

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ARONİA MELANOCARPA UYGULAMASININ
EPİTELİYAL OVARYUM KANSERİ HÜCRE HATTI SKOV-3 ÜZERİNE
İMMÜNOSİTOKİMYASAL VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

SİNEM KARA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ.DR. SELEN BAHÇECİ

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2018-TYL-SABE-0065 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

2018-İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı** Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13 / 12 / 2018

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selen BAHÇECİ İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Meltem KURUŞ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Işıl TEKMEN Dokuz Eylül Üniversitesi

ONAY : Bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet KOYU

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o **Tezimin 01/01/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)**

10/12/2018

Sinem KARA

ETİK BEYAN

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sinem KARA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, bana yalnızca bir danışman olarak değil aynı zamanda bir anne şefkati ile yaklaşan, değerli bilgilerini benimle paylaşan, saygıdeğer danışmanım; Doç. Dr. Selen BAHÇECİ'ye, eğitimim süresince bir öğrenci ve aynı zamanda beni bir akademisyen aday olarak yetiştirmeye çalışan Prof. Dr. Meltem KURUŞ'a, eğitimimde deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Fatma ŞİMŞEK'e, üniversitemiz bünyesinde bulunan hücre kültürü laboratuvarında yapılan çalışmalarda ve psikolojik destek sağlayarak bana çok değerli katkılarda bulunan Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN'a, tez çalışmalarında kullanılan SKOV-3 ovaryum kanser hücre hattını tarafıma hediye eden Medipol Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi bünyesinde çalışan Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM'e, tez süresince yapılan deneylerde yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Erdi KESELİK, tekniker Serdar TUTUCU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisansına yeni başlayan arkadaşlarım Müge SARICAOĞLU ve Ayşe SARI'ya da teşekkür ederim.

Ayrıca, tez çalışmalarım sırasında maddi destek sağlayan İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne en içten dileklerle teşekkür ederim.

Son olarak, yüksek lisans eğitimim süresince bana maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Murat KARA'ya, annem Semra ÇOBANOĞLU, babam Süleyman ÇOBANOĞLU ve kardeşim Vesile Nur ÇOBANOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim. Son olarak bu tezi henüz doğmamış bebeğim 34 haftalık Defne Elif KARA'ya ithaf ediyorum.

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2018-TYL-SABE-0065 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Sinem KARA

Sinem KARA

**ARONIA MELANOCARPA UYGULAMASININ EPİTELİYAL OVARYUM
KANSERİ HÜCRE HATTI SKOV-3 ÜZERİNE İMMÜNOSİTOKİMYASAL
VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

(Yüksek Lisans Tezi)

İzmir, 2018

ÖZET

Ovaryum kanseri, ölümcül jinekolojik kanser türleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Mevcut kemoterapötik yöntemler hastaların çoğunda yetersiz kaldığından yeni tedavi seçenekleri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Paklitaksel ovaryum kanseri de dâhil olmak üzere birçok kanser türleri için kematerapik bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Paklitaksel'in kanser hücrelerini apoptozise yönlendirerek kanseri yok etmede kullanıldığı bilinmektedir. Çoğu kanser türleri gibi ovaryum kanseri de, başlangıçta bu kemoterapik ilaca yanıt verirken, uzun vadede, ilaç direnci gelişir ve tedavide başarısız olunur. İlaç direncini baskılayabilmek için kemoterapötik ilaçları ile birlikte antioksidanlar da tedavi için önerilmiştir. Aronia Melanocarpa, antosiyanin içeriği yüksek olan bir bitki olup, çeşitli çalışmalarla anti-tümör etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, *Aronia Melanocarpa*'nın epitelial ovaryum kanseri olan SKOV-3 hücre hattına etkilerinin in vitro yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonları 400 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml,

10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml şeklinde ve 24 saat, 48 saat ve 72 saat aralıklarla uygulanmıştır. *Aronia Melanocarpa*'nın SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerine sitotoksik etkilerini saptamak amacıyla MTT testi ile etkin olan 5 doz seçilerek apoptozis üzerine etkileri TUNEL yöntemiyle araştırılmıştır. Bu etken maddenin tümör hücrelerindeki PI3K, mTOR, p 38 MAPK sinyal yolağı üzerinden olan etkisi immünohistokimyasal (ICC) yöntemle belirlenmiştir. *Aronia Melanocarpa*'nın MTT, ICC ve TUNEL testi ile 5 doz içerisinde en etkin olanı belirlenerek, paklitaksel ile kombinasyon şeklinde uygulama yapıldıktan sonra TUNEL ve immünohistokimyasal testler uygulanmıştır. Bu çalışmada güçlü antioksidan ve antosiyanin içeriğı olan *Aronia Melanocarpa* ile paklitakselin kombinasyonunun etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Sonuçlar ANOVA istatistik testleri ve Graphpad yazılım programı ile değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Over Kanseri, SKOV-3 hücre hattı, *Aronia Melanocarpa*, Hücre Kültürü

Sinem KARA

**INVESTIGATION OF IMMUNOCYTOCHEMICAL AND APOPTOTİK
EFFECTS OF *ARONIA MELANOCARPA* APPLICATION ON EPITHELIAL
OVARIAN CANCER CELL LINE SKOV-3**

**İZMİR KÂTİP ÇELEBİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
HISTOLOGY AND EMBRIOLOGY MASTER PROGRAM**

(Master Thesis)

İzmir, 2018

ABSTRACT

Ovarian cancer is at the top of the list of deadly gynecological cancers. Since chemotherapeutic methods are insufficient in the most of patients, new treatment options are being studied. Paclitaxel is used as a chemotherapeutic drug for many types of cancer, including ovarian cancer. Paclitaxel is known to be used to destroy cancer by directing cancer cells to apoptosis. As with most cancer types, ovarian cancer responds to this chemotherapeutic drug initially, while in the long term, drug resistance develops and treatment fails. In order to suppress the drug resistance, antioxidants and chemotherapeutic drugs have been proposed for treatment. Aronia Melanocarpa is a plant with high anthocyanin content and has been shown to have anti-tumor effects in various studies. The aim of this study is to investigate the effects of *Aronia Melanocarpa* on epithelial ovarian cancer SKOV-3 cell line by in vitro methods. *Aronia Melanocarpa* concentrations is selected as 400 µg / ml, 300 µg / ml, 200 µg / ml, 150 µg / ml, 100 µg / ml, 75 µg / ml, 50 µg / ml, 25 µg / ml, / ml, 1 µg / ml and supplied by 24 hours, 48 hours and 72 hours. In order to determine the cytotoxic effects of *Aronia Melanocarpa* on SKOV-3 ovarian cancer cells, 5 effective doses are selected by MTT test and effects on apoptosis are investigated by

TUNEL method. The effect of this active substance on PI3K, mTOR, p38 MAPK signalling pathways in tumor cells is determined via immunocytochemical (ICC) methods. With the results of MTT, ICC and TUNEL tests of *Aronia Melanocarpa*, the most effective dose in 5 doses is determined and TUNEL and immunocytochemical tests are applied after combination with paclitaxel. In this study, it is aimed to investigate the effect of the combination of *Aronia Melanocarpa* and paclitaxel, which are strong antioxidants and anthocyanins. The results are interpreted with ANOVA statistical tests and Graphpad software program.

Keywords: Over Cancer, SKOV-3 cell line, *Aronia Melanocarpa*, Cell Culture



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Genital Sistem Gelişimi	4
2.1.1. Gonadlar.....	4
2.2. Ovaryum Embriyolojisi.....	5
2.2.1. Oogenezis.....	5
2.3. Ovaryum Anatomisi.....	8
2.3.1. Dış Yapısı.....	9
2.3.2. Ovariumu Sabitleyen Yapılar.....	9
2.3.3. Ovaryumun Damar ve Sinirleri.....	10
2.4. Ovaryum Histolojisi.....	10
2.4.1. Ovaryum Folikülleri.....	11
2.4.2. Ovulasyon	13
2.4.3. Folikül Atrezisi	14
2.4.4. Korpus Luteum	15
2.5. Ovaryum Fizyolojisi	15
2.5.1. Ovaryum Hormonları.....	17
2.5.2. Menstrüel Döngü.....	18
2.6. Kanser	20

2.6.1. Kanser Hücre Özellikleri.....	21
2.6.2. Kanser Tedavisi	21
2.6.3. Ovaryum Kanseri	22
2.7. Apoptozis	25
2.7.1. Apoptotik Hücredeki Değişiklikler	26
2.7.2. Apoptoz Mekanizması	27
2.7.3. Patolojik Durumlarda Görülen Apoptoz Olayları	28
2.7.4. Apoptoz ve Kanser Metastazı	29
2.7.5. Apoptoz'un Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	31
2.8. PI3K / AKT / mTOR Sinyal Yolağı.....	32
2.8.1. PI3K Sinyal Yolu	34
2.8.2. mTOR Sinyal Yolu	35
2.9. MAPK Sinyal Yolu	39
2.9.1. p38 MAPK Sinyal Yolağı	41
2.10. Paklitaksel	42
2.11. <i>Aronia Melanocarpa</i> (Siyah Chokeberry)	45
2.11.1. Antioksidanlar	47
2.11.2. Antosiyaninler	49
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	51
3.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler	51
3.2. Hücre Kültürü	51
3.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	51
3.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması.....	52
3.5. Deney Grupları.....	52
3.6. İn Vitro Sitotoksitite Testi - MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)	53
3.7. TUNEL ve İmmünohistokimyasal Yöntemler İçin Hücrelerin Hazırlanması ..	54
3.8. Apoptoz ölçümü sitokimyasal TUNEL yöntemi	55
3.9. PI3K, mTOR, p 38 MAPK İmmünohistokimyasal Uygulama Yöntemi	56
3.10. İstatistik Değerlendirme Yöntemi	57
4. BULGULAR.....	58

4.1. Etkin <i>Aronia Melanocarpa</i> Dozunun Belirlenmesi	58
4.2. <i>Aronia Melanocarpa</i> 'nın SKOV-3 Hücre Hattı Üzerine Olası Sitotoksik Etkisinin MTT Yöntemiyle Belirlenmesi	59
4.3. Paklitaksel İlacının Tek Başına ve <i>Aronia Melanocarpa</i> Kombinasyonunda Etkin Dozun Belirlenmesi	63
4.4. Paklitaksel'in Tek Başına ve <i>Aronia Melanocarpa</i> İle Kombinasyonunun SKOV-3 Hücre Hattı Üzerine Olası Sitotoksik Etkisinin MTT Yöntemiyle Belirlenmesi	65
4.5. TUNEL Sonuçları	69
4.6. İmmünohistokimya Sonuçları	81
4.6.1. mTOR İmmünohistokimya Sonuçları	81
4.6.2. PI3K İmmünohistokimya Sonuçları	92
4.6.3. p 38 MAPK İmmünohistokimya Sonuçları	103
5. TARTIŞMA	114
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	120
7. KAYNAKLAR	121
8. ÖZGEÇMİŞ	127

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- GLOBOCAN : Global Cancer Statistics (WHO)
- ABD: Amerika Birleşik Devletleri
- PI3K: Fosfotidil İnositol Tri Kinaz
- Mtor: Memelilerde Rapamisin'in Hedef Molekül Kompleksi
- FDA: Amerikan Gıda Ve İlaç Dairesi
- P38 MAPK: P38 Mitojen Aktif Protein Kinaz
- SKOV-3: Epitelial Ovaryum Kanseri
- SRY: Y Kolu Üzerindeki Seks Belirleyici Bölge
- TDF: Testis Belirleyici Faktör
- OMI: Oosit Maturasyon İnhibitör
- ZP: Zona Pellusida
- LH: Lüteinizan Hormon
- GnRH: Gonodotropin stimüle edici hormon
- FSH: Folikül stimüle edici hormon
- cAMP: Siklik adenozin mono fosfat
- EOC: Epitelial Ovaryum Kanseri
- FIGO: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
- RNA: Ribo nükleik asit
- ECM: Ekstra sellüler Matriks
- EMT: Epitelial-mezenşim geçişi
- ATP: Adenozin Tri Fosfat
- Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
- Fas-L: Fas Ligand
- TNF: Tümör nekroz faktör
- FADD: Fas bağımlı ölüm domain proteini
- ER: Endoplazmik retikulum
- Ca: Kalsiyum
- AIDS: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
- CSF: Koloni uyarıcı faktörler
- NGF: Nöron büyüme faktörü

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-2: İnterlökin-2
HIV: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
TRAIL: Apoptoz indükleyici ligand
DISC: Ölüm indükleyen sinyalleşme kompleksi
cIAPs: Apoptoz proteinlerinin hücrel inhibitörü
NF-κB: Nuclear Factor kappa B
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP transferase-mediated nick end-labeling
PKC: Protein kinaz C ailesi
VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü
PDGF: Trombosit büyüme faktörü reseptörü
EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
RTK: Reseptör tirozin kinaz
CSC: Kanser kök benzeri hücreler
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
AMP: Aktive edici protein kinazlar
HIF-1: Hipoksi-indüklenebilir faktör 1
HER1-4: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörleri 1-4
S6K1: Ribozomal protein S6 kinaz beta-1
eIF4E: Ökaryot translasyon başlatıcı faktör 4E
SGK: Serum ve glukokortikoid indüklenebilir kinaz
PDK2: Fosfoinositid bağımlı kinaz 2
ALDH1: Aldehit dehidrogenaz 1
ERK: Ekstraselüler siny düzenleyici kinaz
JNK: c-Jun NH2- terminal kinaz
AP-1: Aktifleyici protein 1
CRE: Siklik adenzin bir fosfat cevap elementi
SRE: Serum cevap elementi
ATF-1: Aktifleyici transkripsiyon faktörü 1
STAT3: Transkripsiyon sinyali arttırıcı ve aktivatörü
EGR-1: Erken büyüme cevap elementi 1

MEF 2: Miyozite spesifik zenginleştirici faktör 2

OA: Oleanolik asit

A. Melanocarpa: *Aronia Melanocarpa*

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

MMP-2: Matriks metalloproteinaz

SK-Hep1: İnsan Hepatik Adenokarsinom hücre hattı

ATCC (American Type Culture Collection): Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu

FBS: Fetal Sığır Serum

PBS: Fosfatlı tampon solüsyonu

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

DMSO: Dimetil sülfoksit

DAB: Diaminobenzidin

HSB-2, Molt-4 ve CCRF-CEM: İnsan lenfoblastik lösemi hücreleri

PDGF: Platelet büyüme faktörü

IGFR: İnsülin büyüme faktörü reseptörü

PTX: Paklitaksel

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Ovulasyon Süreci.....	14
Şekil 2: Menstrual Döngüde Hormonal Değişimler.....	16
Şekil 3: Menstruasyon.....	19
Şekil 4: PI3K/AKT/ mTOR sinyal yolu.....	32
Şekil 5: mTOR ve PI3K / Akt sinyal yollarının bir modeli ve ara bağlantıları	39
Şekil 6. MAPK ailesi ve sinyal iletimi.....	42
Şekil 7: Paklitakselin kimyasal yapısı.....	43
Şekil 8: Hücre döngüsü mekanizması.....	44
Şekil 9: <i>Aronia Melanocarpa</i> – Siyah chokeberry.....	46
Şekil 10: Antosiyaninlerin antitümör etkisinin in vitro ana potansiyel moleküler mekanizması.....	50
Şekil 11: SKOV-3 hücrelerine <i>Aronia Melanocarpa</i> uygulanan ve uygulanmayan gruplara ait invert mikroskop görüntüsü.....	59
Şekil 12: SKOV-3 hücresi için farklı konsantrasyon ve saatlerdeki <i>Aronia Melanocarpa</i> uygulamasının MTT sonuç grafiği	60
Şekil 13: SKOV-3 hücrelerine paklitaksel'in tek başına ve <i>Aronia Melanocarpa</i> ile kombinasyon uygulanan ve uygulanmayan gruplara ait invert mikroskop görüntüsü.....	64
Şekil 14: SKOV-3 hücresi için farklı konsantrasyon ve saatlerdeki paklitaksel uygulamasının MTT sonuç grafiği.....	66
Şekil 15: SKOV-3 hücresi için farklı konsantrasyon ve saatlerdeki paklitaksel ve <i>Aronia Melanocarpa</i> 'nın kombine uygulamasının MTT sonuç grafiği.....	68
Şekil 16: En etkin olan 5 farklı <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 24 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi	72
Şekil 17: En etkin olan 5 farklı <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 48 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi	73
Şekil 18: En etkin olan 5 farklı <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 72 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi	74
Şekil 19: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 24 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi.....	77

Şekil 20: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 48 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi.....	78
Şekil 21: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 72 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi.	79
Şekil 22: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'ya ait 24 saat mTOR immünositokimya görüntüleri	83
Şekil 23: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'ya ait 48 saat mTOR immünositokimya görüntüleri	84
Şekil 24: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'ya ait 72 saat mTOR immünositokimya görüntüleri	85
Şekil 25: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 24 saat sonrası mTOR immünositokimya görüntüleri.....	86
Şekil 26: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 48 saat sonrası mTOR immünositokimya görüntüleri.....	87
Şekil 27: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 72 saat sonrası mTOR immünositokimya görüntüleri.....	88
Şekil 28: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'ya ait 24 saat PI3K immünositokimya görüntüleri ..	94
Şekil 29: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'ya ait 48 saat PI3K immünositokimya görüntüleri..	95
Şekil 30: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'ya ait 72 saat PI3K immünositokimya görüntüleri ..	96
Şekil 31: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 24 saat sonrası PI3K immünositokimya görüntüleri	97
Şekil 32: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 48 saat sonrası PI3K immünositokimya görüntüleri	98
Şekil 33: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 72 saat sonrası PI3K immünositokimya görüntüleri	99
Şekil 34: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'ya ait 24 saat p 38 MAPK immünositokimya görüntüleri.....	104
Şekil 35: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'ya ait 48 saat p 38 MAPK immünositokimya görüntüleri.....	105
Şekil 36: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'ya ait 72 saat p 38 MAPK immünositokimya görüntüleri.....	106

Şekil 37: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 24 saat sonrası p 38 MAPK immünohistokimya görüntüleri.....	107
Şekil 38: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 48 saat sonrası p 38 MAPK immünohistokimya görüntüleri.....	108
Şekil 39: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonunun 72 saat sonrası p 38 MAPK immünohistokimya görüntüleri.....	109



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Apoptozda Kullanılan Yöntemler	31
Tablo 2: 24. - 48. - 72. Saat <i>Aronia Melanocarpa</i> uygulaması sonrası % hücre canlılığı.....	60
Tablo 3: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'nın farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 değeriyle karşılaştırılması ($p > 0.05$).....	61
Tablo 4: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'nın farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 değeriyle karşılaştırılması ($p > 0.05$).....	62
Tablo 5: <i>Aronia Melanocarpa</i> 'nın farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 değeriyle karşılaştırılması ($p > 0.05$).....	62
Tablo 6: Paklitaksel konsantrasyonlarının 24. 48. 72. saat sonunda % hücre canlılığı.....	65
Tablo 7: Paklitaksel'in farklı dozlarının 24, 48, 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 değeriyle karşılaştırılması ($p > 0.05$).....	66
Tablo 8: Paklitaksel ve <i>Aronia Melanocarpa</i> konsantrasyonlarının kombine kullanılması ile 24. 48. 72. saat sonunda % hücre canlılığı.....	67
Tablo 9: En etkin olan paklitaksel ile <i>Aronia Melanocarpa</i> kombinasyonunun 24, 48, 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 değeriyle karşılaştırılması	69
Tablo 10: <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre 24 Saat TUNEL sonuçları.....	75
Tablo 11: <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre 48 Saat TUNEL sonuçları.....	75
Tablo 12: <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre 72 Saat TUNEL sonuçları.....	76
Tablo 13: Paklitaksel 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dozunun kontrol grubuna göre TUNEL sonuçları (24, 48, 72 Saat).....	80
Tablo 14: Paklitaksel 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Doz + <i>Aronia Melanocarpa</i> 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dozunun kontrol grubuna göre TUNEL sonuçları (24, 48, 72 Saat).....	80
Tablo 15: <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (24 Saat).....	89
Tablo 16: <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (48 Saat).....	89

Tablo 17: <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (72 Saat).....	90
Tablo 18: Paklitaksel 0,02 µM/ml İle paklitaksel 0,02µM/ml + <i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (24 Saat)	91
Tablo 19: Paklitaksel 0,02 µM/ml ile paklitaksel 0,02 µM/ml + <i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (48 saat).....	91
Tablo 20: Paklitaksel 0,02 µM/ml ile paklitaksel 0,02 µM/ml + <i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (72 saat).....	91
Tablo 21. <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre PI3K immünpozitifliği (24 saat).....	100
Tablo 22. <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre PI3K immünpozitifliği (48 saat).....	100
Tablo 23: <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre PI3K immünpozitifliği (72 saat).....	101
Tablo 24: Paklitaksel 0,02 µM/ml ile paklitaksel 0,02 µM/ml + <i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P13K immünpozitifliği (24 saat).....	101
Tablo 25: Paklitaksel 0,02µM/ml ile paklitaksel 0,02 µM/ml + <i>Aronia Melanocarpa</i> 50µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P13K immünpozitifliği (48 saat).....	102
Tablo 26: Paklitaksel 0,02µM/ml ile paklitaksel 0,02 µM/ml + <i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P13K immünpozitifliği (72 saat).....	103
Tablo 27: <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği (24 saat).....	110
Tablo 28: <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği (48 saat).....	110
Tablo 29: <i>Aronia Melanocarpa</i> dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği (72 saat).....	111
Tablo 30: Paklitaksel 0,02 µM/ml ile paklitaksel 0,02 µM/ml + <i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği (24 saat)	112
Tablo 31: Paklitaksel 0,02 µM/ml ile paklitaksel 0,02 µM/ml + <i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği(48 saat) .	112
Tablo 32: Paklitaksel 0,02 µM/ml ile paklitaksel 0,02 µM/ml + <i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği(72 saat) .	113

1. GİRİŞ

Kanser, köken aldıkları hücre tiplerine bağlı olarak değişik davranışlar gösteren yüze yakın sayıdaki kompleks hastalıkları kapsayan, hücrelerin kontrolsüz büyüme eğilimi ve anormal yayılımını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Kanser, insan sağlığını tehdit eden kardiyovasküler hastalıklardan sonra, ikinci sırada ölüm nedeni olarak yer almaktadır (1).

Ovaryum kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türler arasında 7. sırada yer almaktadır. 2012 yılında, over kanseri dünya çapında 151.900 ölüme neden olmuştur ve en son GLOBOCAN (WHO) tahminlerine göre over kanseri tanısı alan 238.700 hasta bulunmuştur. Kadınların yaklaşık % 75'inde hastalık ileri evrede teşhis edildiği için kanser periton boşluğu içinde yayılmıştır. Bundan dolayı genel sağkalım oranları sadece % 17- 36 arasındadır. 2016 yılında, ovaryum kanseri olan 22.280 yeni vaka teşhis edilmiş ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)' inde bu kanser nedeniyle yaklaşık 14.240 kadın hayatını kaybetmiştir (2,3) . Tanı ve tedavide karşılaşılan zorluklar, kemoterapötik olarak kullanılan ilaçların pahalı olması gibi durumlar kanser hastaları ve yakınlarının sosyoekonomik açıdan büyük sorunlarla karşılaşmalarına neden olmaktadır.

Epitelyal over kanseri tüm ovaryum malign hastalıklarının yaklaşık % 90'ını oluşturur. Erken evre over kanseri hastalarında cerrahi tedavi ile tümör tamamen ortadan kaldırılabilir ve tam iyileşme sağlanabilir. İleri evre over kanseri hastaları için, sitoredüktif cerrahiye takiben platin / taksan (paklitaksel gibi) türevi ilaçlar standart tedavi olarak kullanılır ve % 75' lik yüksek bir başlangıç yanıt oranı ile sonuçlanır. Hastaların çoğunda ilaca karşı rezistans gelişir ve zaman içinde tümör rekürrensi oluşur. Bu nedenle, paklitaksel direnç mekanizmasını aydınlatmak, over kanseri hastalarının terapötik etkisini ve prognozunu iyileştirmek için önemlidir (2). Bu malignitelerin mortalitesini azaltmak için yeni geliştirilecek moleküler hedefleme terapilerine ve kemosensitizasyon stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (4-9).

PI3K-AKT-mTOR (*Phosphatidylinositol 3-kinase- AKT- Mammalian Target of Rapamycin*) yolu, kanserde en sık düzensizlik gösteren sinyal yollarından biridir ve sonuç olarak, bu sinyal yolağının ana bileşenlerini hedefleyen 40'dan fazla bileşik, farklı kansere türlerine sahip hastaları içeren bir dizi klinik çalışmalarda test

edilmiştir. mTOR inhibitörleri *temsirolimus* ve *everolimus* ve PI3K inhibitörleri *idelalisib* ve *copanlisib*, çeşitli kanserlerin tedavisinde klinik kullanım için FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından onaylanmıştır. Daha fazla potansiyele ve seçiciliğe sahip yeni bileşikler ve azaltılmış toksisite risklerinden dolayı destekleyici tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır. PI3K-AKT-mTOR yolağının onkojenik aktivasyonunun, diğer sinyal yollarında pro-tümörijenik sapmaların yanında sıklıkla meydana geldiği düşünülürse, tedavinin etkinliğini en verimli şekilde sağlamak için rasyonel kombinasyonlara da ihtiyaç duyulmaktadır (5,10).

P38 MAPK (*p 38 Mitogen-activated-protein kinases*) yolu kanser hücresi apoptozunda rol oynamaktadır ve çeşitli kemoterapötik ilaçlar ile uyarılır (11). Fosforlanmış MAPK daha sonra, tümör hücresi apoptozundaki platin ve taksanın etkilerini zayıflattığı ve kemoterapötik ilaçlara karşı kanser direncini arttıracakları gösterilen Bcl-2 (B hücresi lenfoma-2) ve Bcl-2 ile ilişkili ölüm proteinlerini fosforile eder. MAPK sinyal yolunun, ovaryum kanseri de dahil olmak üzere çeşitli malign tümörlerde hücre proliferasyonu, apoptoz ve kemorezistansda önemli bir rolü vardır. P 38 MAPK sinyal yolunun aktivasyonu ile paklitaksel karşı SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinin direnç geliştirdiği belirlenmiştir (12).

Over kanserinde PI3K – AKT – mTOR ve p 38 MAPK sinyal yolunun aktivasyonunun kanserin ilerlemesinde ve ilaç direnci geliştirmesinde önemli bir işlevi bulunduğu bilinmektedir (10,12,13). Bu çalışmada PI3K – AKT – mTOR ve p 38 MAPK sinyal yolunu hedefleyen moleküler antikanser tedavilerini incelemeyi amaçladık.

