebbar, V. ve Kong, A.N. (2006). p53-independent G1 cell cycle arrest of human colon carcinoma cells HT-29 by sulforaphane is associated with induction of p21CIP1 and inhibition of expression of cyclin D1. *Cancer Chemother Pharmacol*.57(3): p. 317-27.
- [98] Riss, T.L., Moravec, A.R., Niles A.L., Duellman S., ve Benink, H.A. (2004). Cell Viability Assays, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, et al., Editors. Bethesda (MD).
- [99] Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksitate Testleri, Harran Üniversitesi Vet. Fak. Derg. p. 112-118.
- [100] Kaja, S., Payne A.J., Singh, T., Ghuman, J.K., Sieck, E.G. ve Koulen, P. (2015). An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 73: p. 1-6.
- [101] Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. ve Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 184(1): p. 39-51.
- [102] Lecoeur, H., Ledru, E., Prévost, M.C. ve Gougeon, M.L. (1997). Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods*. 209(2): p. 111-23.
- [103] Archana, M., Bastian, Yogesh, T.L. ve Kumaraswamy, K.L. (2013). Various methods available for detection of apoptotic cells--a review. *Indian J Cancer*. 50(3): p. 274-83.

- [104] **Lan, H., Yuan, H. ve Lin, C.** (2017). Sulforaphane induces p53deficient SW480 cell apoptosis via the ROS-MAPK signaling pathway. *Mol Med Rep.* 16(5): p. 7796-7804.
- [105] **Rutz, J., Juengel E., Euler S., Maxeiner, S., Justin, S., Roos, F., Chun, F.K. ve Blaheta, R.A.** (2018). Chronic Sulforaphane Application Does Not Induce Resistance in Renal Cell Carcinoma Cells. *Anticancer Res.* 38(11): p. 6201-6207.
- [106] **Negrette-Guzman, M., Huerta-Yepe, S., Vega, M.I., León-Contreras, J.C. ve Hernández-Pando, R.** (2017). Sulforaphane induces differential modulation of mitochondrial biogenesis and dynamics in normal cells and tumor cells. *Food Chem Toxicol.* 100: p. 90-102.
- [107] **Hsu, Y.C., Chang, S.J., Wang, M.Y., Chen, Y.L. ve Huang, T.Y.** (2013). Growth inhibition and apoptosis of neuroblastoma cells through ROS-independent MEK/ERK activation by sulforaphane. *Cell Biochem Biophys.* 66(3): p. 765-74.
- [108] **Zhang, Z., Li, C., Shang, L., Zhang, Y., Zou, R., Zhan, Y. ve Bi, B.** (2016). Sulforaphane induces apoptosis and inhibits invasion in U251MG glioblastoma cells. *Springerplus.* 5: p. 235.
- [109] **Ferreira de Oliveira, J.M., Remédios, C., Oliveira, H., Pinto, P., Pinho, F., Pinho, S., Costa, M. ve Santos, C.** (2014). Sulforaphane induces DNA damage and mitotic abnormalities in human osteosarcoma MG-63 cells: correlation with cell cycle arrest and apoptosis. *Nutr Cancer.* 66(2): p. 325-34.
- [110] **Han, Z., Xu, Q., Li, C. ve Zhao, H.** (2017). Effects of sulforaphane on neural stem cell proliferation and differentiation. *Genesis* 55(3).
- [111] **Licznarska, B., Szafer, H., Matuszak, I., Murias, M. ve Baer-Dubowska, W.** (2015). *Modulating potential of L-sulforaphane in the expression of cytochrome p450 to identify potential targets for breast cancer chemoprevention and therapy using breast cell lines.* *Phytother Res.* 29(1): p. 93-9.
- [112] **Wang, M., Szafer, H., Matuszak, I., Murias, M. ve Baer-Dubowska, W.** (2012). Effects of phytochemicals sulforaphane on uridine diphosphate-glucuronosyltransferase expression as well as cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Chin J Physiol*, 55(2): p. 134-44.
- [113] **Zeng, H., Trujillo, O.N., Moyer, M.P. ve Botnen, J.H.** (2011). Prolonged sulforaphane treatment activates survival signaling in nontumorigenic NCM460 colon cells but apoptotic signaling in tumorigenic HCT116 colon cells. *Nutr Cancer*, 63(2): p. 248-55.
- [114] **Liu, K.C., Shih, T.Y., Kuo, C.L., Ma, Y.S., Yang, J.L. ve Wu, P.P.** (2016). Sulforaphane Induces Cell Death Through G2/M Phase Arrest and Triggers Apoptosis in HCT 116 Human Colon Cancer Cells. *Am J Chin Med*, 44(6): p. 1289-1310.

- [115] **Mondal, A., Biswas, R., Rhee, Y.H., Kim, J. ve Ahn, J.C.** (2016). Sulforaphene promotes Bax/Bcl2, MAPK-dependent human gastric cancer AGS cells apoptosis and inhibits migration via EGFR, p-ERK1/2 down-regulation. *Gen Physiol Biophys*, 35(1): p. 25-34.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Güzin Gökay
Doğum Tarihi ve Yeri : 31.07.1993/İstanbul
E-posta : gzngky.93@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015,Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,Moleküler Biyoloji ve Genetik

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2016-2017 yılları arasında Avis İlaç San. ve Tic. A.Ş' de mikrobiyoloji laboratuvarında analist olarak çalıştı.

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Gökay G., Göncü B., Atasoy S., Temel B., Dağ A.,**2018. Sülfurafanın İnsan Böbrek Kanseri Hücre Hattında Apoptotik Etkisi, II. International Symposium On Multidisciplinary Academic Studies,2018,İstanbul, Türkiye (Poster sunumu)