Meyveler, dejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar veya kanser dahil olmak üzere sağlık sorunlarına karşı koruma sağlamadaki katkılarından dolayı tavsiye edilir. Son yıllarda kanser çalışmaları için bilim adamları tarafından büyük ilgi gören *Aronia melanocarpa* antioksidan ve antosiyanin içeriği yüksek bir meyve çeşididir. *Aronia*'nın meyveleri, hem in vitro hem de in vivo olarak etki gösteren diğer biyolojik, sağlığı teşvik edici etkiler sergilemektedir, örneğin gastroprotektif (mide ülserleri), hepatoprotektif, kanserde antiproliferatif aktiviteleri (örn., kolon kanseri) düzenlemede ve diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (14,15). *Aronia melanocarpa*'nın daha önce ovaryum kanseri tedavisi için hiç kullanılmamış olması, bu çalışmanın temelini oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla yeni

biyolojik ajanların bulunması, ovaryum kanserinde tedaviye yönelik beklentileri arttırmıştır. Hastalığın gelişim sürecinde görev alan moleküllerin işlevsel ve yapısal özelliklerinin ortaya çıkarılması, ovaryum kanserinin tanı ve tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesi açısından önemlidir. Günümüzde antioksidanların çeşitli kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonlarının çalışılması over kanserindeki ilaç direncine karşı yeni bir yol keşfi için ışık tutmaktadır.

Bu bilgiler ışığında; bu çalışmada farklı dozlarda ve sürelerde uygulanan *Aronia melanocarpa*'nın tek başına ve paklitaksel ile kombinasyonunun ovaryum kanseri hücre hattı SKOV-3 üzerine antikanser özelliklerinin araştırılması, bu hücreler üzerindeki olası apoptotik ve anti-sitotoksik etkilerinin ortaya koyulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genital Sistem Gelişimi

Cinsiyetin farklanması, bazıları otozomal olan çok sayıda genin rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı kısa kolunda (Yp11) SRY genini (sex-determining region on Y) taşıyan Y kromozomudur. Bu genin protein ürünü, rudimenter durumdaki cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür. SRY proteini testis belirleyici faktör (TDF) olduğu için, bu faktörün varlığıyla fetüsün cinsiyeti erkek tipinde, yokluğunda da kız tipinde gelişir (16,17).

2.1.1. Gonadlar

Embriyonun cinsiyeti genetik açıdan fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek veya dişi morfolojik özelliklere sahip değildirler. Gonadlar başlangıçta bir çift uzunlamasına, kölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş ürogenital kabarıklıklardan gelişirler. Gelişimin 4. haftasının başında yolk kesesi duvarında, endodermal hücreler arasında primitif seks hücreleri ortaya çıkar. Embriyonun kranio-kaudal yönde kıvrılması ile yolk kesesinin dorsal parçası embriyonun içine alınır. Bu sırada primordial germ hücreleri arka bağırsağın mezenteri boyunca **gonadal kabartılara** doğru göç ederler. 6. hafta sırasında primordial germ hücreleri primitif gonadlara ulaşmadan hemen önce gonadal kabarıklığın epiteli proliferer olur ve primordial germ hücreleri bu mezenşim epitelinin içine girer. Primer seks kordonlarını oluştururlar. Bu sırada erkek veya dişi gonadların görünümü birbirine benzerdir ve **farklanmamış gonad** olarak adlandırılır. Daha sonra Y kromozom varlığı veya yokluğuna göre gonadların erkek veya dişi yönüne farklanması gerçekleşir (16,17).

2.2. Ovaryum Embriyolojisi

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaş olur. X kromozomu ovarian gelişim için genler taşır, tam bir ovaryum gelişimi için 2 adet X kromozomu gereklidir. Overler histolojik olarak 10. haftaya kadar ayırt edilemezler. Primer seks kordonları belirgin değildirler, medulla içine sokulurlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Bu oluşan yapı ve primer seks kordonları yani kortikal kordonlar, erken fetal dönemde mezotelden kökenli overin yüzey epitelinden köken alarak altta bulunan mezenşim içerisine doğru girerler. Kortikal kordonların boyutları arttığında, primordial germ hücreleri onların içlerine girerler. Yaklaşık 16. haftada primitif seks kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrışır. Bu kümeler, overlerin medullar kısmını işgal eder. Daha sonra kaybolurlar ve yerine ovarian medulla oluşturan bir vasküler stroma ile yer değiştirirler. Yedinci haftada, altta yatan mezenşime nüfuz eden ancak yüzeye yakın kalan ikinci kuşak kortikal kordonlar ortaya çıkar. Dördüncü ayda, bu kordonlar, her biri bir veya daha fazla primitif germ hücresi ile izole edilmiş hücre kümelerine ayrılır. Germ hücreleri daha sonra oogoniumlara dönüşürken, yüzey epitelinden aşağı göçen ve germ hücrelerini çevreleyen epitel hücrelerinden de folliküler hücreler oluşur. Fetal yaşam sırasında overlerde, oogoniumlarda oluşan aktif mitoz sonucu, binlerce primordial folikül meydana gelirse de doğumdan önce pek çoğu dejenere olur. Postnatal dönemde yeni oogonium meydana gelmez, bu süreçte overlerde iki milyon civarında primer oosit olarak bulunur. Doğumdan sonra overin yüzey epiteli düzleşir ve tek tabakalı hale gelen hücreler, over hilumunda, periton mezoteli ile devamlılık gösterir. Bu şekildeki overin yüzey epiteline germinal epitel denir. Germinal epitel korteksteki foliküllerden, tunika albuginea adı verilen ince bir fibröz kapsülle ayrılır. Overler, gerileyen mezonefrozdaki mezenterilerden ayrılıp mezenterilerle olan mezovaryum ile bağlanır (16,17).

2.2.1. Oogenezis

Oogenezis; oogonia denilen primitif germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşmesiyle gerçekleşen olaylar dizisidir. Hücrelerdeki bu olgunlaşma süreci doğumdan önce başlar, cinsel olgunluğa erişildiğinde tamamlanır.

2.2.1.1. Oositlerin Doğum Öncesi (Prenatal) Olgunlaşması

Oositlerin olgunlaşması doğumdan önce başlar. Primordial germ hücreleri genetik olarak XX kromozomu taşıyan gonadlarına ulaştığında, Oogoniaya farklılaşırlar. Bu hücreler bir dizi mitotik bölünme geçirir ve 3. ayın sonunda, yassı epitelyal hücrelerden oluşan bir tabaka ile çevrili kümeler halinde düzenlenirler. Bir kümedeki tüm oogoniyalar muhtemelen tek bir hücreden türetilirken, foliküler hücreler olarak bilinen yassı epitel hücreler, overlerin yüzeyini kaplayan yüzey epitelyumundan kaynaklanır. Oogonia'ların çoğunluğu mitoz ile bölünmeye devam eder, ancak bazıları mayoz bölünmenin profaz evresinde hücre bölünmelerini durdurarak primer oositleri oluştururlar. Sonraki birkaç ay içinde, oogonium sayısı hızla artmaktadır ve doğum öncesi gelişimin beşinci ayı boyunca, overlerdeki toplam oogonium sayısı 7 milyona ulaşmaktadır. Bu dönemde, hücre ölümü başlar ve birçok oogoniyanın yanı sıra primer oositler atreziye uğrarlar. Yedinci ayda, yüzeye yakın bir kısmı dışında oogoniumların çoğunluğu dejenere olmuştur. Sağ kalan tüm primer oositler, mayoz bölünmenin 1. profaz evresine girmiş ve bunların çoğu tek katlı yassı epitelyal hücreler ile çevrelenmişlerdir. Primer oosit profaz evresinde duraklaması puberteye kadar devam eder. Bu duraksama oositi çevreleyen folikül hücrelerinden salgılanan oosit maturasyon inhibitör (OMI) maddesi tarafından sağlanmaktadır. Primer oosit, çevresindeki yassı epitelyal hücreleri ile birlikte bir primordial folikül olarak bilinir.

Prenatal oosit maturasyonu

Oositlerin olgunlaşması doğumdan önce başlar. Primordial germ hücreleri genetik olarak XX kromozomu taşıyan gonadlarına ulaştığında, oogoniaya farklılaşırlar. Bu hücreler bir dizi mitotik bölünme geçirir ve 3. ayın sonunda, düz epitelyal hücrelerden oluşan bir tabaka ile çevrili kümeler halinde düzenlenirler. Bir kümedeki tüm oogoniyalar muhtemelen tek bir hücreden türetilirken, foliküler hücreler olarak bilinen yassı epitel hücreleri, overlerin yüzey epitelyumundan kaynaklanır. Oogonia'ların çoğunluğu mitoz ile bölünmeye devam eder, ancak bazıları mayoz bölünmenin profaz evresinde hücre bölünmelerini durdurarak primer oositleri oluştururlar. Önemdeki birkaç ay içinde, oogonium sayısı hızla artmaktadır ve doğum öncesi gelişimin beşinci ayı boyunca, overlerdeki toplam oogonium sayısı 7 milyona ulaşmaktadır. Bu dönemde, hücre ölümü başlar ve birçok

oogoninin yanı sıra primer oositlerde atreziye uğrarlar. Yedinci ayda, yüzeye yakın bir kısmı dışında oogoniumların çoğunluğu dejenere olmuştur. Sağ kalan tüm primer oositler, mayoz bölünmenin I. profaz evresine girmiş ve bunların çoğu tek katlı yassı epitelyal hücreler ile çevrelenmişlerdir. Primer oosit, çevresindeki yassı epitelyal hücreleri ile birlikte, bir primordial folikülü oluşturur. Doğumdaki toplam primer oosit sayısı 700.000'den 2 milyona kadar değişmektedir. Çocukluk döneminde çoğu primer oosit atretik hale gelir, pubertede sayıları yaklaşık 400.000 kadardır ve bunların sadece 500'den daha azı ovulasyon dönemine erişir.

Postnatal oosit maturasyonu

Oositlerin olgunlaşması ergenlikte devam eder.

Doğum zamanı yaklaştığında, tüm oositler mayoz I bölünmesini başlatırlar, fakat metafaz safhasına ilerlemek yerine, diploten evresine girerler. Diploten evresi, profaz sırasında bir dantel kromatin ağı ile karakterize edilen dinlenme evresidir.

Pubertede büyüyen bir follikül havuzu oluşturulur ve primordiyal folliküllerden devamlılığı sağlanır. Her ay, bu havuzdan seçilen 15 ila 20 folikül olgunlaşmaya başlar ve aşağıdaki üç aşamadan geçerler;

- 1) Primer ya da preantral; 2) Sekonder veya antral (vesiküler); 3) Preovulatar.

Antral evre en uzundur, oysa preovulatar evre ovulasyondan yaklaşık 37 saat önce oluşur. Primer oosit gelişmeye başladıkça, onu çevreleyen foliküler hücreler yassıdan küboidale doğru değişir ve granüloza hücrelerinin çok tabakalı epitelinin üretmek için çoğalırlar. Oluşan yapıya primer follikül denilir. Granüloza hücrelerinin etrafını saran stromal hücreler teka folliküliyi oluşturur. Granüloza hücreleri kendilerini teka folliküliden ayıran bir bazal membran üzerine otururlar. Ayrıca granuloza hücreleri ve oosit, oositin yüzeyinde Zona pellucida'yı (ZP) oluşturan bir glikoprotein tabaka salgırlar. Foliküller büyümeye devam ettikçe, teka folliküli hücreleri, salgı yapan hücrelerin oluşturduğu iç tabaka olan teka internayı ve fibröz kapsül yapısında dış tabaka olan teka eksternayı oluştururlar. Ayrıca, foliküler hücrelerinin küçük, parmak benzeri çıkıntıları ZP boyunca uzanarak, oosit plazma membranındaki mikrovilluslar ile kenetlenirler. Bu kenetlenme, maddelerin foliküler hücrelerden oositlere taşınması için önemlidir.

Foliküler gelişim devam ettikçe, granüloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar ortaya çıkar. Bu boşlukların birleşmesi antrum oluşturur ve bu yapı sekonder (vesiküler, antral) folikül olarak adlandırılır. Başlangıçta hilal şeklinde olan antrum, zamanla genişler. Sıvının artmasıyla birlikte, oositi çevreleyen granüloza hücreleri bozulmadan/sağlam kalır ve kumulus ooforusu oluşturur. Kan damarlarından zengin, steroid sentezleyen özelliklere sahip hücrelerden oluşan teka interna ile ve ovaryum stroması ile yavaş yavaş birleşmiş olan teka eksterna ile sarılırlar. Olgunlaşması tamamlandığında, sekonder folikülün çapı 25 mm veya daha fazla olabilir.

Her ovarian siklusta, bir dizi primordial folikül gelişmeye başlar, ancak genellikle bunlardan sadece bir tanesi tam olgunluğa ulaşır. Diğerleri dejenere olarak atretik hale gelir. Sekonder folikül olgunlaştığı zaman, Lüteinizan hormonda (LH) bir dalgalanma, preovulatuvar büyüme fazını uyarır. Birinci mayoz bölünme, her biri 23 çift yapılmış kromozoma sahip olan, eşit büyüklükte olmayan iki yavru hücrenin oluşumuyla sonuçlanır. Hücrelerden biri sitoplazmanın çoğunluğunu alır ve sekonder oositi oluşturur, diğer hücre ise sitoplazmadan yoksundur, birinci polar / kutup cismi olarak bilinir. Birinci kutup cismi, ZP ile perivitellin aralıkta sekonder oositin hücre membranı arasında bulunur. Hücre daha sonra ikinci mayoz bölünmeye girer ancak ovulasyondan önce yaklaşık 3 saat kadar metafazda tutulur. Ancak sekonder oositin döllenmesi durumunda ikinci mayoz bölünme tamamlanır ve birinci kutup cismi de bölünerek ikinci kutup cisminin atar. Aksi halde, sekonder oosit hücresi ovulasyondan yaklaşık 24 saat sonra dejenere olur (16,17).

2.3. Ovaryum Anatomisi

Crista gonadalis'ten gelişen ovaryumlar, erken fetal dönemde böbreklere yakın olarak L 1-2 düzeyinde buldukları halde, fetüsün gelişimi ile desensus'a uğrayıp normal konumlarına gelirler.

Ovaryumlar doğurmamış kadınlarda (*nullipara*), küçük pelvisin dış yan duvarlarındaki *fossa ovaricalarda* yer alır. *Fossa ovarica*'nın sınırları şöyledir: *ligamentum (lig.) latum uteri*'nin arkasında olarak yukarıda *vasa iliaca externa*; arkada *vasa iliaca interna* ve ureter; önde *obliterate umbilical arter* ile sınırlanır. Tabanında *arteria (a.)* ve *vena (v.) obturatoria* ve *nervi obturatorius* bulunur.

Doğurmuş kadınlarda konumları sabit değildir. Hamilelikte, uterus'un büyümesine paralel olarak karın boşluğuna geçen ovariumlar, doğumdan sonra uterus'un küçülmesi ile pelvis boşluğuna tekrar dönerler; fakat buradaki konumları değişmiştir. Sıklıkla rektouterin çıkmazda, rektum'un iki yanında “*Cladius çukuru*” olarak adlandırılan yerlere otururlar.

2.3.1. Dış Yapısı

Her bir ovarium grimsi pembe renkte, badem şeklinde solid nodüler yüzeyle, 3 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde, 1 cm kalınlığında ve 3-5 gr ağırlığındadır. Her bir ovariumun iki yüzü (*facies medialis / lateralis*), iki kenarı (*margo mesovaricus-ön; margo liber- arka*) ile iki ucu (*extremitas tubaria- lateral; extremitas uterina-medial*) vardır. Yönü oblitere *a. umbilicalis*'e dönük olan *margo mesavaricus* (ön kenarı) düz olup, kısa bir peritoneal plika olan mesovarium ile *lig. latum uteri*'ye bağlanır. Mesovarium'un alt - medial kenarı (*extremitas uterina*) ile *cornu uteri* arasında *lig. ovarii proprium* (*lig. uteroovaricum, chorda utero-ovarica*) uzanır. Mesovarium'un iki yaprağı arasında, *hilum ovarii*'ye ulaşan arter, ven ve lenfatikler ile sinirler bulunur. Ovarium, *lig. suspensorium ovarii* (*infundibuopelvik bağ*) ile pelvik duvara bağlanır.

2.3.2. Ovariumu Sabitleyen Yapılar

- *Lig. suspensorium ovarii* (*infundibuopelvik bağ*): Ovarium'un üst ucu ve buna yakın ön kenar ile pelvis dış yan duvarı (*vasa iliaca*'ların yakınına) arasında uzanan periton plikasıdır. Ovarium'un damar ve sinir paketi bu bağ içinde yer alır. Bu bağ içindeki *plexus pampiniformis v. ovarica* oluşumunu sağlar.
- Mesovarium: Peritonun çift katlı bir oluşumu olup, ovarium'un ön kenarını *lig. latum uteri*'nin arka yaprağına bağlar.
- *Lig. ovarii proprium*: Gubernakulum'un bir derivativesi olup, ovarium'u tubouterin birleşişine (*cornu uteri*) bağlar.
- *Fimbria ovarica*: Fimbriae tubae'lerin uzun, tek bir oluşumu olup, infundibulum tuba uterinae'den ovarium'a uzanır.

2.3.3. Ovaryumun Damar ve Sinirleri

Ovaryum'un esas arteri L 2 düzeyinde aorta *abdominalis*'ten ayrılan *a.ovarica*'dır. *Lig. suspensorium ovarii* ve mesovarium içinde olarak ovarium'a ulaşır. *A.uterina*'nın *r.ovaricus* dalı da ovaryum beslenmesine katılır. *A.ovarica* dalları ile anastomoz yapan *r.ovaricus*, *a.ovarica*'nın tıkanması durumunda ovaryumu besler. Ovaryum'dan çıkan venler önce *plexus pampiniformis*'i oluşturur. *Plexus pampiniformis* venleri de *v.ovarica*'yı meydana getirir. *V. ovarica*, sağda *v. cava inferior*'a, solda *v. renalis*'e direne olur. Ovaryum'ların lenfası *a. renalis*'lere yakın olarak yerleşmiş *nodi lumbales*'e akar.

İnnervasyonları *plexus ovaricus* (parasempatikleri *n. vagus*, sempatikleri T 10-12 medulla spinalis segmentlerinden kaynak alır)'tan sağlanır (18).

2.4. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumun yüzeyi tek katlı kübik ve bazı bölgelerde yassı epitel ile döşelidir. Germinal epitel olarak bilinen bu sellüler tabaka mezovaryumu kaplayan mezotelyum ile devamlılık göstermektedir. Epitelin periton boşluğuna bakan yüzünde birçok mikrovillus bulunur. Germinal epitel ile korteksin arasında, sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer almaktadır.

Ovaryum korteks ve medulla olmak üzere iki kısımda incelenir. Korteks (kortikal bölge); medullayı çevreleyecek şekilde ovaryumun periferik bölgesinde yer almaktadır. Korteks, zengin bir şekilde sellüler bağ dokusu içine gömülü ovaryum foliküllerini içermektedir. Foliküllerin etrafındaki stromada dağınık düz kas lifleri ve hormonal uyarılara cevap veren karakteristik iğ şeklinde fibroblastlar bulunur. Stroma retiküler liflerden zengindir. Medulla ile korteks arasındaki sınır belirsizdir. Hilus damar ve sinirlerin ovaryuma girdiği bölgedir. Bu bölgede korteks kesintiye uğrar ve mezovaryum medulla ile devam eder. Hilusta fetal rete ovarii'nin kalıntıları olan küçük kübik ya da titrektüylü prizmatik epitelle döşeli düzensiz kanallar bulunabilir. Ovaryum folikülleri gelişmekte olan oositler için mikroçevreyi sağlamaktadır. Her biri tek oosit içeren çeşitli boyutlardaki ovaryum folikülleri korteksin stromasına dağılmışlardır (19,20).

2.4.1. Ovaryum Folikülleri

Gelişim evresine göre histolojik olarak 3 temel tip ovaryum folikülü tanımlanabilir:

- Primordiyal foliküller,
- Büyümekte olan foliküller, primer ve sekonder (ya da antral) folikül olarak alt gruplara ayrılmaktadır.
- Preovulatuvar foliküller
- **Primordiyal foliküller**

Doğumdan puberteye kadar tek folikül tipini oluşturur. Tunika albuginea'nın hemen altındaki korteks stromasında yer alır. Ortada primer oosit ile onun etrafındaki tek katlı yassı folikül hücrelerinden oluşmaktadır. Folikül hücreleri bir bazal lamina tarafından çevrelenmiştir. Primer oositin çapı 25-30 µm dir. Eksentrik yerleşimli nukleus, ince dağılmış kromatin, bir veya birkaç belirgin nukleolus içerir. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde, hücre organellerinin genellikle nukleusa yakın bir küme oluşturdukları gözlenir, buna Balbiani cisimciği denir. İyi gelişmiş golgi kompleksi, endoplazmik retikulum sisternaları birçok dağılmış mitokondri, lizozom ve küçük veziküller içerir. Sitoplazmada birbirine paralel lameller sisternaların oluşturduğu annulate lamella olarak adlandırılan özel bir membran sistemi de bulunur.

Yassı folikül hücreleri endoplazmik retikulum, mitokondri ve lipid damlacıkları içerir, dezmozomlarla birbirlerine bağlanmışlardır. Hücreleri çevreleyen bazal lamina folikülü ovaryum stromasından ayırır.

- **Büyümekte olan foliküller**

Primordiyal foliküller gelişirken primer oosit, folikül hücreleri ve çevrelerindeki stromada değişiklikler meydana gelir. Bu süreçte primer ve sekonder folikül olmak üzere iki farklı folikül tipi oluşmaktadır.

Primer Folikül: Primer oosit büyür ve çevresindeki tek katlı yassı folikül hücreleri kübikleşir, böylece tek tabakalı primer folikül oluşur. Oosit büyürken tek olan golgi kompleksi birden fazla şekilde sitoplazmada dağılmış olarak gözlenir.

Özelleşmiş salgı granülleri (kortikal granüller) plazma membranının hemen altında belirir. Folikül hücreleri mitotik bölünmelerle çok katlı folikül epiteline dönüşür. Bu epiteli oluşturan hücelere granüloza hücreleri, bu tabakayada stratum granülozum denir. Folikül hücreleri arasında oluklu bağlantılar bulunur. Oosit ile folikül hücreleri arasında zona pellusida belirir. Bu tabaka asidofilik, homojen, aselüler ve kuvvetli PAS pozitifdir. ZP1, ZP2, ZP3 olmak üzere 3 tip sülfatlı asidik glikoproteinden oluşmuştur. ZP3 spermin fertilizasyon için bağlandığı reseptördür. Zona pellusida hem oositin hemde folikül hücrelerinden salınmaktadır. Oositten birçok mikrovillus bu yapıya doğru uzanır.

Folikülün etrafındaki stromal hücreler bazal laminanın üzerinde teka folikülü adı verilen bir örtü oluşturur. Teka folikülü daha sonra teka interna ve teka eksterna olarak iki tabakaya ayrılır. Teka interna endokrin fonksiyona sahiptir. Yapısında steroid üreten kübik hücreler ve hücrelerin etrafında zengin kapiller ağ mevcuttur. Teka eksterna bağ dokusu yapısındadır. Primer folikülün boyutu arttıkça korteksin derin kısımlarına ilerlerler.

Sekonder Folikül (Veziküler, Antral Folikül): Stratum granülozum altı ile on iki tabakalı kalınlığa ulaştığında granüloza hücreleri arasında sıvı dolu düzensiz boşluklar belirir. Bu sıvı hyalüronik asitten zengindir ve folikül sıvısı olarak adlandırılır. Bu sıvı dolu boşluklar birleşerek yarım ay şeklinde antrum denilen büyük bir boşluk oluşturur. Antrumun oluşması ile bu foliküle sekonder folikül denir. Granüloza hücreleri oositin etrafında yoğunlaşarak antrumun bir kenarında çıkıntı oluşturur. Bu çıkıntıya kumulus ooforus denir. Oositin hemen etrafında bulunan ovulasyon ile dışarı atılan kısma korona radiata denir. Bu dönemde oosit 125 µm'lik bir çapa ulaşmıştır.

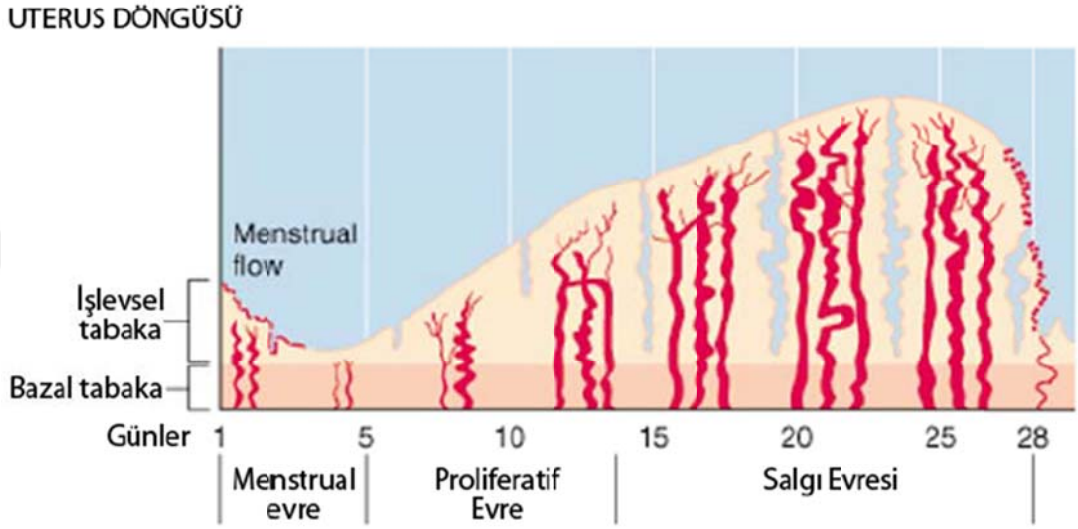
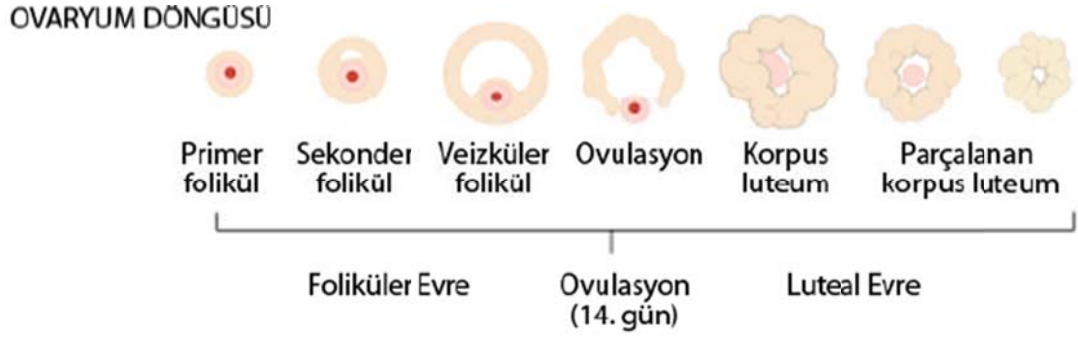
- **Preovulatar folikül**

Menstrual siklusun yaklaşık 10 -14. günü arasında oluşan olgun foliküller 10 mm veya daha fazla bir çapa sahiptir. Bu foliküller ovaryum korteksinin kaplayarak yüzeyde çıkıntılar oluşturur. Sıvı birikmesi ile antrum genişler. Stratum granülozum daha ince görülür. Bu durumdaki foliküle olgun veya preovulatar (graaf) folikül denir. Primer oosit etrafındaki granüloza hücreleri tek sıralı bir hal alır. Folikül sıvısı içinde gezinmeye başlar. Bu sırada teka hücreleri en son gelişimine ulaşır. Teka

internanın hücreleri çok köşeli içerisinde lipid damlacıkları bulunur. Teka eksterna ise konsantrik olarak düzenlenmiş iğsi yapıda hücrelerden oluşmuş fibriler bir yapı gösterir.

2.4.2. Ovulasyon

Menstrual siklusun ortasında bir oositin çevresindeki korona radiata hücreleri ile birlikte olgun folikülden atılmasına ovulasyon denir. Olgun folikülün içindeki primer oosit ovulasyon olmadan hemen önce LH'nin etkisi ile birinci mayoz bölünmesini tamamlayarak sekonder oosit ve birinci polar cisimcik oluşur. Bu sayede ovulasyon ile ovaryum yüzeyinden atılan hücre sekonder oositir. Ovulasyon esnasında ovaryumun yüzeyine baskı yapan sekonder oosit tunika albugineayı incelterek stigma adı verilen yarı şeffaf bir nokta oluşturur ve oosit buradan ovaryum dışına atılır. Tuba uterina'ların fimbriaları ovaryum yüzeyine yaklaşarak oositi içine alır. Oositi ampulla bölgesine ulaştırır ve bir sperm ile döllenmesi için oositi korur. Eğer bir sperm ile oosit döllenirse oosit ikinci mayoz bölünmesini tamamlar ve zigot oluşur. Zigot yarıklanarak 3-5 gün içinde uterusu ulaşır. Eğer sekonder oosit bir sperm tarafından döllenmez ise 24 saat içinde dejenere olur ve menstruasyon ile dışarı atılır. Ovulasyon puberteden menopoza kadar her 28 günlük menstrual siklusun tam ortalarında gerçekleşir. Genellikle iki ovaryum dönüşümlü olarak her ay bir adet oositi ovulasyon ile dışarı atar (şekil 1).



Şekil 1. Ovulasyon Süreci

2.4.3. Folikül Atrezisi

Her ay menstrual siklusun başında 5 ile 10 adet folikül büyümeye başlar. 1 tanesi olgun folikül olarak ovulasyon ile dışarı atılır. Diğerleri dejenere olur bu olaya folikül atrezisi adı verilir. Folikül atrezisi intrauterin hayatta başlar. Doğumdan sonra maternal hormonların etkisi kaybolduğu zaman puberte ve gebelik sırasında hormonların değiştiği dönemde artar. Primordiyal ve primer foliküllerdeki oositler büzülür ve dejenere olur. Folikül hücreleri de otolize uğrar ve yerlerini stroma hücreleri alır. Daha büyük foliküllerde ise granüloza hücreleri apoptoza uğrar. Teka hücreleri hipertrofiye olur. Folikül büzüşerek folikül boşluğunu bağ dokusu işgal eder. Dejenere olan folikül kalıntıları hızla rezorbe edilir. Zona pellusida da bağ dokusundaki makrofajlarca fagosite edilir. Teka interna hücrelerinin genişlemesiyle

korpus luteuma benzeyen atretik folikül oluşur. Bu yapıya korpora lutea atretika denir.

2.4.4. Korpus Luteum

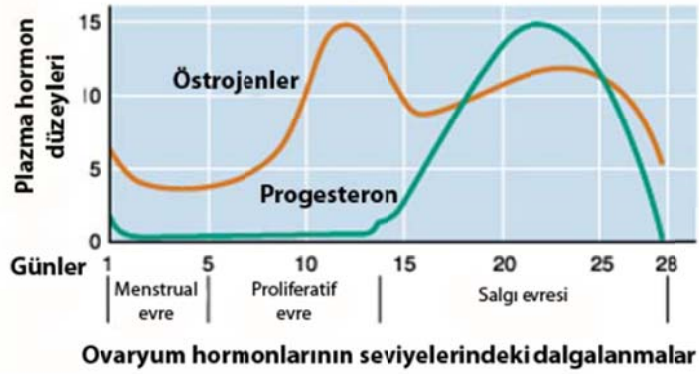
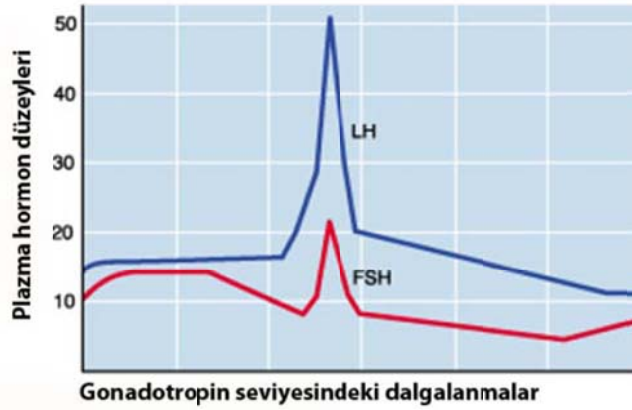
Ovulasyondan sonra yırtılmış ve boşalmış folikül LH'nin etkisi altında korpus luteum denilen iç salgı bezine dönüşür. Ovulasyondan sonra folikül duvarı büzülür. Foliküldeki granüloza hücreleri ve teka hücreleri folikül boşluğuna çöker. Teka interna kan kapillerinin yırtılması ile folikül boşluğunda kanama olur ve orta bölgede bir pıhtı oluşur. Bu yapıdaki foliküle korpus hemorajikum (rubrum) denir. Daha sonra pıhtı rezorbe edilir. Korpus luteum gelişimi sırasında teka internanın kan kapillerleri stratum granulozum tabakasına ilerler ve zengin damarsal ağ oluşturur. Korpus luteum epitel hücre kordonları ve kapiller ağ ile endokrin bez yapısı kazanır. Lipid içeriğinden dolayı sarı cisimcik de denir. Korpus luteum progesteron ve östrojen salgılayarak fertilize ovumun implantasyonuna yardım eder. Endometriyumunu hazırlar. Gebelik olursa korpus luteum yaklaşık 6 ay devamlılığını sürdürür. Daha sonra küçülür fakat tamamen kaybolmaz. Gebelik oluşmazsa dejenere olarak korpus albicans adını alır. Korpus albicans birkaç ay içinde kaybolur (19-21).

2.5. Ovaryum Fizyolojisi

Ovaryumların işlevleri, hipotalamo-hipofizer-ovaryan eksen ismi verilen bir geri bildirim sisteminde düzenlenir. Salgılanan hormonal kontrol şu şekildedir:

- Hipotalamus'tan GnRH (Gonodotropin stimüle edici hormon) salgılanır. Ön hipofiz uyarılır.
- Ön hipofiz'den FSH (Folikül stimüle edici hormon) ve LH salınır. Overler uyarılır.
- Overler'den östrojen ve progesteron salınımı gerçekleşir.

Çocuklukta, overler büyür ve hipotalamik GnRH salınımını inhibe eden östrojenleri az miktarda salgılar. Puberte yaklaştığında (9-12 yaş), GnRH salgılanmaya başlar; FSH ve LH ön hipofizden salınır, overler etkilenir. Overlerden östrojen ve progesteron salgısı başlar. Bu olaylar erişkin dönemdeki devam edecek olan siklusların ilki olan "menarş"ı başlatır (11 -15 yaş).



Şekil 2: Menstrual Döngüde Hormonal Değişimler

Ovumun olgulaşması ile ilgili aylık değişimler;

- Foliküler faz: Folikül büyümesi (1–14. günler) sürecini ifade eder.
- Lüteal faz: Korpus luteum aktivitesi (14–28. günler)'dir, siklusun ortasında ovulasyon gerçekleşir (Şekil 2).

Doğumda bulunan tek katlı granüloza hücreleri ile çevrili primer oosit'te granüloza hücre tabakası kalınlaşır. Hücreler; östrojen, progesteron, inhibin, OMI, besin ve kimyasal habercileri salgılar. "Antrum" sıvısı yüksek östrojen içerir. Antrum oluştuktan sonra granüloza ve teka hücre proliferasyon ve salgı hızı artar. Büyümüş olan folikül (veziküler folikül) overin dış yüzeyine doğru çıkıntı oluşturur.

Östrojen lokal olarak hem kendi hem de FSH reseptörlerini ve etkilerini artırır. FSH dominant folikülün granüloza hücre büyümesini ve östrojen sentezlemesini artırır. FSH ve östrojen; LH reseptörlerini artırır, granüloza hücrelerini LH'a duyarlılığını artırır. LH, teka hücrelerini büyümesini ve androjen oluşumunu artırır (androjenler granüloza hücrelerinde östrojene dönüşür). Folikül

çatlar, ovum atılır. Birkaç saat içinde granüloza ve teka hücreleri çoğalıp oositten kalan boşluğu doldurur. Korpus luteum oluşur ve progesteron, östrojen, inhibin ve androjenleri salgılar. Gebelik oluşmazsa korpus luteum 10 gün sonra dejenere olur, yerini skar dokusuna bırakır (korpus albicans). Gebelik oluşursa, korpus luteum plasenta görevi devralana kadar hormon salgılar (yaklaşık 3 ay).

LH granüloza hücrelerinde progesteron oluşumunu uyarır ayrıca cAMP artar ve FSH etkisini güçlendirir. Folikül sıvısından kaynaklanan östrojen önce negatif geri bildirim ile GnRH, FSH ve LH'ı baskılar. Dominant folikülden siklusun 12-13. gününde aşırı artan östrojen salgısı ve progesteronun etkisi ile hipotalamus ve hipofiz üzerine pozitif geri bildirim sonucu LH ve FSH ovulasyon öncesi pik yapar. Ovulasyon sonrası korpus luteumdan salgılanan progesteron ve östrojen GnRH, FSH ve LH'ı inhibe eder (+ inhibin FSH yı baskılar).

2.5.1. Ovaryum Hormonları

Progesteron, 17- α -dihidroksiprogesteron olarak kolesterolden sentezlenir. Bu olay kanda albümin, östrojen ve progesteron bağlayıcı globülinler bağlı taşınım ile gerçekleşir. Östrojen karaciğerde konjuge edilerek atılır. Progesteron salgılandıktan kısa süre sonra diğer steroidlere yıkılır.

2.5.1.1. Östrojenin Etkileri

Östrojen düzeyleri pübertede artar. Uterus, tüpler, vajina büyür ve fonksiyonel olur. Kadın dış genitalerini büyütür. Vajina epitelini değiştirir, dayanıklılığını artırır. Uterus ve tüp endometriyumunda stromal proliferasyon ve bezlerinde artış yapar. Tüplerdeki siliyer aktiviteyi artırır. Overlerde oogenezi uyarır ve folikül büyümesini başlatır.

Memelerdeki östrojen stromal dokuyu geliştirir. Kanal sistemlerini artırır. Yağ birikimini artırır. Kemiklerde östrojen osteoblastik aktiviteyi artırır. Kemik cismi ve epifizin birleşmesine neden olur. Eksikliğinde matriks de zayıflar. Metabolizmada östrojen protein sentezini ve metabolik hızı hafif artırır. Deri altı yağ dokusunu artırır. Derinin yumuşak ve düzgün olmasını sağlar. Damarlanmasını artırır. Böbreklerde su ve tuz tutulumunu artırır.

2.5.1.2. Progesteronun Etkileri

Uterusta ve tuba uterinalarda; siklusun 2. yarısında endometriyumda ve mukozada sekresyonla ilgili değişiklikleri başlatır. Uterus kasılmalarının şiddetini ve sıklığını azaltır. Memede; alveol hücrelerinin proliferasyonunu artırır.

2.5.2. Menstrüel Döngü

Ortalama 28 gün, kanamanın başladığı gün 1. gün olarak kabul edilir. Folliküler fazda ovum olgunlaşması gerçekleşir. Ardından ovulasyon yani ovumun ovaryum yüzeyinden atılması meydana gelir. Luteal fazda ise korpus luteum oluşumu, endometrium gelişimi, blastokist hazırlığı gerçekleşir. Gebelik oluşmazsa mens oluşur.

2.5.2.1. Menstrüel Döngüde Uterus Değişiklikleri

Periyodik olarak kanda ovaryan hormonların gösterdiği değişikliğe endometriyumun cevabı uterus değişikliklerini içerir.

1-5. günler: Menstrüel faz – uterusun iç yüzeyi endometriyumun en derin parçası hariç dökülür.

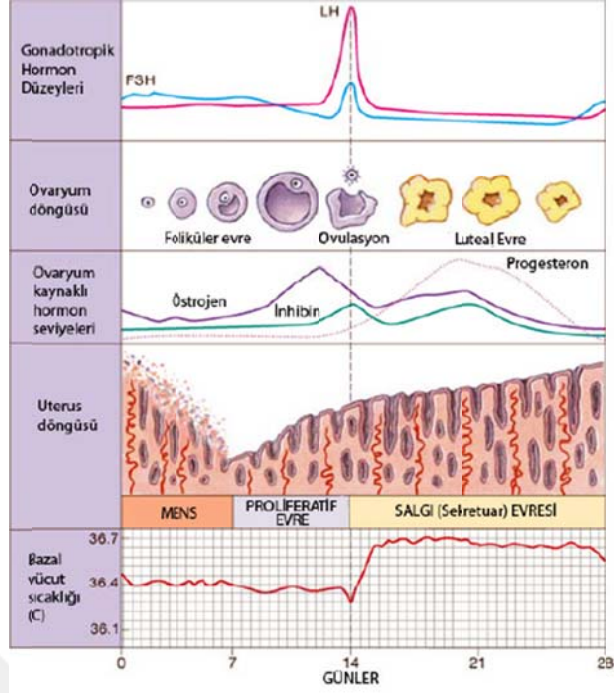
6-14. günler: Proliferatif faz – endometriyum kendini yeniler.

15-28. günler: Sekretuar faz – endometriyum embriyonun implantasyonuna hazırdır.

Overde foliküler faz uterusta proliferatif faza, lüteal faz sekretuar faza karşılık gelir.

2.5.2.2. Menstruasyon

Fertilizasyon oluşmaz ise: progesteron düzeyi azalır. Prostoglandinlerin etkisiyle, spiral arterler kıvrılır ve kasılır endometriyal hücreler ölmeye başlar. Fonksiyonel tabaka kendini sindirmeye başlar. Spiral arterler son bir kez kasılır sonra aniden gevşer ve açılır. Kapiller yataktan sızan kan, lökositler ve soyulan fonksiyonel tabaka dökülür (40 ml kan+35ml seröz sıvı-pıhtılaşmaz) (Şekil 3).



Şekil 3: Menstruasyon

2.5.2.3. Menstrüel Döngünün Endokrin Kontrolü

Lüteal Evre

Granüloza hücreleri korpus luteum'a dönüşerek progesteron salgılanmasını sağlar. Artan progesteron ve östrojen hormonları endometriyumu devam ettirir. İnhibin yeni folikül gelişimini baskılar. Vücut sıcaklığı artar (progesteron etkisi).

Geç Lüteal Evre

Gebelik olursa progesteron artar, östrojen ve inhibin salınımı devam eder. Gebelik yoksa progesteron azalır, östrojen ve inhibin salınımı azalır. Mens gerçekleşirse, FSH artar ve LH sayesinde de yeni folikül gelişir.

2.5.2.4. Kadınlarda Aylık Ritmin Düzenlenmesi

Hipotalamustan (arkuat nükleus) GnRH salgısı her 1-2 saatte bir 5-25 dakika süreyle gerçekleşir. GnRH salgısı sürekli olursa FSH ve LH salgısı kaybolur. Atımlı GnRH salgısı sonucu LH atımlı salınır. Östrojen ve progesteronun negatif geri bildirim etkisi "eklemeli"dir (additive). Korpus luteumdan salgılanan inhibin FSH ve

LH yı baskılar. Ovulasyondan önce östrojen LH üzerine pozitif geri bildirim oluşturur (19,21,22) .

2.6. Kanser

Kanser, köken aldıkları hücre tiplerine bağlı olarak değişik davranışlar gösteren yüze yakın sayıdaki kompleks hastalıkları kapsayan, hücrelerin kontrolsüz büyüme eğilimi ve anormal yayılımını tanımlamak için kullanılan bir olgudur (23,24). Canlıların temel yapı taşı olan hücreler, enzimler, hormonlar ve diğer uyarılar altında, ihtiyaca göre düzenli bir şekilde büyür, bölünür, yaşlanır ve ölürlür (23). Yeni hücrelerin oluşumu, ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar, ancak söz konusu yetenekleri de sınırlıdır, sonsuz bölünemezler. Hücrelerde ortaya çıkan büyüme, gelişme ve ölüm gibi fonksiyonlar düzenli bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu kontrolden kaçan bazı hücreler anormal şekilde proliferasyon göstererek kanser hücresi haline gelmektedir (25). Çoğalan hücreler kan, lenf ya da vücut boşlukları yoluyla primer lokalizasyonları dışındaki yerlere sıçrayarak (metastaz) oralarda da büyümeye devam eder ve yaşamı tehdit etmeye başlarlar. Kanser hücrelerinde meydana gelen yapısal farklılıkların yanında işlevsel farklılıklar da ortaya çıkmaktadır. Yani hücreler ya normalde yaptıkları görevleri yapamazlar ya da bazı yeni fonksiyonlar üstlenirler (23).

Kan ve lenf yoluyla metastaz yaparak diğer organlara taşınan bu hücreler, hücre kültüründe de kontak inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış sinyallere gereksinimi olmama, çoğalmayı baskılayan sinyallere duyarsızlık gösterme, apoptozisten kaçabilme, anjiogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme gibi özelliklere sahiptirler (26).

Kanser çeşitleri, köken aldıkları dokuya göre sınıflandırılırlar. Bazal tabaka hücreleri kendilerinin anormal büyümelerine neden olan mutasyonlara sahip olurlar ve bu hücreler farklılaşma, sakin ve durgun olma yeteneklerini kaybederler. Anormal bölünen hücrelerin bulunduğu bu bölgeler displazi olarak adlandırılır. Displazi alanları; çoğalan, mutasyon taşıyan ve farklılaşmada başarısız olan hücrelerle yıllar süren bir period boyunca gelişirlerse karsinoma olarak adlandırılır (24). Kanserin yaklaşık % 85'i epitelyal hücrelerden köken alan karsinomlardan oluşmaktadır.

Mezoderm hücrelerinden (kemik, kas gibi) köken alan kanserler sarkom, meme hücreleri gibi salgı bezi hücrelerinden köken alanlar ise adenokarsinom olarak tanımlanmaktadır. İnsan sağlığına etkileri açısından değerlendirildiğinde kanserler benign ve malign olarak tanımlanır. Benign tümörler metastaz yapmazlar ancak malign tümörler metastazik özellikteki tümörlerdir.

2.6.1. Kanser Hücre Özellikleri

Kanser hücrelerinin yüzeyindeki reseptörler daha sık sinyal alır. Kontrolsüz şekilde çoğalmayı sağlayan kendi sinyal sistemleri vardır. Yandaki hücreye temas sonrası bölünmeyi durdurmaz ve büyümeye ve çoğalmaya devam eder. Sağlıklı hücreler her tipteki besini kullanabilirken kanser hücreleri sadece glikolizden gelen glukozu kullanabilirler. Şekeri normal hücreler oranla yaklaşık 100 kat fazla olarak kandan alırlar ve laktat üreterek enerji sağlarlar (Warburg etkisi). Gerekli besin ve oksijeni almak üzere çevrelerindeki stromayı etkileyerek yeni damar sistemleri oluşturabilirler (neo-vaskülarizasyon). Telomerlerini sabitleyerek veya telomeraz aktivitesini koruyarak sonsuz şekilde replike olup çoğalabilirler. Dolaşım sistemine girip uzaktaki bir yere hareket edebilir ve yeni bir yerleşerek kanserleşmeyi başlatabilirler (metastaz). Apoptozdan kaçabilirler. Genetik ve epigenetik olarak stabil değildirler (27).

2.6.2. Kanserinin Tedavisi

Kanserin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemleri en sık başvuru yöntemleri olmakla birlikte, hormon terapisi, biyolojik ve alternatif tıp yöntemlerinin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar da diğer yöntemlere destek olacak şekilde birlikte veya tek başına kullanılabilir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması, tedavilerin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle tek bir kesin tedavi yönteminin varlığından bahsetmek imkânsızdır (27).

2.6.3. Ovaryum Kanseri

Vücutta 60'dan fazla organda görülen kanser tipleri arasında over kanseri kadınlarda en çok görülen beşinci kanser türü olup, jinekolojik malign tümörlerin en ölümcül olanıdır (9,28,29).

2.6.3.1. Ovaryum Kanseri Epidemiyolojisi

Dünya çapında her yıl yaklaşık 106,000 kadın over kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir (30). Amerikan Kanser Derneği tarafından 2016 yılında yayınlanan kanser istatistik raporuna göre, ABD 22.280 ovaryum kanseri hastası ile yeni ovaryum kanseri ölümlerinin 14.240'a ulaşacağı bildirilmiştir. Çin'in kanser istatistikleri raporunda, 2015 yılında yeni ovaryum kanseri vakalarının 52.100 vaka ve 22.500 kadar ölüme neden olduğu bildirilmiştir (31). T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Dairesi verilerine göre 2008 yılında over kanserinin görülme sıklığı yüz binde 6,9'dur. Yine WHO verilerine göre 2008 yılında Türkiye'de 1804 kadının over kanseri teşhisi aldığı ve 1247 kadının over kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir.

Son 10 yıl içinde ovaryum kanseri vakaları % 30, buna bağlı ölümler ise % 18 oranında artmıştır. Hayat boyunca bir kadının over kanseri geliştirme riski 1/70'dir. Ovaryum kanseri jinekolojik kanser ölümlerinin en sık sebebi olması nedeni ile jinekolojik onkolojide çok önemli bir yer tutar (32). Ovaryum kanseri olan hastaların toplam tedavi oranı % 30'dan düşüktür ve 5 yıllık sağkalım oranı % 38' dir, yani daha etkili bir tedaviye acilen ihtiyaç vardır (9,33). Tüm ovaryum kanseri vakalarının % 70 kadarı, agresif bir şekilde büyüyen, hızlı bir şekilde metastaz yapan ve yüksek kromozomal instabiliteye sahip olan yüksek dereceli karsinomlardır (34). Over kanseri yüksek seviyede metastazın gerçekleştiği, bundan dolayı da geç tanı koyulmuş vakalarda tedavisinin zor olduğu bir kanser tipidir. Bu kanser Faz I safhasında iken tespit edildiğinde hastanın 5 yıllık sağkalım oranı %90'ı geçerken, hastalık Faz III veya Faz IV safhasına ulaştığında bu oran %20'nin altına düşmektedir. Over kanseri kemoterapiye direnç gösteren bir kanser türüdür ve genellikle ilk tedaviden sonra ortalama ilk 20 ay içinde tekrarladığı görülür (28).

2.6.3.2. Ovaryum Kanseri Histopatolojik Sınıflandırması

Cerrahi tekniklerde ve doğru şekilde tasarlanmış kemoterapi rejimlerinde ileri düzey gelişmeler olsa da, ilerleyici hastalık olan ovaryum kanserli hastalarda nükslerin kaçınılmaz olduğu düşünülmektedir (35). Ovaryum kanserinin yaygın metastazını önlemek için hiçbir anatomik engel yoktur. Kansere bağlı mortalitenin % 90' ının ana sebebi metastazdır.

Epitelyal ovaryum kanseri ise, ovaryum kanseri vakalarının yaklaşık % 90' ını oluşturur (36). Özellikle, epitelyal ovaryum kanserlerinde, tanı konulduğunda vakaların çoğunluğunda tümör metastaz ile ortaya çıkmıştır. Günümüzde primer tedavi olarak agresif cerrahi sitoreduksiyon ve kemoterapi uygulanmış, ovaryum kanseri hastaları bu tedavilere yanıt vermiştir. Bu nedenle, terapötik ajanları tarafından tümör metastazının blokasyonu ovaryum kanseri tedavisi için çok önemlidir (31). Son yıllarda, ovaryum kanserli hastaların genel sağkalım oranı, cerrahi, kemoterapi ve moleküler hedefli tedavi dahil olmak üzere tedavilerin gelişimi ve kombinasyonları nedeniyle belirli bir ölçüde gelişmiştir (29). Ovaryum kanseri histolojik ve genetik olarak epitelyal ve germ hücre kaynağını içeren geniş bir maligniteyi kapsar. Hücre tipinin kökenine göre farklı türde ovaryum kanserleri vardır. Ovaryum kanserlerinde; epitelyal ovaryum kanseri (EOC), gonadal-stromal ve germ hücresi kanserleri, sırasıyla, % 90, % 6 ve % 4'lük insidansa sahiptirler. Epitelyal ovaryum kanseri, selomik epitelyum veya mezotelyumdan gelişir diğerleri, primordial germ hücreleri, ovaryan stromal veya mezenşim ve seks kordonundan kaynaklanır. Bazı faktörler yaşlılık, nulliparite, aile öyküsü, infertilite ve endometriyozis gibi yüksek ovaryum kanseri riski ile ilişkilidir; öte yandan, oral kontraseptif kullanımı, salpingo-ooferektomi, tubal ligasyon, histerektomi ve laktasyon gibi faktörlerin daha koruyucu bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (35). Epitelyal over kanseri insidansı yaşla birlikte artarak 7. dekada maksimuma ulaşsa da, reproduktif dönemde de görülebilmektedir. Çocuk doğurma yaşının ileri yaşlara kayması ile reproduktif dönemde olup da epitelyal over kanseri tedavisi gerektiren hasta sayısı artmış, doktorlar fertilite korunması gibi bir problemle yüzyüze gelmiştir. Epitelyal olmayan over kanserlerinde fertilite koruyucu cerrahi yüz güldürücü olmakla beraber daha malign seyirli olan epitelyal kanserlerde overlerin

korunması fikri jinekolojik onkologları zorlamaktadır. Çalışmalar göstermiştir ki stage 1A grade 1 grubundaki kanserler fertilitate koruyucu cerrahi için güvenlidir. Epitelyal over kanserlerinin fertilitate koruyucu yaklaşımında kanserin histolojik tipi de büyük önem taşımaktadır. Epitelyal over kanserleri progresyon açısından clear cell ve non-clear cell şeklinde ayrılmış; agresif seyreden clear cell grubu kanserler grade 3 şeklinde değerlendirilmiş, bu nedenle overlerin bırakılmasının uygun olmadığı şeklinde düşünülmüştür. FIGO'nun jinekolojik kanser tedavi sonuçlarını sunan 26. yıllık raporuna göre epitelyal over kanserlerinin % 7,2'si 40 yaşın altında; % 2,7'si ise 29 yaşın altındadır. 40 yaşın altındaki bu hastaların % 60'ı stage 1 de tanı almaktadır. Bu nedenle fertilitatesini tamamlamamış bu genç hastaların fertilitate preservasyonu hasta ve hekimler için büyük önem taşımaktadır (37).

Ovaryum dokusu birçok farklı hücreyi barındırır. Bu yüzden ovaryum kanserleri; epitelyal, stromal ve germ hücreler olmak üzere üç farklı hücre tipinden köken alırlar. Epitelyal hücreden meydana gelen ovaryum kanserleri tüm ovaryum kanserlerinin % 90'nından fazlasını oluşturur ve histolojik özelliklerine göre seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli, değişici epitel hücreli, farklılaşmamış ve az farklılaşmış gibi alt gruplara ayrılırlar. Bunlar içerisinde en sık görülen tip ise seröz tiptir (38). Ovaryum kanseri olan hastaların genel sağkalım oranını iyileştirmek için, yeni çalışmalar, fizyolojik ve biyolojik olarak kullanılabilir, aynı zamanda maliyet-etkin olan yeni, etkili ve toksik olmayan tedavi stratejilerinin yanı sıra nutrisötikler bulmayı hedeflemiştir (36).

Ovaryum, farklı embriyolojik kökenli dokuların bir araya gelmesi ile oluşan ve neoplazilere yatkınlığı bulunan bir organdır. Bu farklı dokulardan kaynaklanan tümörler oldukça fazla sayıda ve karmaşıktır. Ovaryumun malign tümörleri aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir; .

- Epitelyal ovaryum tümörleri
- Germ hücreli tümörler
- Stromal tümörler
- Ovaryum sarkomu
- Ovaryumun metastatik tümörleri

Epitelyal ovaryum tümörleri: Tüm ovaryum kanserlerinin %90'ını oluştururlar. Bu kanserler ovaryumun dışını saran germinal epitel hücrelerinden

kaynaklanmaktadır. Seröz kist adenokarsinom, müsinöz kist adenokarsinom, endometrioid karsinom, farklılaşmamış kökenli karsinom ve berrak hücreli karsinom olarak gruplara ayrılır. Tüm epitel kökenli ovaryum tümörlerinin %15'i sınır çizgisinde bulunur yani kanseröz değildir ve düşük malignite potansiyelleri bulunmaktadır.

Germ hücre tümörleri: Tüm ovaryum kanserlerinin %3'ünü oluşturan germ hücre tümörleri ovaryumdaki oositlerden kaynaklanmaktadır. Çoğunlukla ergenlikte ve genç bayanlarda gözlenir. Çok hızlı ilerlemesine rağmen tedaviye duyarlıdır. Hastaların yaklaşık %90'ı tedavi edilebilmekte ve fertiliteleri de devam edebilmektedir.

Stromal tümörler: Tüm ovaryum kanserlerinin % 6'sını oluşturan bu tümörler bağ dokusundan ve östrojen-progesteron üreten hücrelerden gelişir. Stromal tümörler yayılmazlar ve prognozları iyidir. Eğer yayılırsa tedavisi diğer türlere göre çok daha zordur. Stromal tümörlerin yarısından fazlası menopoz sonrası dönemde görülür. Teratomalar ve fibromalar, granüloza hücre tümörleri, granüloza teka tümörleri ise habis olanlarıdır.

Sınır-çizgi ovaryum tümörleri: Ovaryum tümörlerinin yaklaşık % 15'i "sınır çizgi (borderline)" olarak sınıflandırılır. Çünkü mikroskop altındaki görünüşleri habis ile selim arasındadır. Bu tümörler genellikle "düşük malignite potansiyeli olan karsinomlar" olarak nitelendirilirler, nadir olarak metastaz yaparlar ve ölüme sebep olurlar. Sınır çizgi karsinomlar ovaryumdan dışına yayılırsa % 10-20 oranında ölümcül olmaktadır (39).

2.7. Apoptozis

Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazisi bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogenezinde rol aldığı ve özellikle artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (40).

Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz yunanca ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelir. Apo: ayrı, Ptosis: düşme demektir. Apoptoz

terimi ilk kez 1972’de Avusturyalı bir patolog olan J.F.K. Kerr tarafından tanımlanmıştır. Apoptoz genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazi koruyan bir olaydır (41).

Programlı hücre ölümü, hücre içi bir programın aracılık ettiği düzenlenmiş hücre ölümü olarak tanımlanır. Apoptozun başlangıçta programlanmış hücre ölümünün tek şekli olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, son on yılda, programlanmış hücre ölümü otofaji ve nekrozis olarak adlandırılan nekrozis (programlanmış nekroz) şeklini kapsayacak şekilde genişlemiştir. Programlı hücre ölümü, özellikle apoptoz ve nekrotoz, malign hücrelerin hayatta kalmasını ve yayılmasını engelleyen doğal süreçlerdir. Bununla birlikte, kanser hücreleri, programlanmış hücre ölüm yollarının anahtar modülatörlerinde genetik mutasyonlar veya epigenetik modifikasyonlar oluşturarak programlanmış hücre ölümlerinden kaçınmak için çeşitli stratejiler geliştirirler (42).

Metastaz kanserin, daha ilerlemiş bir evre ve daha kötü bir prognozunu gösteren önemli bir adımıdır. Kanser metastazı için hücre dışı matrisin (ECM) bozulması, epitelyal-mezenşim geçişi (EMT), tümör anjiyogenezi, enflamatuar tümör mikroçevresinin gelişimi ve programlanmış hücre ölüm mekanizmalarının işlev bozukluğu dâhil olmak üzere birçok hücreyel süreç gösterilmiştir. Bu hücreyel olaylar sırasında metastatik bir hücre tarafından yapılan hatalar hücre ölümüne yol açabilir. Bu nedenle, hücre ölümünün regülasyonu, kanser hücrelerinin metastaz sırasında hayatta kalması için kritiktir.

2.7.1. Apoptotik Hücredeki Değişiklikler

Apoptoz hücrenin kendini yok etmek için bir takım metabolik ve fizyolojik işlemleri devreye soktuğu bir olaydır. Yaklaşık 30 – 60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir. Elektron mikroskopunda apoptoz uyarısı alan hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını koparır ve büzülür, kromatini yoğunlaşır piknotik bir görünüm alır, sitoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan “Apoptozis İndükleyici Faktör” salınımı

oluşur. Hücre zarı yapısında bulunan fosfotidil serin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olur. Çekirdek küçülür, parçalara ayrılır. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, ancak enflamasyon görülmez (41,43).

2.7.2. Apoptoz Mekanizması

Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynar. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alır (41)

Apoptozisin indüklenmesinde üç prototip sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir.

- Mitokondri / Sitokrom-C Aracılı Apoptozis Oluşturulması
- Hücre Yüzeyindeki Reseptörlere Bağlanan Ölüm Aktivatörleri İle Tetiklenme
- Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması

Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumlarında serbestlenen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil eder. Bu yolda mitokondri tarafından kontrol edilen apoptotik proteaz aktive edici faktor (Apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır. Ko-faktör nükleotid trifosfat (d-ATP ve ATP) ile aktive edilen sitokrom-c ve apaf-1 birleşerek prokaspaz-9'u aktive eder. Aktive kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar. Sağlıklı bir hücre mitokondrisinin dış membranında Bcl-2 proteini yer alır. Bcl-2, Apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlar. Bcl-2 neden olduğu internal hasarla mitokondride çatlaklar oluşturarak Apaf-1 ve Sitokrom-C salınımına yol açar. Bu iki protein kaspaz-9 moleküllerine bağlanır. Bu proteolitik aktivitenin kaskadı kan pıhtılaşması ve kompleman aktivasyonuna benzer. Terminal uç kaspaz-3'tür. Bu proteolitik

aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır (44).

Dış Sinyallerle Apoptozisin Tetiklenmesi

Birbirini tamamlayan ölüm aktivatörlerinin (Fas-L ve TNF) hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8' i aktive eden sinyaller yayılır. Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar. SCI reseptörleri Fas ve p-75 ile bağlantılıdır. Bu reseptörler tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesinin üyeleridir. Bunların apoptotik hücre ölümünü başlatan kaspaz kaskadını aktive ettiği bilinmektedir. Diğer sistemlerde de oligodendrositlerde olduğu gibi apoptozis oluşumunda Fas ve p-75'in sorumlu olduğu gösterilmiştir. Fas reseptörünün, Fas ligand (Fas-L) ile karşılıklı etkileşimi FADD (Fas bağımlı ölüm domain proteini) aracılığı ile olur ve bunun sonucunda da kaspaz-8 aktive edilerek apoptotik döngü başlar (44).

Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz- 12'ye bağımlı endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir. Bu yol mitokondrial / sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin ER'yi etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder. Son çalışmalar, in vivo ve in vitro olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermiştir (44).

2.7.3. Patolojik Durumlarda Görülen Apoptoz Olayları

Diyabet, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, bağışıklık sistemi hastalıkları, folliküler atrezi, viral enfeksiyonlar, tümörlerde hücre ölümü (hem büyüme hem de regresyon aşamasında), AIDS, aterosklerozis, miyokard infarktüsü,

organ transplantasyonları, oksidatif stres, alkolizm canlıda apoptoza neden olur (41). Hormonlara bağı dokularda patolojik atrofi (kastrasyon sonrası prostat atrofisi, glukokortikoid kullanımı sonrası timusta lenfosit kaybı vb.) Parankimden zengin dokularda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofi (pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi). Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (otoimmün hastalıklar). Çeşitli etkenlerle oluşan hücre ölümü (radyasyon, antikanser ilaçları, hipertermi, hipoksi, travma) (44).

Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır. Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyaran sonucu sekonder olarak gelişir.

Hücre dışı uyaranlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler de (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir. Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (40).

2.7.4. Apoptoz ve Kanser Metastazı

Kanser metastazı beş ana aşamaya bölünebilen karmaşık bir süreçtir:

İlk adım olan invazyon, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerindeki değişikliklerin neden olduğu artan hücre motilitesi ile karakterizedir.

İkinci adım, tümör hücrelerinin birincil bölgeden kaçtığı ve dolaşım sistemlerine göç ettiği, intravasasyondur.

Üçüncü adım, yayılma, kanser hücrelerinin damar duvarlarına yapıştığı veya boyut kısıtlamaları nedeniyle bu bölgelerde gözaltında tutulduğu bir kılcal yatağa ulaşmak için dolaşım sistemlerinden dolaşan malign hücrelerin işlemidir.

Dördüncü aşama, kanser hücrelerinin damarlarını hedef organlarına girmesine izin verdiği ekstrasvazyondur. Kolonizasyon, metastatik hücrelerin çoğaldığı ve mikrometastaz veya makrometastazlar oluşturduğu son adımdır. Alternatif olarak, metastaz, yeni bir perspektife göre iki fazlı bir süreç olarak düşünülebilir: birinci

aşama, bir kanser hücresinin uzak bir organa fiziksel translokasyonunu içerirken, ikinci faz, kanser hücrelerinin gelişim sürecini uzak bölgedeki metastatik lezyon. Tipik olarak, metastazın başlangıç aşamaları (invazyon, intravasasyon, yayma ve ekstrasvazasyon) çok yüksek bir verimde ilerler, ancak son adım, kolonizasyon, daha az etkilidir. Dolaşımdaki tümör hücrelerinin sadece% 0.01'inin nihai olarak makrometastaz ürettiği tahmin edilmektedir. Bu verimsizlik, hücrelerin yeni bir ortama ulaşmasından önce veya sonra çeşitli stresler ile hücre ölüm mekanizmalarının aktivasyonu ile yakından ilişkili olabilir.

Bu tür stresler arasında, hücre hücre temaslarının kaybı, kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınması ve yok edilmesi ve gerekli büyüme faktörlerinin olmaması, bunların hepsi apoptoz, otofaji ve nekrotoz dahil olmak üzere programlanmış hücre ölümünü tetikleyebilir (40–42,45).

2.7.4.1. Apoptotik Sinyal Yolu

İki temel apoptotik sinyal yolu vardır: ekstrinsik ve intrinsik yollar.

Intrinsik apoptotik yol DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve oksidatif stres de dâhil olmak üzere çeşitli hücre içi uyarılar tarafından aktive edilir. Procaspase-9, apoptotik protea-önleyici faktör (Apaf-1) ve sitokrom c'den oluşan apoptozom olarak adlandırılan bir kompleksin oluşumuna dayanır. Bax, Bak, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi bir dizi Bcl-2 aile üyesi, mitokondriyal membran permeabilizasyonunu düzenleyerek sitokrom c salınmasını kontrol eder.

Ekstrinsik apoptotik yol, ölüm ligandlarının [örneğin Fas ligandı (FasL), TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ve TNF-a] 'nın TNF reseptörü süper ailesinin ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla başlatılır. Bu etkileşimin Fas ile ilişkili ölüm bölgesi (FADD) proteini ve procaspase-8 / 10'dan oluşan ölüm indükleyen sinyalleşme kompleksinin (DISC) montajı takip eder. Daha sonra DISC, hücre ölümünü doğrudan indüklemek için aşağı akış efektör kaspazlarını (kaspaz-3, 6 ve 7) aktive eder veya mitokondri aracılı intrinsik apoptotik yolağı aktive etmek için Bcl-2 aile üyesi teklifini tBid'e ayırır. P53, apoptoz proteinlerinin hücrel inhibitorü (cIAPs) ve NF-κB gibi birçok faktörün apoptotik yolların düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. Kanser tedavisi için apoptotik yolları hedef alan birçok küçük

molekül geliştirilmiştir. Bu moleküler yollar kullanılarak tedavi seçenekleri geliştirilmektedir (40–42).

2.7.5. Apoptoz'un Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Tablo 1 : Apoptozda kullanılan yöntemler

Morfolojik görüntüleme yöntemleri 1. Işık Mikroskobu a. Hematoksilen Boyama b. Giemsa Boyama 2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop a. Propidium İyodür (PI) b. Hoechst Dye 3. Elektron Mikroskobu 4. Faz Kontrast Mikroskobu	İmmunohistokimyasal yöntemler 1. Anneksin V Yöntemi 2. TUNEL Yöntemi 3. M30 Yöntemi 4. Kaspaz-3 Yöntemi
Biyokimyasal yöntemler 1. Agaroz Jel Elektroföresi - DNA fragmentasyonu 2. “Western Blotting” Substrat kırılmaları - Aktif kaspaz'ın belirlenmesi - Sitokrom c saliverilmesi 3. “Flow” Sitometri	İmmunolojik yöntemler 1. ELISA - DNA Fragmentasyonu - M30 Düzeyi 2. Fluorimetrik Yöntem - Kaspaz Aktivasyonu
Moleküler biyoloji yöntemleri - DNA Microarrays	

Bu çalışmada yukarıdaki tabloda belirtilen yöntemlerden TUNEL yöntemi kullanılmıştır (43,44).

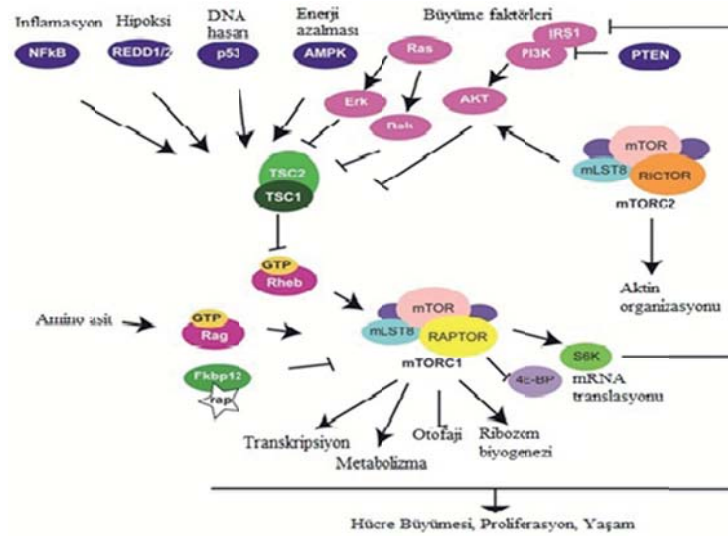
2.7.5.1. TUNEL Yöntemi (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP transferase-mediated nick end-labeling*)

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Konvansiyonel parafin kesitleri ya da hücre kültürü örneklerini, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak “*TdT-dUTP nick-end-*

labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır (43).

2.8. PI3K / AKT / mTOR Sinyal Yolu

Kanserde önemli olduğu saptanan üç büyük sinyalizasyon yolu arasında Fosfoinositol 3 kinazla (PI3K)/ AKT kinaz zinciri, protein kinaz C ailesi (PKC) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/Ras sinyalizasyon zincirleri yer almaktadır. Önemli bir sinyal yolu olan PI3K/AKT/mTOR proteinin işlev süreci, reseptör tirozin kinazlar ile yakın ilişkilidir. Damar endoteli büyüme faktörü (VEGF) reseptörünün (VEGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptör-a, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), c-Met gibi çeşitli reseptör tirozin kinaz (RTK)'lar kanser hücrelerinden salınabilir. Bu RTK'lar için kanser hücrelerinin fonksiyonunu biçimlendirmede PI3K/ AKT/ mTOR sinyal yolunu kullanmaktadır. Bu yollar hücre profilerasyonunda ve tümörögenizde önemlidir. Bunlardaki bozukluklar birçok kanserin patogeneğinde yer almaktadır. Kanser hücrelerinde pek çok farklı mekanizma PI3K/AKT/ mTOR yolunun yapısal aktivasyonu ile sonuçlanabilir (Şekil 4) (45–47).



Şekil 4: PI3K/AKT/ mTOR sinyal yolu

Ovaryum kanserinde yüksek nüks oranı ve düşük sağkalım, geleneksel tedaviye ek olarak daha spesifik bir terapötik yaklaşımın gerekli olduğunu

düşündürmektedir. Translasyonel ve klinik araştırmalar, tümör büyümesini etkilemek ve antiproliferatif ajanların toksisitesinin örtüşmesini en aza indirmek için alternatif bir yol bulmak amacıyla yeni moleküler hedefler araştırılmaktadır. Hücre büyümesi, motilite, sağkalım, proliferasyon, protein sentezi, otofaji, transkripsiyon ve anjiyogenezin düzenlenmesi dâhil olmak üzere pek çok hücrel aktivitede rol aldığı düşünüldüğünde, PI3K / AKT / mTOR en fazla araştırılan hücre içi sinyal yollarından biridir. Bu yolun bir de-regülasyonu over kanseri de dâhil olmak üzere birçok tümörde gösterilmiştir (48). Birçok insan malignitesinin büyümesinde, çoğalmasında ve metastazında önemli bir rol oynar. Önceki genomik çalışmalar, bu yolun, yumurtalık karsinomasında diğer malignitelere kıyasla daha sık mutasyon değişiklikleri geçirdiğini öne sürmüştür. Biriken deneysel kanıtlar ayrıca, PI3K / AKT / mTOR sinyalleşmesinin, yumurtalık kanseri özelliklerinin ve yumurtalık kanserinin kötü prognozlarının edinilmesinden sorumlu olduğunu göstermektedir. CCN 1 ailesinin büyüme faktörlerinin bir üyesi olan Cyr61'in over kanseri hücreleri / dokularında yüksek oranda eksprese olduğu ve hastalığın kötü prognozu ile ilişkili olduğu bilinmektedir. CCN1' in over kanseri hücrelerinde PI3K / Akt / mTOR kaskadı modüle ettiği gösterilmiştir. Metformin ile CCN 1 sinyalleşmesini hedefleyerek over kanser hücrelerinin onkogenik potansiyelini inhibe ettiği ortaya konulmuştur (49).

Bir çalışmada, ERS'nin PI3K / AKT / mTOR yolağının aktivitesini baskılayarak over kanseri SKOV3 hücrelerinin apoptozunu indüklediğini ortaya çıkarmıştır (50). Ayrıca mTOR ve PI3K / Akt, serin / treonin kinazın sinyal yolları birincil otofaji düzenleyici yollar olarak kabul edilir ve kapsamlı olarak araştırılmaktadır (51).

Geçtiğimiz on yılda, kanser kök hücrelerine (CSC'ler) benzer hücreler, akciğer, göğüs, kolon ve karaciğer gibi çeşitli katı tümörlerde tanımlanmıştır. CSC'lerde PI3K / Akt ve mTOR sinyal yollarının memeli hedefi, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, metabolizma, farklılaşma ve sağkalım gibi birçok fizyolojik ve patolojik durum için çok önemlidir (13).

2.8.1. PI3K Sinyal Yolu

Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolu, onkojenleri ve birçok reseptör sınıfını birçok temel hücresel fonksiyonlara bağlayan kritik bir sinyal transdüksiyon sistemi, insan kanserinde belki de en yaygın olarak aktive edilen sinyal yoludur. Bir p110 katalitik alt birimi ve bir p85 düzenleyici alt birimden oluşan heterodimerlerdir. Düzenleyici alt birim, enzimin reseptör bağlanmasına, aktivasyonuna ve lokalizasyonuna aracılık eder. Memelilerde, p85 α kodlayan üç gen, PIK3R1, PIK3R2 ve PIK3R3 vardır. Büyüme faktörü stimülasyonuna ve RTK'lerin müteakip aktivasyonuna cevaben PI3K, p85 alt ünitesinin, aktive edilmiş reseptörler üzerindeki tirozin fosfat motiflerine doğrudan (örn. PDGFR) veya reseptörler ile bağlantılı adaptör proteinlerine (örn., insülin reseptör substratı) etkileşmesiyle membrana işlenir. Aktive edilmiş p110 katalitik alt-birimi fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat, PI (3,4,5) P3 üretir, bu da çoklu akış sinyalizasyon yollarını aktive eder. PI3K orijinal olarak onkogenler ve aktive edilmiş RTK'lere bağlanmasıyla yirmi yıl önce karakterize edilmiş olmasına rağmen, 1990'ların sonlarına kadar, tümör baskılayıcı PTEN'in bir PI3-lipid olarak işlev gördüğü gösterildiğinde insan kanseri ile ilişkisi saptanmamıştır. Son zamanlardaki kapsamlı kanser genomik analizleri, PI3K yolunun çoklu bileşenlerinin ortak insan kanserlerinde sık sık mutasyona uğratıldığını veya değiştirildiğini ve bu yolun kanserdeki önemini vurguladığını ortaya koymuştur (10).

Kanserde fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) değişikliği, malignitenin önde gelen bir nedeni olarak değerlendirilmiş ve PI3K inhibitörleri, SKOV-3 ovarium kanseri hücre hattı'nın kontrolü için geniş çapta çalışılmıştır (50).

İn vivo kanser hücre hatlarından, in vitro ve hayvan modellerine kadar tüm deneysel veriler, **antosiyanın ve antioksidanların** antitümör etkilerinin ana moleküler mekanizmasının, Ras-MAPK ve PI3K / Akt sinyal kaskadı yolları üzerinde etki ederek, RTK'leri (EGFR, PDGFR ve VEGF / VEGFR) hedefleyerek kanser hücresi büyümesini ve metastazının inhibisyonuna aracılık ettiğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda siyanidinlerin, kanser hücrelerinde PI3K / Akt yolunu inhibe ederek kanser hücrelerinin invazyonunu azalttığı ortaya konulmuştur (52).

PI3K molekülü, ovaryum ve servikal kanserlerde aşırı eksprese edilir. Mutasyonları meme kanseri, glioblastoma ve mide kanserinde de gözlenmiştir. PI3K sinyal yolunun aktivasyonu, tümör protezinin tüm önemli yönlerinden sorumlu olan hücre çoğalmasına, hayatta kalmasına ve hareketliliğine ve aynı zamanda anjiyojeneze de katkıda bulunur. Bu nedenle, birçok ilaç şirketi ve akademik laboratuvar, PI3K ve diğer kilit bileşenleri hedef alan inhibitörleri aktif olarak geliştirmektedir. AKT ve mTOR dâhil olmak üzere, bu sinyal yolundaki PI3K izoformlarını ve diğer ana düğümleri hedefleyen inhibitörler prelinik çalışmalara ulaşırsa da, önemli sorunlar devam etmektedir (10). Bu çalışmada PI3K yolunun ovaryum kanserinde antosiyanın ve antioksidan içeriğe sahip olan *Aronia Melanocarpa* tarafından inhibisyonunu ve kanserde PI3K yolunu hedefleyen ajanlara ek olarak bir ekstraktın daha olabileceğini kanıtlayarak terapötik gelişime katkıda bulunmaya çalışmaktayız.

2.8.2. mTOR Sinyal Yolu

mTOR (Mammalian target of rapamycin- Rapamisin'in Memelilerdeki Hedef Molekülü), büyüme faktörleri, besinler ve mikro çevresel değişimlere yanıt olarak hücrel büyüme koordine etmekte bütünsel bir rol oynar. mTOR, PI3K ilişkili kinaz ailesinin bir üyesi olan bir 289-kDa hücre içi serin / treonin kinazdır (53,54). mTOR katabolik ve anabolik metabolizmalar arasında anahtar görevi görür.

Rapamycin, mTOR kinazını spesifik olarak inhibe ettiğinden "mTOR" kısaltması "rapamycin'in memelilerdeki hedefi" için kullanılır (55).

Rapamisin (sirolimus), 1975 yılında Rapa Nui'de toprak mahsullerinden doğal olarak üretilmiştir. Başlangıçta immün supressif özelliklere sahip antifungal bir ajan olarak kullanılmıştır. Bunun memeli analogu ise mTOR olarak tasarlanmıştır. Rapamisin 1980'li yıllarda Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından antikanser aktivitesi yönünden analiz edilmiş ve geniş antikanser aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonraları 1990'larda rapamisinin substratı TOR olarak tanımlanmıştır. Antikanser ajanlar olarak mTOR inhibitörlerinin ortaya çıkışı ana molekülden ziyade rapamisin analogları ile başlamıştır. Güncel olarak bu analoglar temsirolimus, everolimus, ridaforolimus ve deforolimustan oluşmaktadır. mTOR inhibitörlerinin kanserli hastalarda güvenilirlikleri ve etkinlikleri kanıtlanmıştır. mTOR inhibitörleri ile yapılan klinik çalışmalar uzun süreli objektif tümör yanıtı sağlamıştır. mTOR

inhibitörü ilaçların meme, lenfoma, akciğer, mide ve sarkom ve over kanserlerini içine alan çeşitli solid tümörlerde etkinliği gösterilmiştir (46,53,54).

2.8.2.1. mTOR'in Görevi

mTOR yolu, hücre büyümesi ve proliferasyonunun önemli bir düzenleyicisidir ve yapılan çalışmalar, deregülasyonun, kanser ve diyabet dâhil olmak üzere insan hastalıklarıyla ilişkili birçok mekanizmada bu yolun etkili olduğunu göstermektedir. mTOR yolu, otofaji, ribozom biyogenez ve metabolizma dâhil olmak üzere birçok süreci düzenlemek için besinlerden, enerji durumundan ve büyüme faktörlerinden gelen sinyalleri birleştirir. İki yapısal ve işlevsel olarak farklı mTOR içeren multiprotein kompleksleri ve tüberoz skleroz protein 1 ve 2 (TSC1 / 2), *Ras homolog enriched brain* (rheb) ve aktive edici protein kinazlar (AMPK)'ı mTOR'un up-regülatörleri olarak tanımlayan son çalışmalar, mTOR'un farklı sinyalleri nasıl algılayabildiğini ve sayısız tepki üretebildiğini ortaya çıkarmaya başlamıştır (56). Son yirmi yılda yapılan kapsamlı araştırmalar, protein sentezinden otofajiye kadar pek çok temel hücre sürecini düzenleyen mTOR için merkezi bir rol oynamıştır ve deregüle edilmiş mTOR sinyali kanser ve diyabetin yanı sıra yaşlanma sürecinin ilerlemesinde de rol oynamaktadır (53).

mTOR sinyalleme, hipoksi-indüklenebilir faktör 1 (HIF-1) ekspresyonunu artırabilir, bu da vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) -A'nın üretim ve sekresyonunda eş zamanlı bir artışa neden olur.

Aktif mTOR sinyallemesine sahip bazı tümörler yüksek derecede vaskülarize edilmiştir. Bu nedenle, mTOR yolağının hedeflenmesinin, tümör anjiyogenezini inhibe etmede etkili bir yol olabileceğine inanılmaktadır. mTOR; PI3K aktivasyonunun sinyal iletiminde etkili temel bir kinazdır ve PI3K/AKT sinyal transdüksiyon yolağının bir bileşenidir.

mTOR yolu, insan epidermal büyüme faktörü reseptörleri 1-4 (HER1-4), PDGFR/KIT ve insülin büyüme faktörü reseptörü (IGFR) gibi aşırı eksprese edilmiş veya mutasyona uğramış tirozin kinaz reseptörleri dâhil eksojen onkogenler ile aktive edilebilir ve Ras doğrudan PI3K p110 alt ünitesine bağlanır. mTOR sinyal iletiminde, ribozomal protein S6 kinaz beta-1 (S6K1) veya ökaryot translasyon başlatıcı faktör 4E (eIF4E)'ünün aşırı ekspresyonu ve/veya amplifikasyonu da

onkogeneze katkıda bulunabilir. Ancak, kanserde mTOR aktivasyonu için bir gerekçe daha vardır. Aktifleşen p53, mTOR negatif düzenleyicisi olarak etkiye bulunur. Örneğin, glukozdan yoksun kalınan koşullarda, kanserde p53 fonksiyonu sıklıkla ortadan kalkar ve böylece bu durum mTOR yapısal aktivasyonunun lehine olabilir. mTOR inhibitörü ilaçlar, hücre içi protein olan FK506 bağlayıcı protein-12 (FKBP-12) ile kompleks oluşturarak raptor'un mTOR'a bağlanmasını engelleyerek mTOR aktivitesini önlerler (46).

mTOR proteini sitoplazmada bulunan mTORC 1 ve mTORC 2 olmak üzere iki yapısal ve fonksiyonel olarak ayrı kompleksden oluşur. mTORC 1, m RNA translasyonunu, ribozom biyogenezini, otofaji ve metabolizmayı düzenleyerek hücre büyümesini kontrol eder ve bu aktiviteler rapamisin inhibisyonuna duyarlıdır. mTORC 1 ayrıca, VEGF reseptörü, PDGF reseptörü, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), IGFR ve ayrıca PI3K yoluyla besinler de dâhil olmak üzere büyüme faktörleri ile aktive edilebilir (54). mTORC 2 ise, hücre sağkalımı ve sitoskeletal organizasyon dâhil olmak üzere çoklu fonksiyonları kontrol etmek için Akt, serum ve glukokortikoid indüklenbilir kinaz (SGK)'a PKC 'yi fosforile eder ve bu aktiviteler rapamisine nispeten dirençlidir (13,54). mTOR inhibitörleri sadece mTORC1'i etkileyip, mTORC2'yi etkilememektedir.

Bu ilaçlar, mTOR'un seçici inhibitörü olup mTORC1'i inhibe ederler. mTOR, ilişkili protein komplekslerine bağlı olarak iki tarzda fonksiyon göstermektedir.

Örneğin; mTORC1, mTOR'un ilişkili düzenleyici proteinlerinden ve diğer çeşitli proteinlerden oluşmaktadır. mTORC1, sirolimusa ve besin seviyelerine duyarlıdır. Aksine mTORC2, sirolimusa duyarsızdır. mTORC2'den ziyade mTORC1, sirolimus ve sirolimus analogları tarafından mTORC1'in yukarı ve aşağı doğru sinyal akımı etkilerine dayanarak antitümör bir hedef olarak görülmüştür. Bu nedenlerle mTOR denildiğinde mTORC1'den bahsedildiği anlaşılmalıdır. Spesifik olarak mTORC1, spesifik mRNA translasyonu gibi protein sentezini düzenleyen süreçleri kontrol ederek hücre büyümesini yönetir ve ribozomal proteinler ile G1'in S-fazı hücre döngüsüne dönüşümünü ve anjiyogenezini düzenler. PI3K/AKT yolu üzerinden sinyal akışı yönü, yukarıya doğru mTORC1, büyüme faktörleri, hormonlar,

hücre içi enerji düzeyleri ve hipoksi gibi çeşitli sinyaller tarafından düzenlenmektedir.

Son çalışmalarda mTORC2 kompleksinin fosfoinositid bağımlı kinaz 2 (PDK2) ve AKT'ın fosforillenmesi gibi fonksiyonları gösterilmiştir.

Ayrıca, mTOR apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde de etkilidir. Apoptotik ölümden temelde p53, B-hücreli lenfoma 2 (BCL2), BCL2 - antagonisti (BAD), p21, p27 ve c-myc gibi sinyal iletim hedefleri belirleyicidir. mTOR aktivasyonu hücre ölümünü düzenleyerek, bu molekülleri inhibe eder. Yine başka çalışmalarda mTOR'un tümör hücre motilitesinde, anjiyogenezinde ve kanser metastazlarının regülasyonunda önemli rol oynadığını gösterilmiştir. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının düzensizliğine sebep olan mekanizmalardan biride VEGF ve anjiyogenezi artıran hipoksi indüklenebilir faktör (HIF)'lerin artan ekspresyonu ile tümörögenezi oluşturmaktadır. mTORC1 and mTORC2 komplekslerinin aktivitesi HIF-1a ve HIF-2a'nın transkripsiyonundan sorumludur. Kanser hücrelerinde, hipoksi anjiyogenezin en güçlü uyarıcısıdır. Hipoksiye hücre sel cevabı düzenleyen en önemli proteinler HIF'lerdir. HIFa ve HIFb subünitlerinden oluşur. Hipoksik durumlar HIF'leri aktive eder, bu da anjiyogenez için gerekli çeşitli büyüme faktörlerinin ekspresyonunu uyarır. Bu faktörler arasında VEGF, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve PDGF bulunmaktadır. Besin ve büyüme faktörleri bol miktarda bulunduğu anda, mTOR aktive olur, bu da protein sentezi, hücre büyümesi ve hücre gelişimine neden olur (Şekil 5) (46,57).

mekanizmalardan biridir. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, diferansiasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır.

Memeli hücrelerinde altı adet MAPK alt ailesi tanımlanmıştır; bunlar JNK 1 / 2 / 3, hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz (ERK) 1/2, p38 MAPK (p38 α / β / γ / δ), ERK7 / 8, ERK3 / 4 ve ERK5 / BMK1 (büyük MAP kinaz 1). Üstteki sinyal akış kinazları ile aktivasyondan sonra, farklı alt aileler, inflamasyon, stres, hücre büyümesi, hücre gelişimi, farklılaşma ve ölüm dâhil olmak üzere hücrelerdeki çeşitli fizyolojik süreçleri, fosforilasyon transkripsiyon faktörleri, hücre iskeletiyle ilişkili hücreler ve enzimler gibi çoklu substratlar aracılığıyla düzenlerler (6,58).

Temel olarak MAP kinazlar üç ana gruba ayrılır.

1. p38 MAP kinaz ailesi,
2. “Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK)” ailesi,
3. “c-Jun NH₂- terminal kinaz (JNK)” ailesi.

MAP kinaz yolu reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz)'ın sıralı fosforilasyonu yoluyla gerçekleşir. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforile eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (Şekil 6). MAPK, serin / treonin protein kinaz ve kritik bir sinyal iletim sisteminin bir parçası olarak görev yapar (51,58).

G proteinlerinin ERK, JNK, p38 MAPK veya ERK5 aracılığında; aktifleyici protein 1 (AP-1), nükleer faktör kappa beta (NF- κ B), siklik adenosin bir fosfat cevap elementi (CRE), serum cevap elementi (SRE), aktifleyici transkripsiyon faktörü 1 (ATF-1), transkripsiyon sinyali arttırıcı ve aktivatörü (STAT3), erken büyüme cevap elementi 1 (EGR-1), hipoksiyle indüklenen faktör 1 alfa (HIF-1 α), ve miyozite spesifik zenginleştirici faktör 2 (MEF 2) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini düzenlediği gösterilmiştir (6). Önceki çalışmalar, c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK) yolunun, beslenme yetersizliği, sitokinler ve büyüme faktörleri azalmaları ve nörotoksik ilaçlar gibi çeşitli otofajilerde önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (51).

2.9.1. p38 MAPK Sinyal Yolağı

Araştırmalarda p38 MAPK yolağının, p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (SAPK3 veya ERK6 veya MAPK12) ve p38 δ (SAPK4 veya MAPK13) olmak üzere dört izoformu tanımlanmıştır. p38 α ve p38 β izoformları birçok dokuda, buna karşın p38 γ iskelet kasında ve p38 δ ise çoğunlukla akciğer, böbrek, testis, pankreas ve ince bağırsak da eksprese olur. p38 yolağı enzimleri, oksidatif stresler ve iyonizan radyasyon gibi uyarımlarla p38'de bulunan Thr-Gly-Tyr amino asit dizisini fosforilleyerek p38 yolağını etkinleştirir. p38 izoformları substrat özgünlüklerine bağlı olarak bazı proteinleri ve transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek hücre sel yanıtlar oluştururlar (6).

in'de şıfalı ot olan *Quercetin*, önemli bir flavonoid ve anti-kanser aktivitesine sahiptir. *Quercetin*, MAPK / ERK sinyalizasyon yolunu baskılayarak, canlılığı ve gi inhibe edebileceği ve glioma hücrelerinin yaşlanmasını ve apoptozunu destekleyebileceği kanıtlanmıştır.

Oleanolik asit (OA), glioma hücrelerinin hayatta kalmasını, büyümesini ve anjiyogenezini baskıladığı iyi kanıtlanmıştır. OA, MAPK / ERK sinyalizasyon yolunu inaktive ederek malign glioma hücrelerinin göçünü ve invazyonunu baskılamaktadır.

Allisin hücre büyümesini inhibe eder ve bir MAPK / ERK sinyal yolu yoluyla U87MG insan glioblastoma hücrelerinde apoptosisini indükler.

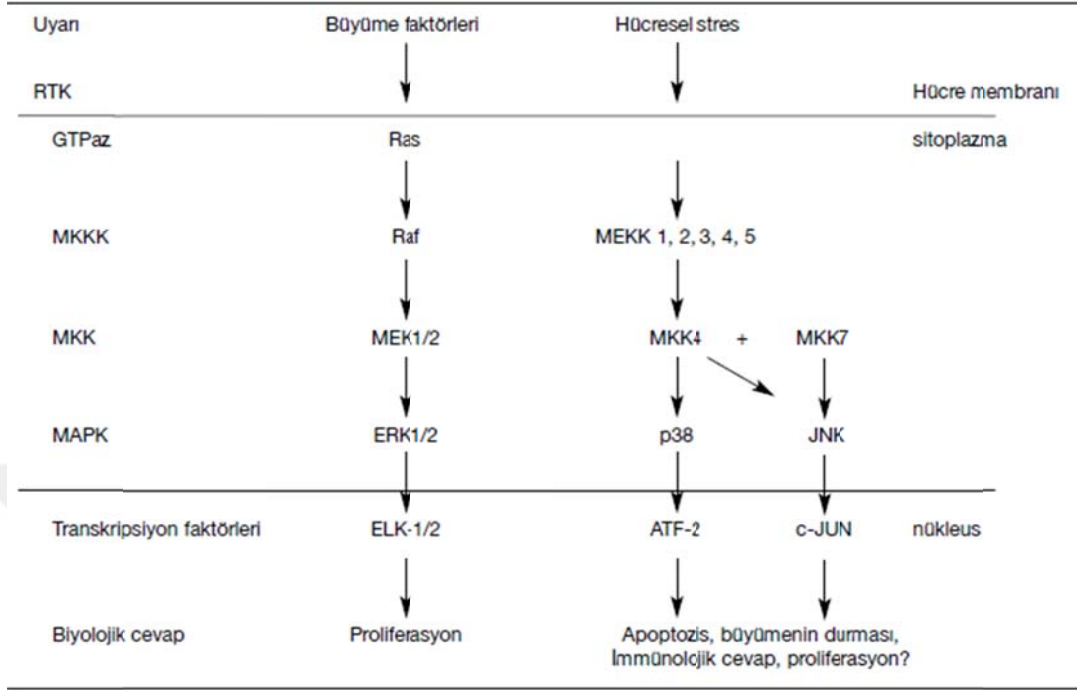
Klorid hücre içi kanal 1, MAPK / ERK yolunu düzenleyerek prostat kanseri hücre proliferasyonunu ve göçünü, hücrelerinin konjugat kaynaklı apoptozisini düzenleyebilir.

Sorafenib, tümör ve vasküler hücrelerde artmış apoptotik hücre ölümünü tetiklerken, MAPK ve PI3K / Akt yolaklarının hücre proliferasyonunu ve fosforilasyon seviyelerini de önemli ölçüde düşürmüştür.

U0126, bir MEK inhibitörü veya siRNA kullanılarak MEK1 / 2 ve ERK1 / 2 aktivitesinin inhibisyonu, U2OS insan osteosarkom hücrelerinde nutlin-3 ile indüklenen apoptozun artmasına neden olmuştur.

Mirk / Dyrk1B, MAPK / ERK sinyalleri ile etkileşim yoluyla hem ovaryum kanseri hem de küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde hücre döngüsüne

ve sağkalımına aracılık ederek ve her iki yolun aynı anda inhibisyonu ile insan kanserleri için yeni bir terapötik hedef olarak gösterilmiştir (59).



Şekil 6. MAPK ailesi ve sinyal iletimi. ATF: “Activating transcription factor”, ERK: “Extracellular signal regulated kinase”, GTP: “Guanosine triphosphate”, JNK: “c-Jun N-terminal kinase”, MAPK: “Mitogen-activated protein kinase”, MEK: “Mitogen extracellular signal regulating kinase”, MEKK: “MAPK/ERK kinase kinase”, MKK: “MAPK kinase”, MKKK: “MAPK kinase kinase”, p38: “p38 kinase”, RTK: “Receptor tyrosine kinase (58).

Sonuç olarak p 38 MAPK sinyal yolağının da kanser ile ilişkili ve inhibisyonunun, kanser hücre ve dokularında apoptoza yol açtığı bilinmektedir (60).

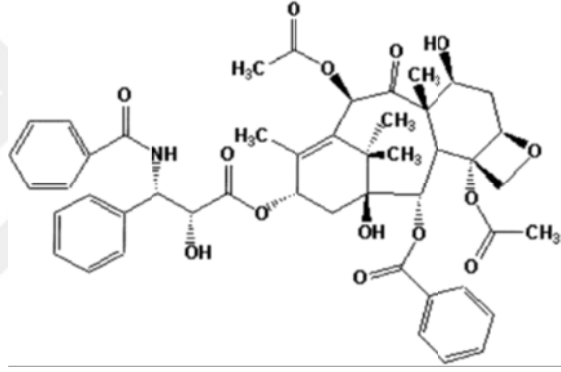
2.10. Paklitaksel

Paklitaksel (PTX), *Taxus brevifolia*'nın kabuklarından izole edilen doğal diterpendir. Klinikte uygulanan ilk taksan türevidir. İlk olarak kemoterapiye dirençli meme ve ovaryum kanserli hastalarda palyatif (hafifletici) olarak kullanılmıştır. Günümüzde ise paklitaksel başlangıç tedavisi olarak kullanılmaktadır. İlk olarak 1963 yılında Pasifik'in kuzeybatısında, uzun yıllarda yetişen her zaman yeşil olan *Taxus brevifolia* isimli pasifik porsuk ağacının işlenmemiş özütü elde edilerek klinik öncesi çalışmalarda çeşitli tümörlere karşı antitümöral etkisi olduğu gösterilmiştir.

1971 yılında bu özütteki aktif bileşen paklitaksel tanımlanmıştır (61,62).

Paklitakselin gelişim süreci; yeni bir kimyasal yapı olması, klinik öncesi çalışmalarda diğer etkin maddelere oranla antitümöral etkinliğinin azlığı ve sudaki çözünürlüğünün düşüklüğünden dolayı formülasyon probleminin olması nedeniyle uzun sürmüştür. Ancak yapılan tümör taraması sırasında ortaya çıkan paklitakselin benzersiz etki mekanizması, onun yeniden canlandırılması sağlanmıştır.

Paklitaksel, beyaz renkte kristal toz yapıdadır. Oldukça lipofilik yapıda, erime sıcaklığı 216-217°C'dir. Kimyasal açık adı '5β, 20-epoksi-1,2α, 4, 7β, 10β, 13α-hekzahidroksitaks-11-en-9 on 4, 10-diasetat 2-benzoat-13 ester (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilzoserin'dir. Molekül formülü C₄₇H₅₁NO₁₄, moleküler ağırlığı 853,9 dalton'dur (Şekil 7).



Şekil 7: Paklitakselin kimyasal yapısı

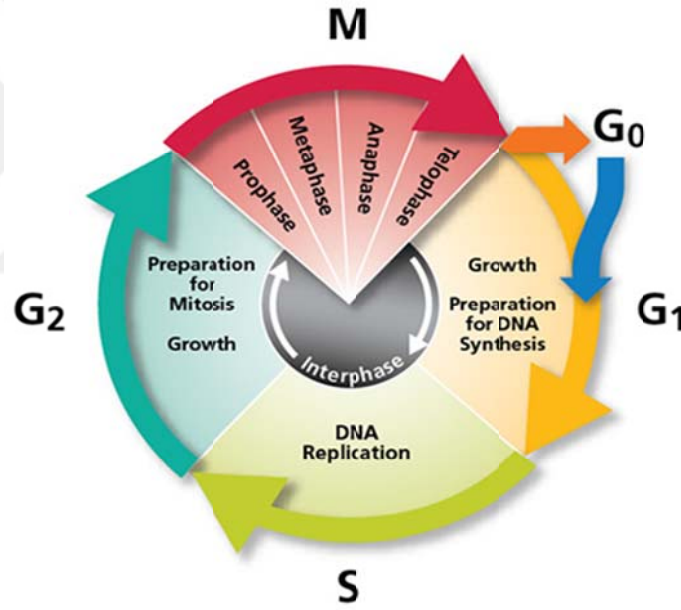
Paklitakselin sudaki çözünürlüğü 0,3 µg/ml'dir. Ancak çeşitli organik çözücülerde nispeten daha fazla çözünürlük göstermektedir. Yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Büyük oranda P-450 aracılı hepatik metabolizmaya uğrar ve %10'undan daha azı değişmeden idrarla atılır. Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda 6 saatlik infüzyonu takiben en yüksek paklitaksel konsantrasyonu akciğer, karaciğer ve dalakta eser miktarda da beyin ve testislerde biriktiği gösterilmiştir (62).

Paklitaksel ovaryum, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde kullanılmakta; ayrıca mesane kanseri, serviks, endometrial, özefageal karsinomalarının, baş ve boyun karsinomlarının tedavisinde denenmektedir (61).

Antitümör etkisini hücrede mikrotübüllerin toplanmasını arttırmak ve depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotübül toplulukları oluşturmak suretiyle göstermektedir.

Paklitaksel hücreler üzerindeki etkisini iki yolla yapmaktadır.

1) Hücre Döngüsünü Bloke Etmek: Paklitaksel, kanser tedavisinde kullanılan, etkisini mikrotübüller üzerinde gösteren tubulin proteinlerine bağlanarak mikrotübül yapılanmasını engellemek yerine stabilize ederek hücre bölünmesini durdurmaktadır. Paklitaksel β tubulinde N-terminal 31 amino asite bağlanarak (rao-2) hücrelerin G₂ / M evresinde kalmasına neden olmaktadır. Hücre siklus sırasında mitotik faza geçemeyen hücreler bölünememekte ve G₁ kontrol noktası tarafından apoptozise yönlendirilmektedir (Şekil 8).



Şekil 8: Hücre döngüsü mekanizması (63).

2) Apoptozis: Paklitakselin apoptozis etki mekanizması ilk olarak 1993 yılında insan lenfoit lösemi hücrelerinde gösterilmiştir. Ardından bu konuda farklı hücre hatlarında ve çeşitli in vivo hayvan modelinde çok sayıda araştırma yapılmıştır.

Paklitakselin hücrelerin mitotik evreye geçmelerini engellemesi sonucu hücreler bölünememektedir. Mitotik evrede kalan hücre sayısındaki artış o hücreleri

apoptozise yönlendirici sinyaller oluşmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda yapılan çeşitli çalışmalarda paklitakselin apoptozisi bloke eden protein olan Bcl-2'ye bağlanarak apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Taxol dirençli mürin tümörü, Kolon 26 tümörü ile yapılan in vivo çalışmada paklitaksel içeren lipozom formülasyonlarının tümörün gelişimini durdurduğu görülmüştür (62).

İlk olarak 1991 yılında tek başına paklitaksel kullanılmasıyla metastatik meme kanserinde % 56 oranında bir cevap elde edilmiştir. Paklitaksel alan hastalarda yapılan çalışmalarda genel olarak cevap oranları ilk basamak metastatik tedavide % 32-62, ikinci veya daha sonraki basamaklarda ise % 21-48 olarak bulunmuştur. Paklitaksel'in optimum dozu ve tedavinin uygulanış şekli halen tartışmalıdır.

Paklitaksel'in faz II çalışmaları sırasında etkili olduğu saptandığı ilk tümör tiplerinden birisi ovaryum kanseridir. Paklitaksel ovaryum kanserlerinin primer ve sekonder basamak tedavilerinde etkili bir bileşik olarak bulunmuştur. Daha önce platinyum ile tedavi edilmiş hastaların, paklitaksel ile tedavilerinde % 20-37 oranında yanıt alınmıştır. Paklitaksel ve sisplatin daha önce hiç tedavi almamış hastalarda faz III çalışmalarında kullanılmıştır. Bu şekilde kullanımı standart sisplatin-siklofosfamid tedavisi ile karşılaştırılmış, paklitaksel verilen grupta daha iyi sonuç alınmıştır. Son yıllarda paklitaksel ovaryum kanserlerinin tedavisi için en uygun bileşik olarak bildirilmiştir (61).

Paklitaksel birçok kanser için başlangıçta kemoterapiye cevap verir, ancak uzun vadede, tedavi prosedüründe ilaç direnci gelişir. Bu yüzden son yıllarda kombine tedaviler ön plandadır. Bir çalışmada paklitaksel dirençli SKOV-3 ovaryum kanseri hücreleri üzerinde paklitaksele kıyasla *delphinidin* tedavisi anti-proliferatif etkiler göstermiştir. *Delphinidin* antosiyanin içeriği yüksek bir antioksidan türevidir (64). Bir diğer çalışmada güçlü antioksidan içeriği olan *silibinin* adı verilen bir bitki ekstraktı ile paklitaksel kombinasyonu SKOV-3 hücre hattı üzerine kullanılmıştır. Kombine verilen grubun anlamlı ölçüde daha etkili olduğu bildirilmiştir (65).

2.11. *Aronia Melanocarpa* (Siyah Chokeberry)

Meyveler, dejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere sağlık sorunlarına karşı, koruma sağlamadaki katkılarından dolayı sağlıklı bir diyet için tavsiye edilir. Meyvelerin hastalıkları önlemedeki rolü,

fenolik asitler, antosiyaninler veya flavanoller gibi bazı biyolojik olarak aktif bileşiklerle bağlantılıdır.

Çilekler arasında, *chokeberries*, tüketimiyle ilgili sağlık iddiaları nedeniyle bu meyve yakın zamanda dikkat çekmiştir. *Rosacea* familyasına, *Maloideae* alt familyasının ait çok yıllık, yaprak döken bir çalılık olan siyah *chokeberry* (*Aronia Melanocarpa*) son yıllarda ön plana çıkmaktadır. Meyvenin etli kısmı, acı ve ekşi bir tada sahip koyu kırmızıdır. *Chokeberry* meyvesi koyu mavi ve yuvarlak bir meyvedir (Şekil 9). Kırmızı ve siyah yaban mersini doğal hibriti olan *Aronia Melanocarpa* (*A.melanocarpa*)'nın, kırmızı *chokeberry* (*A. arbutifolia*) ve mor *chokeberry* (*A. prunifolia*) olarak bilinen iki çeşit *chokeberry* türü daha vardır. Genellikle, yaban mersini meyve reçelleri, meyve şarapları, meyve suları, kuru meyve, konserve-gıdalar ve diğer ürünlere işlenmek için kullanılır. *Chokeberry* donmaya karşı yüksek direnç, mekanize hasat, nakliye ve soğuk depolama sırasında hasar görülmeyen bir meyvedir. Bu avantajlardan dolayı, *chokeberry* popülaritesi yakın zamanda yükselmiştir. Kuzey Amerika kökenli olup, Danimarka, Doğu Avrupa ve Rusya'da yoğun olarak yetiştirilmektedir (66–68).

Son yıllarda ülkemizde de Yalova ilinde fideleri yetiştirilmeye başlanmıştır (69). *Aronia* antioksidanları esas olarak vitamin C ve antosiyaninler, fenolik asitler, flavanoller, flavonoller ve tanenler gibi polifenoller ile temsil edilir (66–68).



Şekil 9: *Aronia Melanocarpa* – Siyah chokeberry

Aynı içeriğe sahip olan resveratrol ve quercetin gibi polifenol dozu olarak karşılaştırılabilir meyvelerden 2-3 kat daha büyük miktarlar da içeriğe sahip olduğu tahmin edilmektedir.

Bu polifenollerin hem reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyerek hem de oksidatif ortamlarla mücadele etmek için hücrel antioksidan sistemleri indükleyerek önemli antioksidan özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir. Aronia meyvelerinin hiperkolesterolemi, kanser, diyabet ve iltihaplanma gibi hastalıklar üzerindeki potansiyel yararlı etkisini inceleyen yaygın bir literatür vardır (70). Ayrıca polifenolik bileşikler dışında bu meyvelerin vitaminler (C vitamini ve E vitamini), mineral elementler (potasyum, kalsiyum ve magnezyum), karotenoidler, pektinler, organik asitler gibi biyoaktif maddeler açısından da zengin olduğu vurgulanmıştır. *Aronia* türlerinin, araştırılması gereken nedenlerinin başında antiaterosklerotik, hipotansif ve antiplatelet içeren, özellikle kalp ve kardiyovasküler olanlar olmak üzere, kronik hastalıklarla ilgili olarak geniş bir yelpazede faaliyet göstermeleridir. Bu biyoaktif bileşiklerin mevcudiyetine, *Aronia*'nın meyveleri, hem in vitro hem de in vivo olarak etki gösteren diğer biyolojik, sağlık teşvik edici etkiler sergilemektedir, örneğin gastroprotektif (mide ülserleri), hepatoprotektif, antiproliferatif aktiviteleri (örn., kolon kanseri) önleme ve diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (14,15).

2.11.1. Antioksidanlar

Antioksidan maddeler; vücuttaki tüm hücreleri etkileyerek, kardiyovasküler ve pulmoner sistem hastalıkları, kanser, katarakt, yaşlanma gibi süreç ve hastalıklarda rolü olduğu bilinen serbest radikallerin, doku ve hücrelerdeki zararlı etkilerini azaltır. Bu etkilerini; serbest radikallerin reaksiyonlarını durdurmak, oksijeni ve metalleri bağlayarak oksidasyonun sebep olduğu zararları engellemek, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve lipoprotein oksidasyonunu önlemek yoluyla gösterirler. Yapılan farklı çalışmalarda, fenolik bileşiklerin; antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik ve antiviral özellikleri bulunduğu gösterilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı; kanser, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz, diyabetes mellitus ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (32).

Diyet antioksidanları (vitaminler, mineraller ve fenolik bileşikler) yanı sıra endojen antioksidanlar, hücrelerin reaktif oksijen türüne zarar vermesine karşı koruma sağlayabilir. Antioksidanların diyet alımının artması, bazı hastalıkların azalmasıyla ilişkilidir. Meyve ve sebzelerdeki düşük seviyelerde antioksidanların tüketiminin, belirli kanserlerin görülme sıklığının iki katından fazla olduğu gösterilmiştir. Bu antioksidanlar arasında, *A. Melanocarpa* 'nın polifenol açısından zengin ekstraktı önemli bir rol oynayabilir (71).

A. Melanocarpa'nın ve antimutagenesis etkisi, hepato ve kardiyoprotektif etkileri, antidiyabetik etkisi ve kanser hücresi proliferasyonunun inhibisyonu dahil olmak üzere dokular üzerinde birçok koruyucu etkisi vardır (72).

Antioksidanlar açısından zengin meyve tüketiminin yüksek olduğu bir diyetin bazı kanser türlerinin riskini azalttığını gösteren epidemiyolojik kanıtlar bulunmaktadır. Bu nedenle, bazı diyet antioksidanlarının kanser insidansını iyi bir şekilde önleyebildiği gösterilmiştir. In vitro deneylerin sonuçları *Aronia* meyvesinin, bazı kanser vakalarında bir besin takviyesi olarak başarılı bir şekilde kullanıldığını göstermektedir. Ayrıca, siyah *chokeberry* meyvesinin polifenolik ekstraktının oksitlenmenin önlenmesi, oksidatif stresin azaltılması, detoksikasyon enzimlerinin indüklenmesi, hücre indüksiyonu gibi bir çok kemopreventif etkisi için çeşitli etki mekanizmaları tanımlanmıştır.

Kemoterapi sırasında farklı anti-kanser ilaçları (paklitaksel, sisplatin veya türevleri, doksorubisin) kan trombositlerinde oksidatif strese neden olur ve biyolojik fonksiyonlarını değiştirir. Bu ilaçların kesin biyokimyasal toksisitesi henüz tanımlanmamış olsa da, oksidatif stresin katılımı birçok kanıt ile gösterilmektedir. *Aronia* ekstraktının, daha önce meme kanseri hastalarından izole edilen kan plateletlerinde oksidatif stres üzerindeki etkisi ve aynı zamanda cerrahi sonrası ve çeşitli kanser sonrası kanser hastalarından izole edilen trombositlerin üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca, literatürde *A. Melanocarpa* meyvelerinin, meyve suyunun ve ekstraktlarının istenmeyen ve toksik etkilerine dair herhangi bir veri bulunmamaktadır (71).

2.11.2. Antosiyaninler

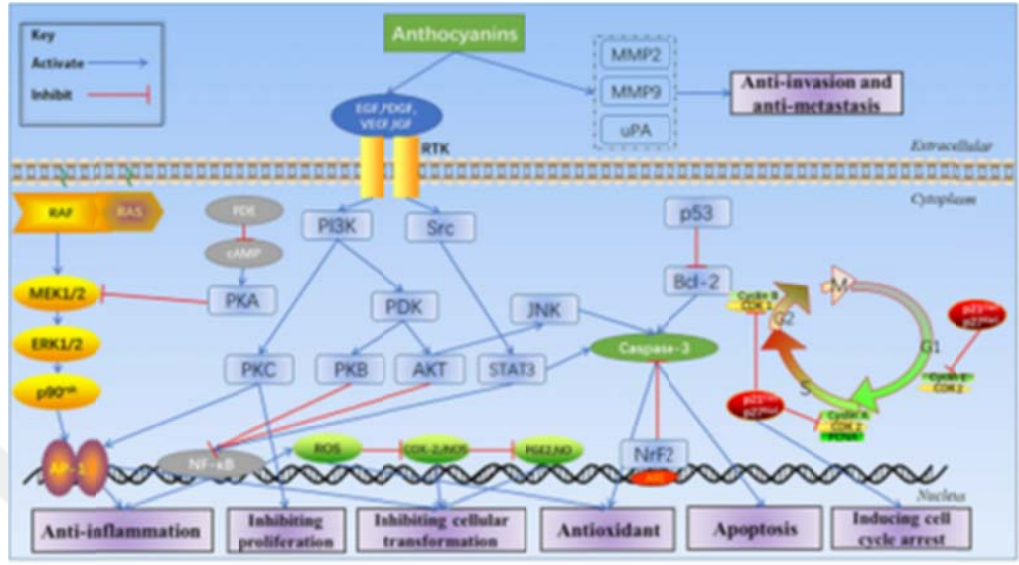
Antosiyaninler, flavonoid pigmentlerin en önemli grubudur. Antosiyanin deyimini ilk kez 1835 yılında kullanılmış olsa da bu maddelerin pH indikatörü olduğu 1664 yılından beri bilinmektedir. 1913 yılında mavi çiçekli *Centaurea cyanus*'ta ilk antosiyanin yapısal olarak tanımlanmış olup, yapısı belirlenmiş antosiyanin sayısı günümüzde 600'ü aşmıştır. Antosiyaninleri de içeren flavonoidlerin bitkilerdeki görevleri, mikroorganizmalar için sinyal, patojenlere karşı koruma, biyotik ve abiyotik stresleri iyileştirme, oksinlerin taşınmasında ve bitki verimliliğinde etki, böcek ve diğer hayvan polinatörler için çiçekleri görünür yapmak, angiosperm çiçeklerinde renk çeşitliliğinin oluşturulması olarak sıralanabilir.

Antosiyaninlerin farklı fonksiyonlarının keşfi ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin anlaşılması, antosiyaninler üzerindeki araştırmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur (73). In vivo deneylerde, *chokeberry* özütü ayrıca plazma ve karaciğerde önemli bir antosiyanin aktivite sergilemiştir (67).

2.11.2.1. Antosiyanin ve Antioksidanların Kanser Üzerindeki Etki Mekanizmaları

Kanser hücre büyümesi, RTK'leri (örn., EGFR, PDGFR ve VEGF / VEGFR) hedefleyerek ve Ras-MAPK ve PI3K / Akt sinyal kaskadı yolu üzerinde etki ederek antosiyaninler tarafından inhibe edilebilir (Şekil 10). Ek olarak, *siyanidin* ve *pelargonidin*, kanser hücrelerinde PI3K / Akt yolunu inhibe ederek kanser hücrelerinin invazyonunu azaltır ve bu sayede MMP-2, MMP-9'un ekspresyonunu da inhibe edebilir. İn vivo kanser hücre hatlarından in vitro deneyleri ve hayvan modellerine ait tüm deneysel veriler antosiyanin ve antioksidanların, antitümör etkilerinin ana moleküler mekanizmasının, Ras-MAPK ve PI3K / Akt sinyal kaskadı yolları üzerinde hareket ederek, RTK'leri (EGFR, PDGFR ve VEGF / VEGFR) hedefleyerek kanser hücresi büyümesini ve metastazı inhibe ettiğini göstermektedir (52). Yapılan bir çalışmada siyah *chokeberry* ekstraktının SK-Hep1 (İnsan Hepatik Adenokarsinom hücre hattı) hücrelerinde kanser hücresi proliferasyonu, invazyonu ve metastazı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar, siyah *chokeberry*'nin SK-Hep1 insan hepatoma kanser hücrelerinin adezyonunu,

invazyonunu ve göçünü inhibe etmedeki antimetastatik özellikleri ortaya koyulmuştur (66).



Şekil 10: Antosiyaninlerin antitümör etkisinin in vitro ana potansiyel moleküler mekanizması.

İn vitro deneyler, insan meme, lösemi, kolon ve servikal tümör hücre hatlarının büyümesi üzerine *A. Melanocarpa'* nin etkinliğini kanıtlamıştır. Literatürdeki bu çalışmalar *A. Melanocarpa'* nin kanser türleri arasında etkin olduğunu göstermektedir (14). Bu tez de SKOV-3 epiteliyal over kanseri hücre hattında, daha önce literatürde ovaryum kanseri üzerinde hiç çalışma yapılmamış olan *Aronia Melanocarpa'* nin, antosiyanin ve antioksidan etkisi ile kanser hücrelerinin inhibisyonunda etkili olabileceğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda ilk kez 1973'te ovaryum tümörü olan 64 yaşındaki bir Kafkaslı kadının assit sıvısından elde edilen epiteliyal ovaryum adenokarsinomu olan SKOV-3 hücre hattı kullanıldı. Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM (Medipol Üniversitesi, Uluslararası Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER)) tarafından ATCC (*American Type Culture Collection*)'den satın alınan hücreler, çalışmamız için hediye edildi.

3.2. Hücre Kültürü

SKOV-3 hücreleri, önceden inaktifleştirilmiş %10'luk Fetal Sığır Serum (FBS) (FBS Heat Inactivated- Thermo-10500064), 1 mM L- glutamine (Thermo-250300024), 1 mM'lik penisilin-streptomisin (Penicillin - Streptomycin Solution- Thermo-15140122) içeren DMEM (Thermo-31330038) ve Mc Coy's 5A (McCoy's 5A (Modified) Medium-Wisent) hazırlanmış medium ile, 25 cm²' lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂ ortamında, 37° C'deki (Heraus marka) CO₂ inkübatöründe kültüre edildi.

3.3. Hücrelerin Pasajlanması

Üremekte olan hücre pasajları %80-90 doygunluğa (confluent) ulaşıncaya pasajlandı. Pasajlama işlemi;

- Flaskların içerisindeki medium pipetle alınarak steril fostat tampon solüsyonu (PBS) (PBS PH7.4 W/O CAMG USA-Wisent) ile yıkandı.
- Ardından PBS pipetle uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapıştıkları alandan kaldırılması için 1 ml tripsin-EDTA (TRYPSIN 0.25% EDTA-Thermo-25200056) solüsyonu ilave edilerek etüvde 1-2 dk bekletildi.
- Tüm yüzeye yapışık olan hücrelerin kaldırılmasının ardından süspansiyon halindeki hücre + tripsin-EDTA solüsyonu 15 ml hacimli falkon tüp içerisine alındı. Solüsyonun üzerine tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin 2 katı medyum eklendi.

Tüpe alınan süspansiyon 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, ardından tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler taze hücre medyumumu ile süspanse edilerek 75 cm²'lik flaska bölünerek pasajlandı. Pasajlanan hücreler 37 ° C'de % 5 CO2 ortamında inkübe edildi.

3.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücreler istenilen düzeyde çoğaldıktan sonra deney yapılıncaya kadar ve yedek olarak da hücre stoğunun bulunması amacıyla dondurma işlemi uygulandı. Bu işlemler aşağıda sırasıyla belirtilmiştir.

- ✓ Kültür medium içeriği aspire edildi.
- ✓ 2 kez Ca-Mg Free PBS ile yıkandı.
- ✓ 1-2 ml % 25 Tripsin Edta solüsyonu ile flask yüzeyine yayılması sağlanarak 1dk 37°C etüvde bekletildi.
- ✓ Daha sonra tüm hücrelerin yüzey ile bağlantısının kesildiğinden emin olunduktan sonra ve 5 ml medium ilave edilerek 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- ✓ Thoma lamı kullanılarak tripan blue yardımı ile hücre sayımı yapıldı.
- ✓ Daha sonra dondurma mediumu için 6 ml DMEM, 3 ml FBS, 1 ml DMSO (Dimethyl sulfoxide emplura- Merck-1167431000) kullanıldı.
- ✓ Santrifüj edilen hücrelerin üzerine dondurma mediumu eklenerek, hücre yoğunluğuna göre cryo vial'lere paylaşırılıp -80°C 'ye kaldırıldı.

3.5. Deney Grupları

Grup 1 Kontrol Medium Grubu: 1:1 oranında *Mc Coys 5 a* ve DMEM medium , %10 fetal bovine serum, 1 mM penisilin streptomisin, 1 mM'lık L-glutamine ile hazırlanmış besi yeri içeren gruptur. Birbirinin kontrolü olması amacıyla en az 3 kuyucuk kullanıldı.

Grup 2 Kontrol Ultra Saf Su Grubu: *Aronia Melanocarpa* (Organic Herb Inc.- *Aronia Melanocarpa* Extract 5% Anthocyanidins) için çözgen olarak kullanılan gruptur. Birbirinin kontrolü olması amacıyla en az 3 kuyucuk kullanıldı.

Grup 3 *Aronia Melanocarpa* Grubu: MTT test yöntemi ile *Aronia Melanocarpa*'nın en etkin 5 dozu belirlendikten sonra bu 5 dozun 24, 48, 72 saat

olarak immünohistokimyasal ve TUNEL yöntemlerinin uygulandığı gruptur. 5 farklı en etkin olan konsantrasyonlarda ultra saf suda çözünen *Aronia Melanocarpa* içeren 1000 µl besiyerleri eklendi. Birbirinin kontrolü olması amacıyla her doz için en az 3 kuyucuk kullanıldı.

Grup 4 Paklitaksel + *Aronia Melanocarpa* grubu: 0,02 µM paklitaksel (sigma-T7402) ile MTT sonucunda en etkin olarak bulunan doz ultra saf suda çözülerek *Aronia Melanocarpa* içeren 1000 µl besiyerleri eklendi. Birbirinin kontrolü olması amacıyla her *Aronia Melanocarpa* doz için en az 3 kuyucuk kullanıldı (65,74,75).

Deneyde daha önce ovaryum kanserinde kullanılmamış olan *Aronia Melanocarpa* için, etkin olan dozları bulmak amacıyla toplam 11 doz çalışıldı. Hazırlanan *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonları 400 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml şeklinde planlandı. Her doz için 24, 48, 72 saat için ayrı ayrı uygulama yapıldı. MTT test yöntemi ile bu dozlardan istatistiksel olarak IC50 değeri 50 µg/ml bulundu ve 2 alt, 2 üst dozu (100 µg/ml, 75 µg/ml - 50 µg/ml - 25 µg/ml, 10 µg/ml) seçilerek toplam 5 doz olmak üzere immünohistokimyasal ve TUNEL yöntemleri uygulandı. Paklitaksel ile kombine halde ise IC50 değeri olan 50 µg/ml seçilerek immünohistokimyasal ve TUNEL yöntemleri uygulandı.

3.6. İn Vitro Sitotoksitite Testi - MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

Aronia Melanocarpa'nın hücreler üzerindeki antisitotoksitite düzeylerini (IC50=İnhibitör doz) saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanıldı. Bu amaçla aşağıdaki protokol izlendi.

- Hücre kültüründe elde edilen hücre serilerine ait hücrelerden 24 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 20.000 hücre olacak biçimde 1000 µl hücre besiyeri karışımı şeklinde ekim yapıldı ve kuyucuklara hücrelerin homojen bir biçimde yayılması sağlandı. Daha sonra bu hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde 24 saat bekletilerek yapışmaları sağlandı. Süre sonunda yapışan hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak farklı konsantrasyonlarda ultra saf suda çözünen *Aronia Melanocarpa* içeren 1000 µl besiyerleri eklendi. Hazırlanan *Aronia Melanocarpa*

konsantrasyonları 400 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml şeklinde koyulu. Etkin maddeler 24 saat, 48 saat ve 72 saat aralıkla uygulandı. Kontrol amaçlı *Aronia Melanocarpa* uygulanmayan kuyucuklara, *Aronia Melanocarpa*'nın çözücüsü olan ultra saf su aynı sürelerde uygulandı. Her bir *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonu için en az 3 kuyucuk kullanıldı. 24, 48, 72 saat sonrasında hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak her bir kuyucuğa 1000 µl besiyeri - MTT solüsyonu karışımı eklendi. (900 µl besiyeri + 100 µl 5mg/ml MTT solüsyonu şeklinde) (Biomatik-A3338) Plak 37 °C'de, % 5 CO₂'li etüvde 4 saat bekletildi.

- Bu süre sonunda plak etüvden alınıp kuyucukların üzerindeki MTT ve besiyeri karışımı atılıp her bir kuyucuğa 500 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) eklendi.
- 24 kuyucuklu plaktaki hücrelerin canlılık ölçümü spektrofotometre cihazında 570 nm'de yapıldı. Sonuçlar GEN 5 bilgisayar programında okutulurak elde edilen veriler excel tablosuna aktarıldı.
- Deney setlerinde hücreler her ilaç dozu için 3 paralel halinde ekildi ve deneyler birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlandı.

3.7. TUNEL ve İmmünohistokimyasal Yöntemler İçin Hücrelerin Hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini % 80 oranında kapladıklarında tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırıldı. Tripitan mavisi boyası ile boyanan hücreler, thoma lamı yardımıyla 3 kez sayıldı ve ortalamaları alındı. Hücreler daha önce hazırlanan besiyerinde süspansiyon haline getirildi. 24 kuyucuklu kültür plakalarına yuvarlak 10 mm' lik lameller plate içine yerleştirildi. Sterilizasyon için 4 saat UV'de bekletildi. Cam lamellere hücrelerin yapışmasını sağlamak amacıyla kuyucuklara 50 µl FBS eklenerek 37 °C'de etüvde 30 dk bekletildi. FBS mikropipet (Thermo multipipette) yardımıyla çekilip atılarak üzerine her kuyucuğa toplam hacim 0,5 ml olacak şekilde 4×10^4 hücre medium karışımı ekildi. 24- 48 saat hücrelerin yapışması sağlandı. *Aronia Melanocarpa* MTT testinden sonra elde edilen sonuçlara göre en etkin olan 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml dozları tek başına ve 0,02 µM paklitaksel ile de 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* dozu kombine olarak uygulandı. 24 - 48 - 72 saat süre ile

etüvde bekletilen hücreler daha sonra içerikleri atılarak % 4'lük paraformaldehit (Sigma-11-0732) ile 30 dk fikse edildi. Fiksasyon solüsyonu hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2x5 dk PBS (Sigma-79382) ile yıkandı. % 1'lik Triton X-100 (Sigma-Triton™ X-100) içeren PBS solüsyonu eklendi ve plakalar 5 dk +4 °C'de inkübe edilerek permeabilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Permeabilizasyon solüsyonu hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile 2x5 dk yıkama yapıldı.

3.8. Apoptoz ölçümü sitokimyasal TUNEL yöntemi

Aronia Melanocarpa'nın SKOV-3'teki antiapoptotik etkiyi tersine çevirerek bu kanser hücrelerini apoptoza yönlendirip yönlendirmediği TUNEL testi ile değerlendirildi. DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi için in situ apoptozis saptama kiti kullanıldı (Millipore Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Lot: 2199001. Temecula, CA 92590). Yuvarlak lameller üzerinde çoğaltılarak fikse edilmiş hücrelerdeki endojen peroksidaz'ı baskılamak için PBS içinde hazırlanmış %4'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) (Thermo) eklendi ve hücreler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. H₂O₂ solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2x5 dk PBS ile yıkandı. Eşitleme tamponu (equilibration buffer) ile 5 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Tampon uzaklaştırılıp, hücrelere TdT enzimi uygulandı ve nemli ortamda 37 °C'ye ayarlanmış etüvde 1 saat bekletildi. Hücreler, durdurma/yıkama (Stop wash buffer) tamponunda oda sıcaklığında 10 dk bırakılıp 3x1 dk PBS ile yıkandıktan sonra antidioxigenin peroksidaz konjugatı ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 4x2 dk PBS ile yıkama işleminin ardından peroksidaz substratı olan diaminobenzidin (DAB) eklenerek hücrelerin boyanması sağlandı. Optimum boyanma zamanını belirlemek için mikroskop altında renk oluşumu gözlemlendi. 3x1 dk dH₂O (distile su) ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra Mayer's hematoksilen ile zemin boyaması yapıldı. Mounting medium ile lameller lamalar üzerine yapıştırıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus Mikroskobunda Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde incelenerek apoptoze giden hücreler saptandı. 1 merkez 5 perifer bölge olarak toplam 6 farklı bölgeden gelişigüzel olarak seçilen 100 apoptotik hücre sayılarak, istatistiksel değerlendirme için veriler oluşturuldu (43).

3.9. PI3K, mTOR, p 38 MAPK İmmünohistokimyasal Uygulama Yöntemi

Yuvarlak lameller üzerinde çoğaltılarak tespit edilmiş hücrelerdeki endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için PBS içinde hazırlanmış % 4'lük H₂O₂ eklendi ve hücreler 5 dk oda sıcaklığında tutuldu. 2x5 dk PBS ile yıkanan lamellere oda sıcaklığında 1 saat bloking solüsyonu uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra yıkama yapılmadan tüm dozlar ve ilaç uygulamaları için ayrı ayrı PI3K, mTOR, p 38 MAPK primer antikoları aşamasına geçildi. Bu işlem için PBS ile 1/200 oranında dilüe edilen PI3K için *mouse monoclonal* primer antikoru (Santacruz-sc-1637), mTOR için *rabbit polyclonal* primer antikoru (Santacruz-sc-8319), p 38 MAPK için *mouse monoclonal* primer antikoru (Santacruz-sc-7973) uygulanan hücreler 1 gece +4°C'de bekletildi. Süre sonunda hücreler 3x3 dk PBS ile yıkandı ve 30 dk uygun biyotinli sekonder antikor uygulanarak (İnvitrogen, 859043) primer antikora bağlanması sağlandı. 3x3 dk PBS ile yıkamanın ardından hücreler 30 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (İnvitrogen, 859043) maruz bırakıldı, böylece enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Lameller yeniden 3x3 dk PBS ile yıkandıktan sonra DAB uygulanarak (İnvitrogen, 00-2020) gözle görülebilen immün tepkimenin açığa çıkması sağlandı. Zemin boyamasında Mayers'in Hematoksileni (İnvitrogen, 008011) kullanıldı. *Mounting medium* ile lameller lamalar üzerine kapatıldı.

İmmünohistokimyasal çalışmalarda streptavidin biotin kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz tekniği uygulanmıştır (76). Bu sayede hücrelerde var olan bu antijenlere kullanacağımız adı geçen antikoların spesifik bağlanması sağlanarak hücrelerdeki miktarları ile ilgili bilgi edinildi. Boyanmış hücre örnekleri, Binoküler Mikroskop (Olympus BX 43) ışık mikroskobu ile incelendi. Uygulanan immün boyama göz önünde bulundurularak yapılan değerlendirmeler sonucunda PI3K, mTOR, p 38 MAPK pozitif hücreler saptandı ve hücreler 1 merkez, 5 perifer toplam 6 bölge için tüm preparatlarda incelenerek, immünreaktivite açısından 100 hücre sayılarak istatistik uygulaması için veriler oluşturuldu. "0 = Hiç Yok, 1 = Zayıf, 2 = Orta, 3 Ortadan Yoğuna, 4 = Yoğun" sayısal veriler ile H-Score Analizi yapıldı.

3.10. İstatistik Değerlendirme Yöntemi

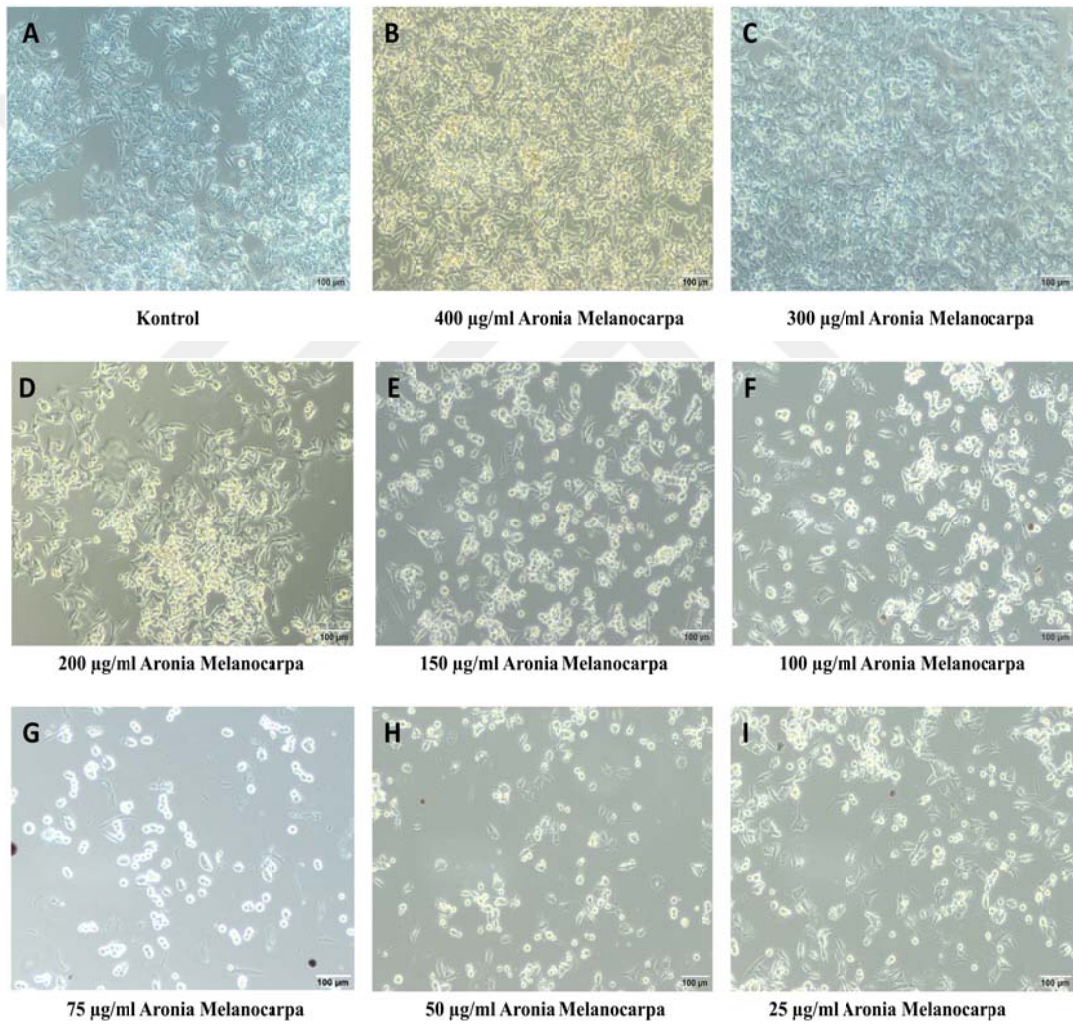
Tüm istatistik analizler SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences Inc., Chicago, IL, ABD) kullanıldı. MTT testi için *one sample t-testi* uygulanarak elde edilen sonuçlar $p>0,05$ durumunda anlamlı olarak kabul edildi. İmmünohistokimya ve TUNEL testleri için *ki-kare testi* uygulanarak elde edilen sonuçlar $p<0,01$ durumunda anlamlı olarak kabul edildi.

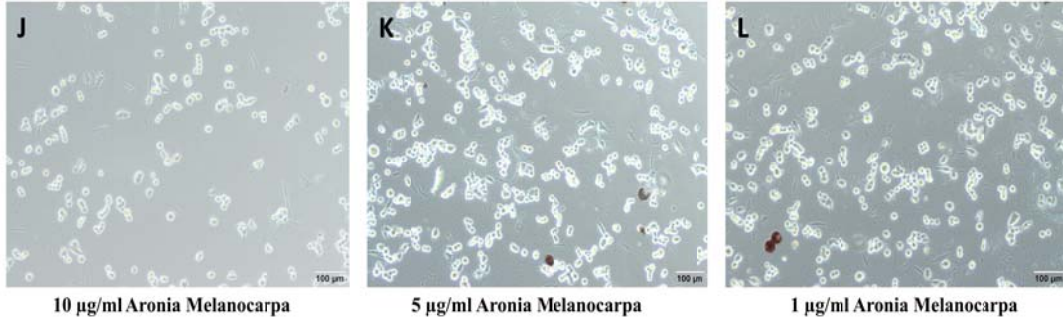


4. BULGULAR

4.1. Etkin *Aronia Melanocarpa* Dozunun Belirlenmesi

SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattı üzerine, en etkin dozu belirleyebilmek amacıyla 11 farklı dozda (Şekil 11) *Aronia Melanocarpa* uygulandı. Ayrıca flasklara ekilen hücrelerdeki proliferasyonu göstermek amacıyla hücrelerin invert mikroskop ile görüntüleri alındı.





Şekil 11: SKOV-3 hücrelerine *Aronia Melanocarpa* uygulanan ve uygulanmayan gruplara ait invert mikroskop görüntüsü.

4.2. *Aronia Melanocarpa*'nın SKOV-3 Hücre Hattı Üzerine Olası Sitotoksik Etkisinin MTT Yöntemiyle Belirlenmesi

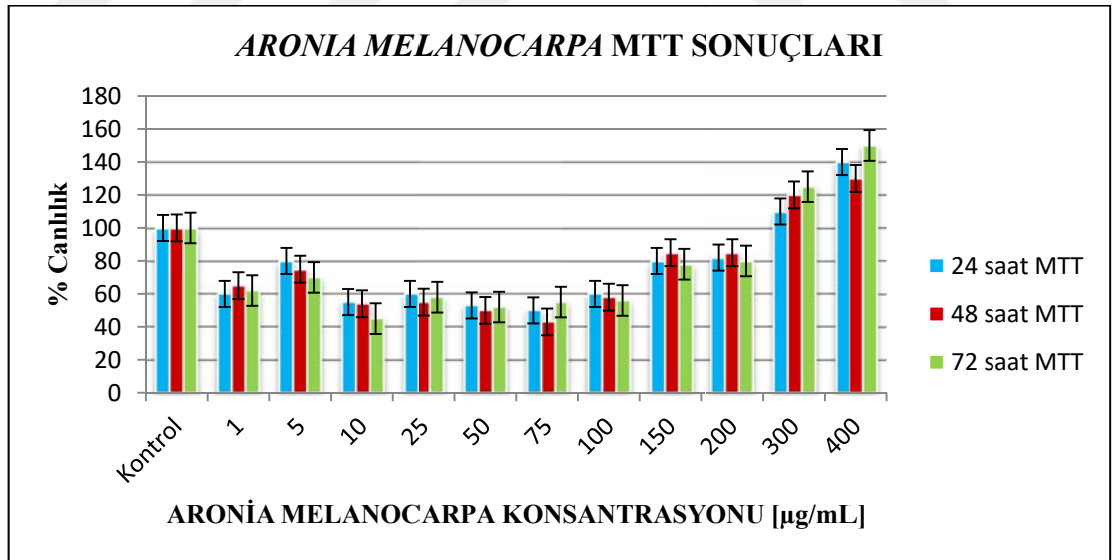
SKOV-3 hücreleri üzerine *Aronia Melanocarpa*'nın mitokondri aracılı sitotoksik etkisi 24, 48 ve 72 saatlik bekleme süreleri sonunda MTT yöntemi ile araştırıldı. MTT testi sonucunda *Aronia Melanocarpa* sitotoksitesisi ve baskılayıcı konsantrasyon 50 (IC50) değeri belirlendi.

Elde edilen bulgular, en uygun dozun 24 saatte kontrole oranla canlılıklarını yarı yarıya yitirdikleri 75 µg/ml doz, 48 ve 72 saatte 50 µg/ml doz, IC50 değeri olarak belirlendi (Tablo 2). 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* dozuna, tüm uygulanan saatlerde yakın sonuçlar elde ettiğimiz 10 µg/ml, 25 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml dozlarında TUNEL ve immünohistokimyasal analizleri yapıldı.

Aronia Melanocarpa'nın uygulanma süresi 24 saat için hücre ölümünün tüm dozlarda (300 µg/ml ve 400 µg/ml doz hariç) başladığını fakat 48 saat sonra en çok hücre ölümünün gerçekleştiğini (300 µg/ml ve 400 µg/ml doz hariç), 72 saat sonunda ise hücre ölümü oranının 48 saate göre azaldığı ve hücrelerin uygulanan *Aronia Melanocarpa*'ya karşı direnç oluşturarak tekrar proliferere oldukları gözlenmiştir. En uygun süre 48 saat olarak belirlenmiştir. 300 µg/ml ve 400 µg/ml *Aronia Melanocarpa* dozlarında da kontrole kıyasla anlamlı derecede hücre proliferasyonu görülmüştür (Şekil 11). Dolayısıyla bu iki dozda SKOV-3 hücreleri, *A.melanocarpa*'ya direnç göstererek, tekrar kontrolden daha fazla çoğalma döngüsüne girmiştir.

Tablo 2 : 24.-48.-72. Saat *Aronia Melanocarpa* uygulaması sonrası % hücre canlılığı

<i>Aronia Melanocarpa</i> Konsantrasyonları	SKOV-3 24 saat sonraki % canlılık	SKOV-3 48 saat sonraki % canlılık	SKOV-3 72 saat sonraki % canlılık
Kontrol	100	100	100
1 µg/ml	60	65	62
5 µg/ml	80	75	70
10 µg/ml	55	54	45
25 µg/ml	60	55	58
50* µg/ml	53	50*	52
75* µg/ml	50*	43	55
100 µg/ml	60	58	56
150 µg/ml	80	85	78
200 µg/ml	82	87	80
300 µg/ml	110	120	125
400 µg/ml	140	130	150



Şekil 12: SKOV-3 hücresi için farklı konsantrasyon ve saatlerdeki *Aronia Melanocarpa* uygulamasının MTT sonuç grafiği

SKOV-3 hücresi için 24. saat sonrasında canlılık oranları 1 µg/ml dozda % 60, 5 µg/ml dozda % 80, 10 µg/ml dozda % 55, 25 µg/ml dozda % 60, 50 µg/ml dozda % 53, 75 µg/ml dozda % 50, 100 µg/ml dozda % 60, 150 µg/ml dozda % 80, 200 µg/ml dozda % 82 , 300 µg/ml dozda % 110 , 400 µg/ml dozda % 140 olarak ölçülmüştür. SKOV-3 hücresi için 48. saat sonrasında canlılık oranları 1 µg/ml dozda % 65, 5 µg/ml dozda % 75, 10 µg/ml dozda % 54, 25 µg/ml dozda % 55, 50 µg/ml dozda % 50, 75 µg/ml dozda % 43, 100 µg/ml dozda % 58, 150 µg/ml dozda % 85, 200 µg/ml dozda % 87, 300 µg/ml dozda % 120, 400 µg/ml dozda % 130 olarak ölçülmüştür. SKOV-3 hücresi için 72. saat sonrasında canlılık oranları 1 µg/ml dozda % 62, 5 µg/ml dozda % 72, 10 µg/ml dozda % 45, 25 µg/ml dozda % 58, 50 µg/ml dozda % 52, 75 µg/ml dozda % 55, 100 µg/ml dozda % 56, 150 µg/ml dozda % 78, 200 µg/ml dozda % 80, 300 µg/ml dozda % 125, 400 µg/ml dozda % 150 olarak ölçülmüştür.

Tablo 3: *Aronia Melanocarpa*'nın farklı dozlarının 24 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 değeriyle karşılaştırılması (p > 0.05)

<i>Aronia Melanocarpa</i> (µg/ml)	Uygulama saati	% Canlılık	İstatistiksel analiz (One-sample test)	
			t	p
		Ortalama ± Standart sapma		
1	24	59,66 ± 4,51	3,713	0,065
5	24	80,66 ± 6,11	8,693	0,013
10	24	55 ± 4	2,165	0,163
25	24	59,33 ± 1,15	14	0,005
50	24	52,66 ± 2,51	1,835	0,208
75*	24	50* ± 2	0,0	1,00*
100	24	60,66 ± 4,16	4,438	0,047
150	24	81,33 ± 3,78	14,335	0,005
200	24	81,33 ± 1,15	47,00	0,0
300	24	110 ± 7	14,846	0,005
400	24	140,66 ± 10,01	15,678	0,004

Tablo 4: *Aronia Melanocarpa*'nın farklı dozlarının 48 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 değeriyle karşılaştırılması (p > 0.05)

<i>Aronia Melanocarpa</i> (µg/ml)	Uygulama saati	% Canlılık	İstatistiksel analiz (One-sample test)	
			t	p
		Ortalama ± Standart sapma		
1	48	64,66 ± 2,51	10,09	0,01
5	48	74,33 ± 1,15	36,50	0,001
10	48	54,00 ± 4,00	1,73	0,22
25	48	56,00 ± 4,58	2,26	0,15
50*	48	50,00* ± 4,58	0,37	1,00*
75	48	44,33 ± 5,77	-1,70	0,23
100	48	57,66 ± 5,50	2,41	0,13
150	48	84,33 ± 5,68	10,45	0,009
200	48	85,66 ± 4,72	13,07	0,006
300	48	119,33 ± 4,72	11,98	0,007
400	48	136,66 ± 9,86	15,21	0,004

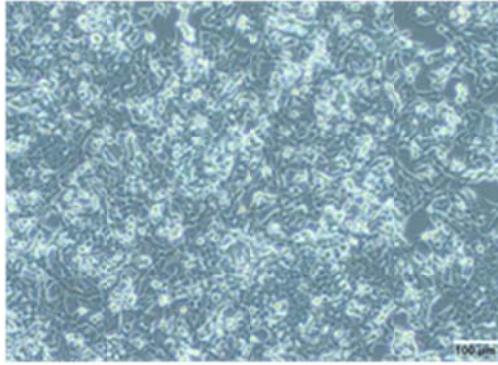
Tablo 5 : *Aronia Melanocarpa*'nın farklı dozlarının 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 değeriyle karşılaştırılması (p > 0.05)

<i>Aronia Melanocarpa</i> (µg/ml)	Uygulama saati	% Canlılık	İstatistiksel analiz (One-sample test)	
			t	p
		Ortalama ± Standart sapma		
1	72	62,33 ± 2,51	8,48	0,014
5	72	69,66 ± 5,507	6,18	0,025
10	72	44,66 ± 3,511	-2,63	0,11
25	72	58,33 ± 6,50	2,21	0,15
50*	72	51*,33 ± 5,50	0,41	0,71*
75	72	55,00 ± 5,00	1,73	0,22

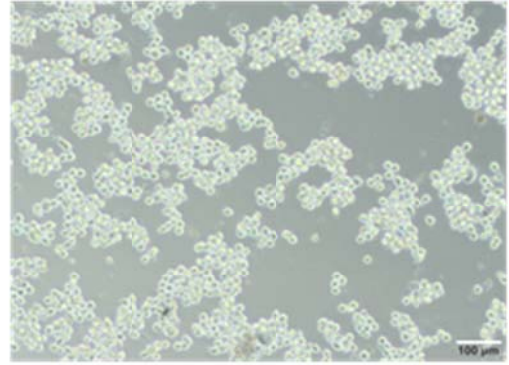
100	72	57,33 ± 1,15	11,00	0,008
150	72	78,00 ± 2,00	24,24	0,002
200	72	81,33 ± 9,23	5,87	0,028
300	72	125,66 ± 7,02	18,65	0,003
400	72	151,33 ± 10,06	17,43	0,003

4.3. Paklitaksel İlacının Tek Başına ve *Aronia Melanocarpa* Kombinasyonunda Etkin Dozun Belirlenmesi

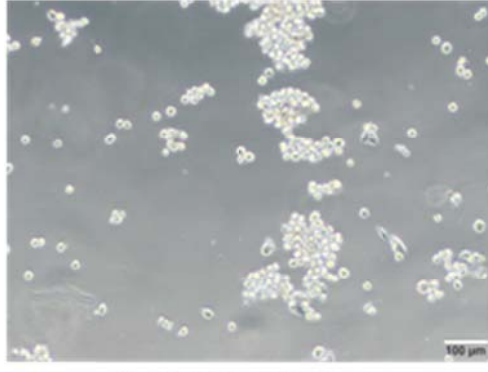
SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattı üzerine, en etkin dozu belirleyebilmek amacıyla farklı dozlarda paklitaksel tek başına ve 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* ile kombinasyonu uygulandı. Ayrıca flasklara ekilen hücrelerdeki proliferasyonu ve inhibisyonu göstermek amacıyla hücrelerin trinoküler invert mikroskop ile görüntüleri alındı.



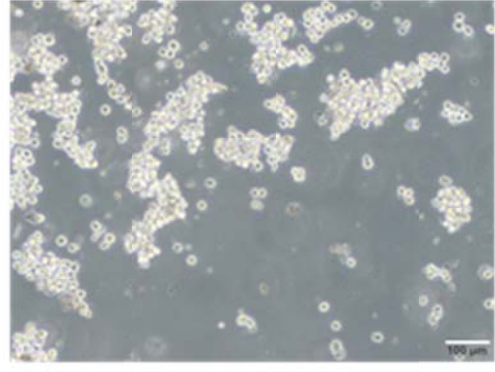
Kontrol



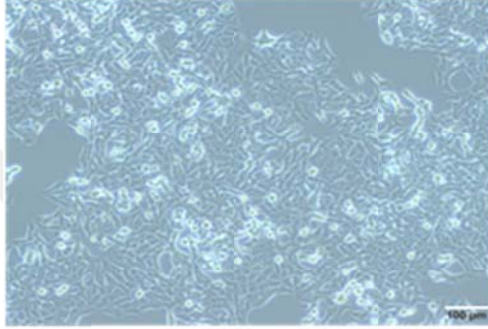
0,002 µM Paklitaksel



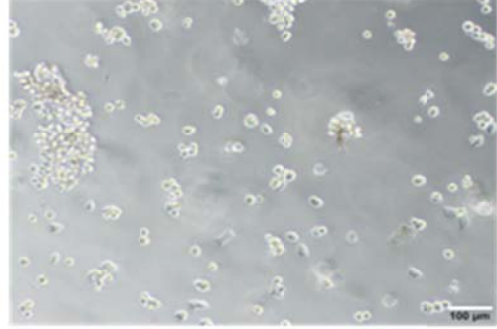
0,02 µM Paklitaksel



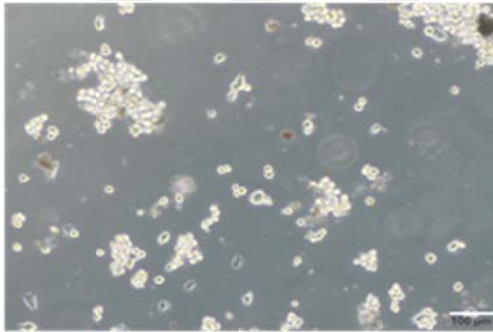
0,2 µM Paklitaksel



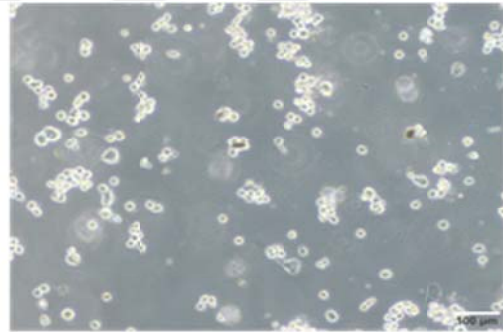
Kontrol



**0,002 µM Paklitaksel +
50 µg/ml Aronia Melanocarpa**



**0,02 µM Paklitaksel +
50 µg/ml Aronia Melanocarpa**



**0,2 µM Paklitaksel +
50 µg/ml Aronia Melanocarpa**

Şekil 13: SKOV-3 hücrelerine paklitaksel'in tek başına ve *Aronia Melanocarpa* ile kombinasyon uygulanan ve uygulanmayan gruplara ait invert mikroskop görüntüsü

4.4. Paklitaksel'in Tek Başına ve Aronia Melanocarpa İle Kombinasyonunun SKOV-3 Hücre Hattı Üzerine Olası Sitotoksik Etkisinin MTT Yöntemiyle Belirlenmesi

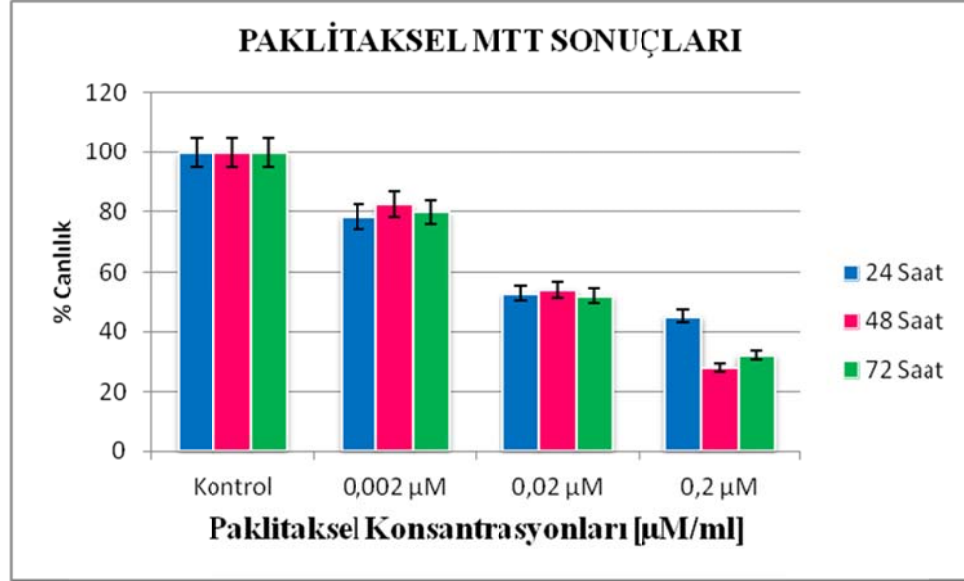
SKOV-3 hücreleri üzerine paklitaksel tek olarak ve *Aronia Melanocarpa* ile kombinasyonlarının mitokondri aracılı sitotoksik etkisi 24, 48 ve 72 saatlik bekleme süreleri sonunda MTT yöntemi ile araştırıldı. MTT testi sonucunda *Aronia Melanocarpa* sitotoksitesisi ve baskılayıcı konsantrasyon 50 (IC50) değeri belirlendi.

Elde edilen bulgular, paklitaksel'in tek ve *Aronia Melanocarpa*'nın 50 µg/ml ile kombinasyonu olarak uygulandığında en uygun dozun 0,02 µM/ml paklitaksel ve 72 saat sürenin, kontrole oranla canlılıklarını yarı yarıya yitirdikleri görülerek IC50 değeri olarak belirlendi (Tablo 6). Bu dozların 24, 48, 72 saat süreleri için TUNEL ve immünohistokimyasal analizleri yapıldı.

Paklitaksel'in uygulanma süresi 24, 48, 72 saat için hücre ölümünün her 3 doz için başladığı IC50 değerinin 0,02 µM olduğu, görüldü. En uygun süre ise 72 saat olarak belirlendi. 0,002 µM dozun 3 farklı saat için hücre inhibisyon oranında fark gözlenmezken, 0,2 µM da ise kontrole kıyasla anlamlı derecede toksik şekilde hücre ölümünün gerçekleştiği görüldü (Tablo 6, Şekil 13-14).

Tablo 6: Paklitaksel konsantrasyonlarının 24. 48. 72. saat sonunda % hücre canlılığı

Paklitaksel Konsantrasyonları	SKOV-3 24 saat sonraki % canlılık	SKOV-3 48 saat sonraki % canlılık	SKOV-3 72 saat sonraki % canlılık
Kontrol	100	100	100
0,002 µM	81,53	82,2	81,93
0,02* µM	55,46*	52,16*	50,14*
0,2 µM	42,5	32,26	29,9



Şekil 14: SKOV-3 hücreleri için farklı konsantrasyon ve saatlerdeki paklitaksel uygulamasının MTT sonuç grafiği

SKOV-3 hücreleri için 24. saat sonrasında canlılık oranları 0,002 µM/ml dozda % 81, 0,02 µM/ml dozda % 55, 0,2 µM/ml dozda % 42 olarak ölçülmüştür. SKOV-3 hücreleri için 48. saat sonrasında canlılık oranları 0,002 µM/ml dozda % 82, 0,02 µM/ml dozda % 52, 0,2 µM/ml dozda % 29 olarak ölçülmüştür. SKOV-3 hücreleri için 72. saat sonrasında canlılık oranları 0,002 µM/ml dozda % 81, 0,02 µM/ml dozda % 50, 0,2 µM/ml dozda % 32 olarak ölçülmüştür.

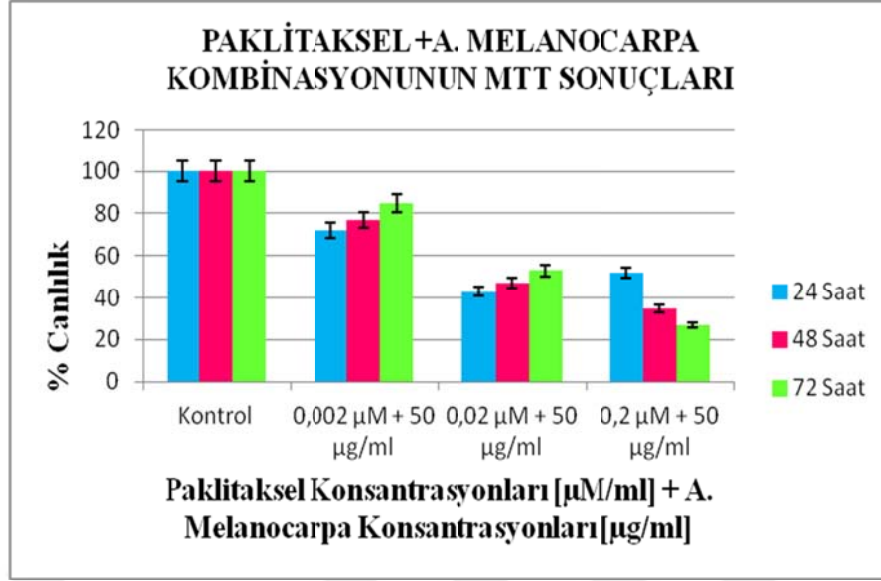
Tablo 7: Paklitaksel'in farklı dozlarının 24, 48, 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 değeriyle karşılaştırılması ($p > 0.05$)

Paklitaksel (µM/ml)	Uygulama saati	% Canlılık	İstatistiksel analiz (One-sample test)	
			t	p
		Ortalama ± Standart sapma		
0,002	24	81,41 ± 2,85	19,07	0,003
0,02*	24	55,46* ± 2,65	3,57	0,070*
0,2	24	42,56 ± 2,55	-5,04	0,037
0,002	48	88,20 ± 5,30	12,46	0,006
0,02*	48	52,16* ± 2,15	1,74	0,223*

0,2	48	32,26 ± 4,06	-7,55	0,017
0,002	72	81,93 ± 1,90	29,09	0,001
0,02*	72	50,00* ± 2,96	-0,50	1,000*
0,2	72	29,96 ± 1,88	-18,45	0,003

Tablo 8: Paklitaksel ve *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonlarının kombine kullanılması ile 24. 48. 72. saat sonunda % hücre canlılığı

Paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i> Konsantrasyonları	SKOV-3 24 saat sonraki % canlılık	SKOV-3 48 saat sonraki % canlılık	SKOV-3 72 saat sonraki % canlılık
Kontrol	100	100	100
0,002 µM Paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i>	69,6	81,2	65,82
0,02 µM Paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i>	49,4*	49,56*	50,00*
0,2 µM Paklitaksel + 50 µg/ml <i>Aronia Melanocarpa</i>	47,9	31,5	24,94



Şekil 15: SKOV-3 hücresi için farklı konsantrasyon ve saatlerdeki paklitaksel ve *Aronia Melanocarpa*'nın kombine uygulamasının MTT sonuç grafiği

SKOV-3 hücresi için 24. saat sonrasında canlılık oranları 0,002 µM/ml paklitaksel + 50 µg/ml *A. Melanocarpa* dozda % 69; 0,02 µM/ml paklitaksel + 50 µg/ml *A. Melanocarpa* dozda % 49; 0,2 µM/ml paklitaksel + 50 µg/ml *A. Melanocarpa* dozda % 47 olarak ölçülmüştür. SKOV-3 hücresi için 48. saat sonrasında canlılık oranları 0,002 µM/ml paklitaksel + 50 µg/ml *A. Melanocarpa* dozda % 81; 0,02 µM/ml paklitaksel + 50 µg/ml *A. Melanocarpa* dozda % 49; 0,2 µM/ml paklitaksel + 50 µg/ml *A. Melanocarpa* dozda % 31 olarak ölçülmüştür. SKOV-3 hücresi için 72. saat sonrasında canlılık oranları 0,002 µM/ml paklitaksel + 50 µg/ml *A. Melanocarpa* dozda % 65; 0,02 µM/ml paklitaksel + 50 µg/ml *A. Melanocarpa* dozda % 50; 0,2 µM/ml paklitaksel + 50 µg/ml *A. Melanocarpa* dozda % 24 olarak ölçülmüştür.

Tablo 9: En etkin olan paklitaksel ile *Aronia Melanocarpa* kombinasyonunun 24, 48, 72 saat sonrasına ait % canlılık değerlerinin IC50 değeriyle karşılaştırılması

Paklitaksel ($\mu\text{M/ml}$) + <i>Aronia</i> <i>Melanocarpa</i> (50 $\mu\text{g/ml}$)	Uygulama saati	% Canlılık	İstatistiksel analiz (One-sample test)	
			t	p
		Ortalama \pm Standart sapma		
0,002 + 50	24	69,60 \pm 2,19	15,47	0,004
0,02* +50*	24	49,40* \pm 6,03	-0,17	0,879*
0,2 + 50	24	47,95 \pm 3,90	-0,91	0,459
0,002 + 50	48	81,23 \pm 4,02	13,45	0,005
0,02* +50*	48	49,56* \pm 3,09	-0,24	0,831*
0,2 + 50	48	31,50 \pm 4,03	-7,93	0,015
0,002 + 50	72	65,82 \pm 2,15	12,74	0,006
0,02* +50*	72	50,00* \pm 2,55	1,10	1,000*
0,2 + 50	72	24,94 \pm 2,95	-14,69	0,005

4.5. TUNEL Sonuçları

SKOV-3 hücre hattına ait TUNEL boyamalarının ışık mikroskopik değerlendirilmesi için 5 farklı alandan toplam 100 hücre sayıldı. 100 hücre içinde pozitif reaktivite gösteren hücrelerin sonuçları non parametrik testlerden ki kare testi ile istatistik analizi yapıldı. Bu işlem 24, 48, 72 saat TUNEL uygulamaları için ayrı ayrı yapıldı.

24 saat *Aronia Melanocarpa*'nın 5 farklı dozu için kontrol grubunda %10 hücre TUNEL pozitifliği gösterirken, 10 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 42, 25 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 40, 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 45, 75 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 50, 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 40 pozitif reaktivite gösteren hücre sayısı bulundu. İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre tüm dozların $p < 0.001$ anlamlı olduğu gözlemlendi (Tablo 10, Şekil 16).

24 saat paklitakselin tek başına ve *Aronia Melanocarpa* ile kombinasyonları için yapılan değerlendirmelerde kontrol grubunda %10 hücre TUNEL pozitifliği gösterirken, 0,02µM/ml paklitaksel doz için % 50, paklitaksel 0,02 µM/ml doz + *Aronia Melanocarpa* 50 µg/ml doz için % 57 pozitif reaktivite gösteren hücre sayısı bulundu. İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre tüm dozların $p < 0.001$ anlamlı olduğu gözlemlendi (Tablo 13, Şekil 19).

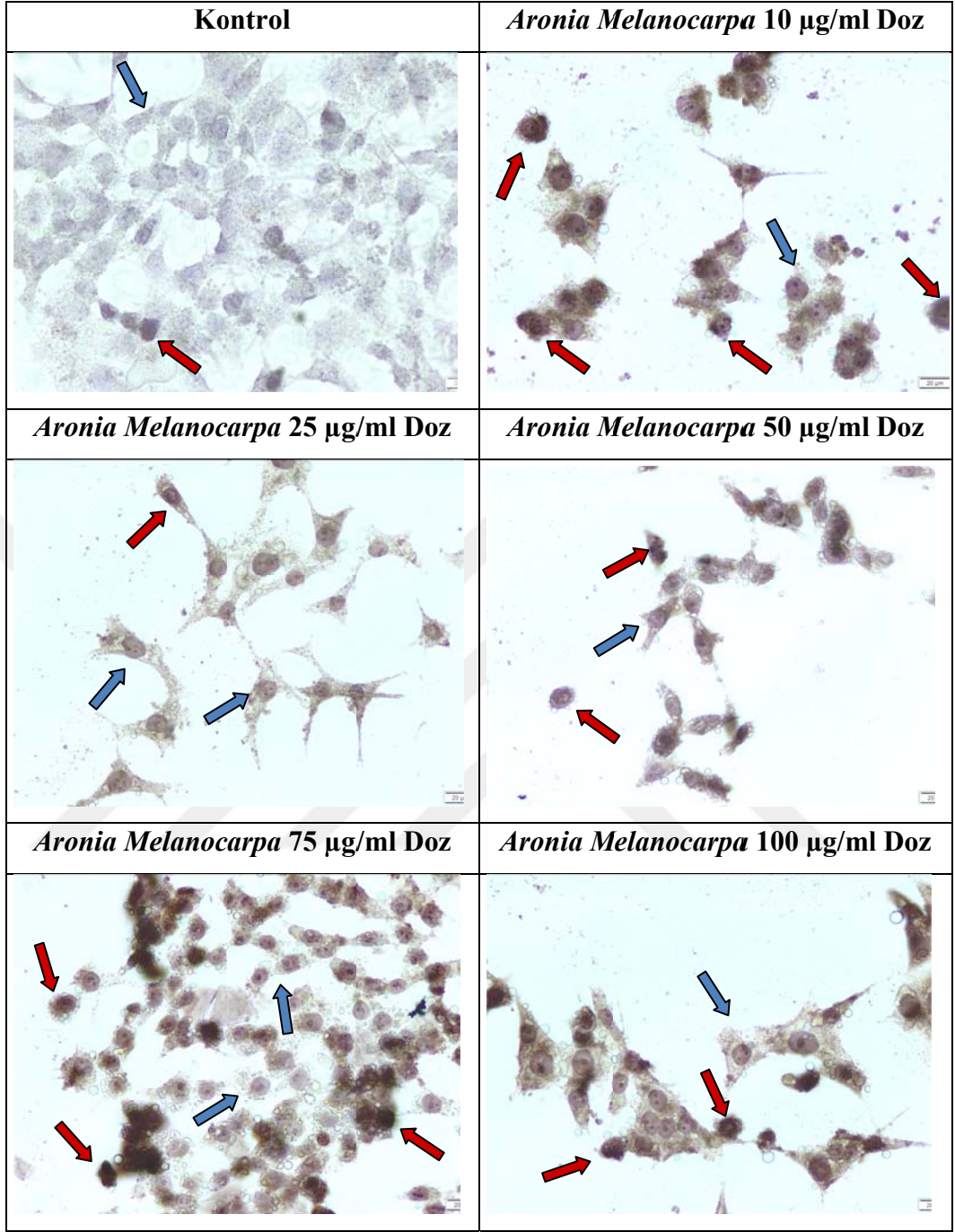
48 Saat için kontrol grubunda %12 hücre TUNEL pozitifliği gösterirken, 10 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 45, 25 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 42, 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 50, 75 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 60, 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 42 pozitif reaktivite gösteren hücre sayısı bulundu. İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre tüm dozların $p < 0.001$ anlamlı olduğu gözlemlendi (Tablo 11, Şekil 17).

48 saat paklitakselin tek başına ve *Aronia Melanocarpa* ile kombinasyonları için yapılan değerlendirmelerde kontrol grubunda %12 hücre TUNEL pozitifliği gösterirken, 0,02µM/ml paklitaksel doz için % 45, paklitaksel 0,02 µM/ml doz + *Aronia Melanocarpa* 50 µg/ml doz için % 55 pozitif reaktivite gösteren hücre sayısı bulundu. İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre tüm dozların $p < 0.001$ anlamlı olduğu gözlemlendi (Tablo 14, Şekil 20).

72 Saat için kontrol grubunda %16 hücre TUNEL pozitifliği gösterirken, 10 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 58, 25 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 42, 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 45, 75 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 42, 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* doz için % 38 pozitif reaktivite gösteren hücre sayısı bulundu. İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre tüm dozların $p < 0.001$ anlamlı olduğu gözlemlendi (Tablo 12, Şekil 18).

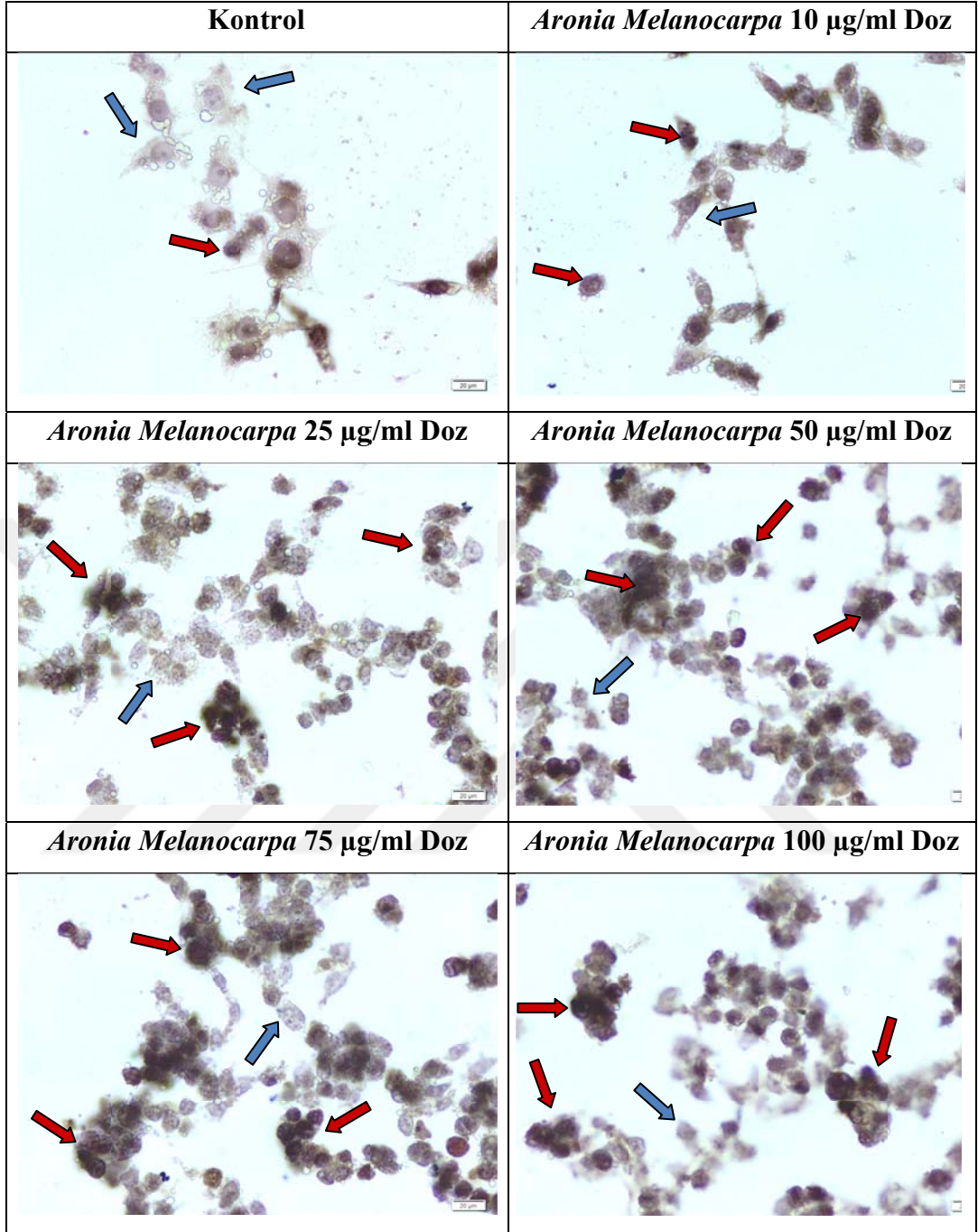
72 saat paklitakselin tek başına ve *Aronia Melanocarpa* ile kombinasyonları için yapılan değerlendirmelerde kontrol grubunda %16 hücre TUNEL pozitifliği gösterirken, 0,02µM/ml paklitaksel doz için % 48, paklitaksel 0,02 µM/ml doz + *Aronia Melanocarpa* 50 µg/ml doz için % 48 pozitif reaktivite gösteren hücre sayısı bulundu. İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre tüm dozların $p < 0.001$ anlamlı olduğu gözlemlendi (Tablo 15, Şekil 21).





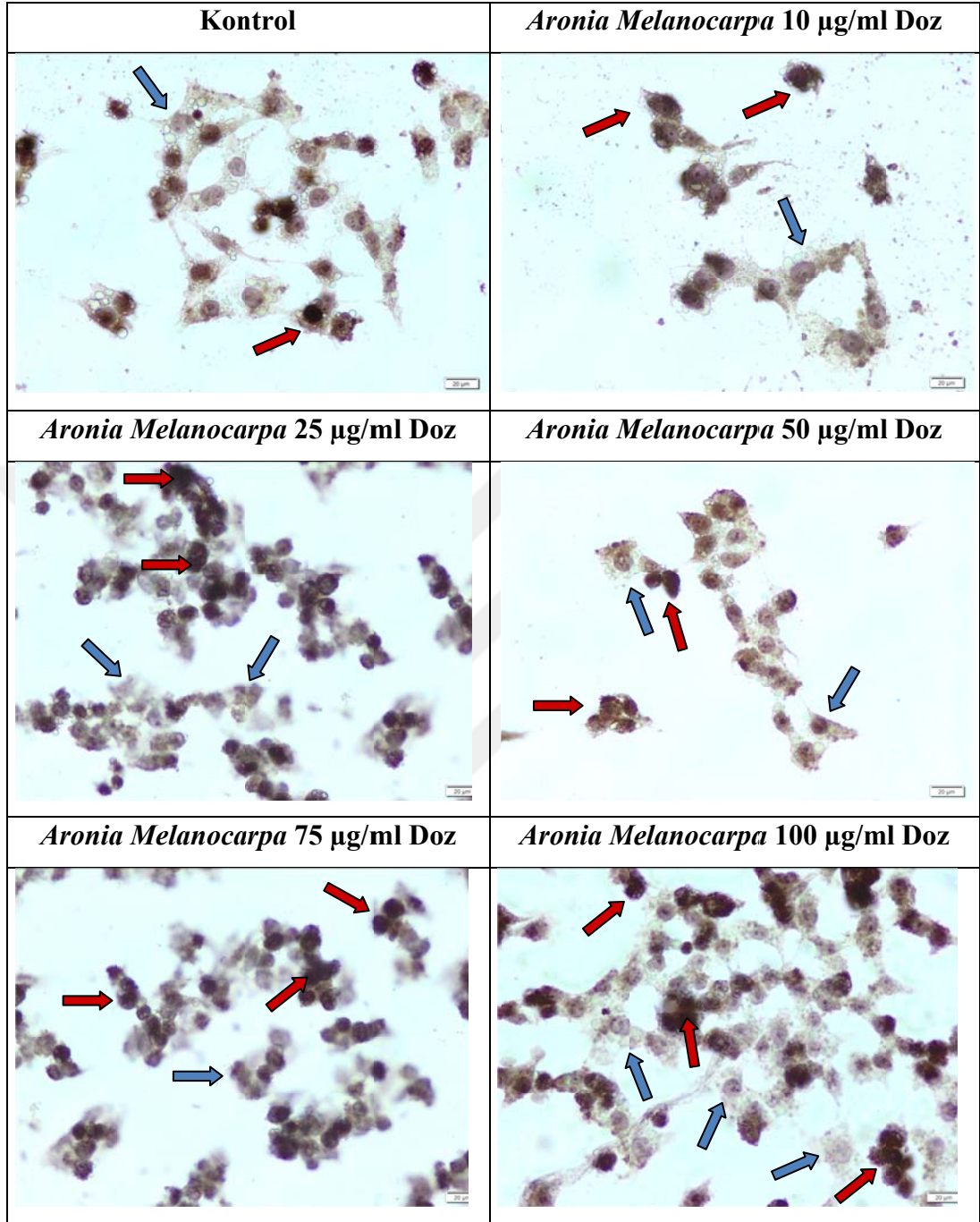
Şekil 16: En etkin olan 5 farklı *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 24 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi.

- (→) Kahverengi boyanıp sitoplazmik uzantılarını kaybetmiş apoptotik hücreler TUNEL (+),
 (→) diğer hücreler TUNEL (-) olarak gösterildi.



Şekil 17: En etkin olan 5 farklı *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 48 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi.

- (→) Kahverengi boyanıp sitoplazmik uzantılarını kaybetmiş apoptotik hücreler TUNEL (+),
 (→) diğer hücreler TUNEL (-) olarak gösterildi.



Şekil 18: En etkin olan 5 farklı *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 72 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi.

(→) Kahverengi boyanıp sitoplazmik uzantılarını kaybetmiş apoptotik hücreler TUNEL (+),
 (→) diğer hücreler TUNEL (-) olarak gösterildi.

Tablo 10: *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre 24 Saat TUNEL sonuçları

(24 Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
TUNEL (+) hücre sayısı	42	10	19.692; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	40	10	18.000; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	45	10	22.273; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	
TUNEL(+)hücre sayısı	50	10	26.667; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	40	10	26.667; <0.001

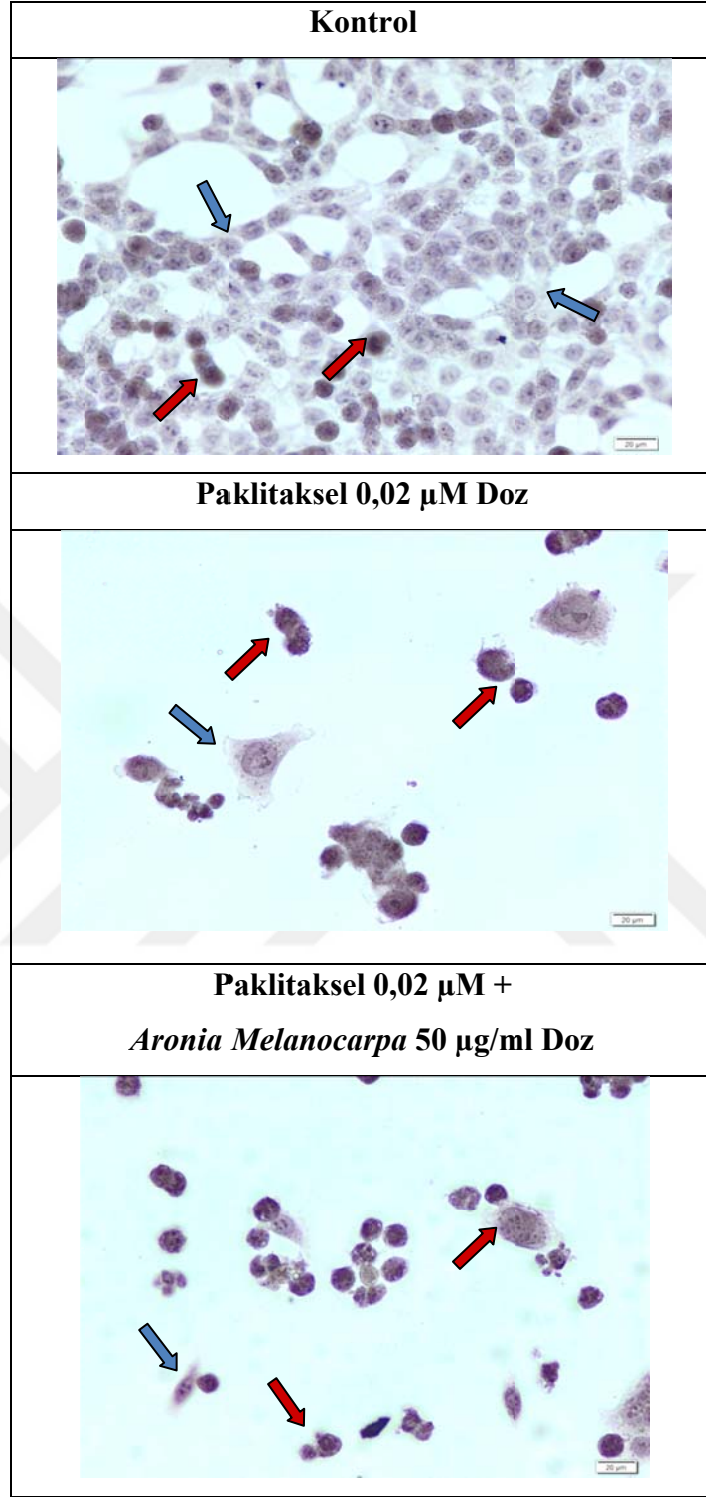
Tablo 11: *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre 48 Saat TUNEL sonuçları

(48 Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
TUNEL (+) hücre sayısı	45	12	19.105; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	42	12	16.667; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	50	12	23.290; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	

TUNEL(+) hücre sayısı	60	12	32.000; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz		
TUNEL (+) hücre sayısı	42	12	16.667; <0.001

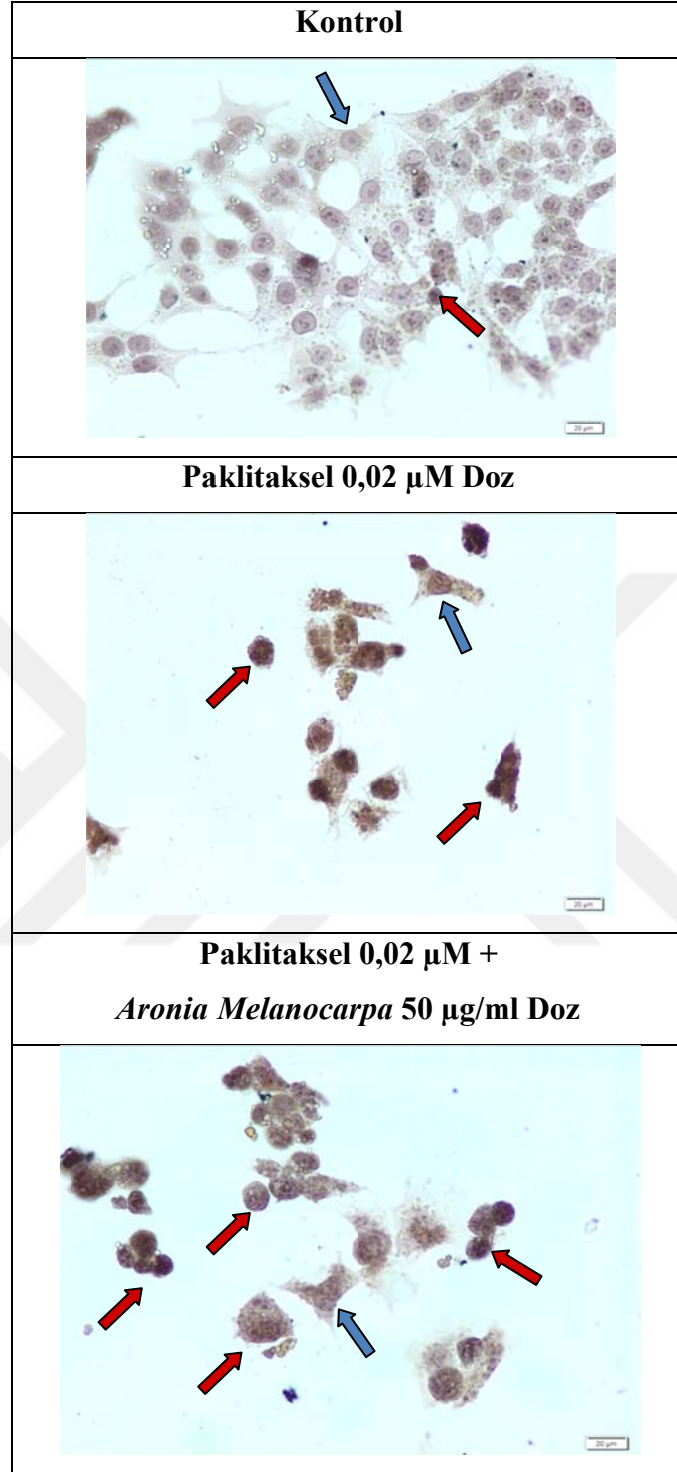
Tablo 12: *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre 72 Saat TUNEL sonuçları

(72 Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
TUNEL (+) hücre sayısı	58	16	23.838; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	42	16	11.655; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	45	16	13.787; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	42	16	11.655; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz		
TUNEL (+) hücre sayısı	38	16	8.963; 0.003



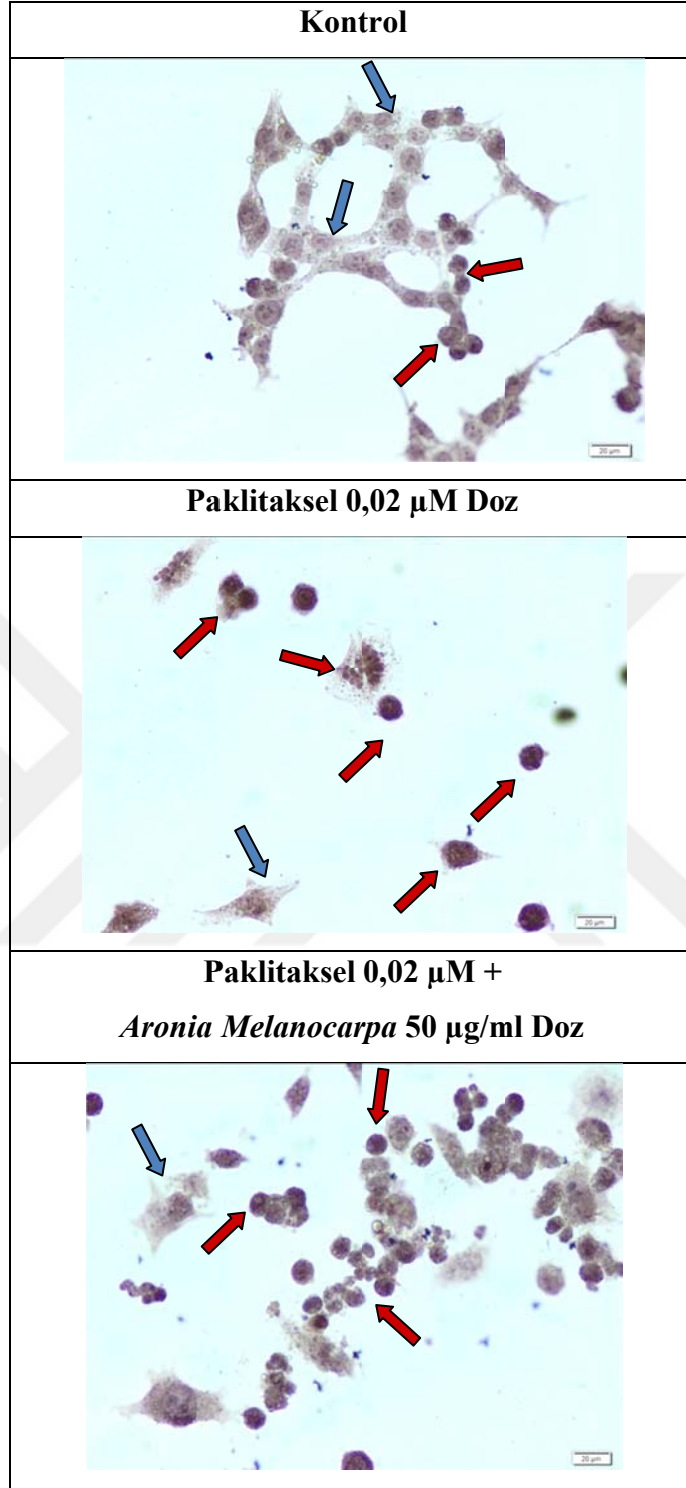
Şekil 19: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 24 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi.

- (→) Kahverengi boyanıp sitoplazmik uzantılarını kaybetmiş apoptotik hücreler TUNEL (+),
(→) diğer hücreler TUNEL (-) olarak gösterildi.



Şekil 20: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 48 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi.

- (→) Kahverengi boyanıp sitoplazmik uzantılarını kaybetmiş apoptotik hücreler TUNEL (+),
(⇨) diğer hücreler TUNEL (-) olarak gösterildi.



Şekil 21: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 72 saat sonrası için TUNEL değerlendirilmesi.

(→) Kahverengi boyanıp sitoplazmik uzantılarını kaybetmiş apoptotik hücreler TUNEL (+),
(→) diğer hücreler TUNEL (-) olarak gösterildi.

Tablo 13: Paklitaksel 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dozunun kontrol grubuna göre TUNEL sonuçları
(24, 48, 72 Saat)

(24 Saat)	Paklitaksel 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz χ^2 ; p
TUNEL (+) hücre sayısı	50	10	26.667; <0.001
(48 saat)	Paklitaksel 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	45	12	19.105; <0.001
(72 saat)	Paklitaksel 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	48	16	16.000; <0.001

Tablo 14: Paklitaksel 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Doz + *Aronia Melanocarpa* 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dozunun kontrol grubuna göre TUNEL sonuçları (24, 48, 72 Saat)

(24 Saat)	Paklitaksel 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Doz + <i>Aronia</i> <i>Melanocarpa</i> 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz χ^2 ; p
TUNEL (+) hücre sayısı	57	10	32.970; <0.001
(48 saat)	Paklitaksel 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Doz + <i>Aronia</i> <i>Melanocarpa</i> 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	55	12	27.597; <0.001
(72 saat)	Paklitaksel 0,02 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Doz + <i>Aronia</i> <i>Melanocarpa</i> 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doz	Kontrol	
TUNEL (+) hücre sayısı	48	16	16.000; <0.001

4.6. İmmünohistokimya Sonuçları

4.6.1. mTOR İmmünohistokimya Sonuçları

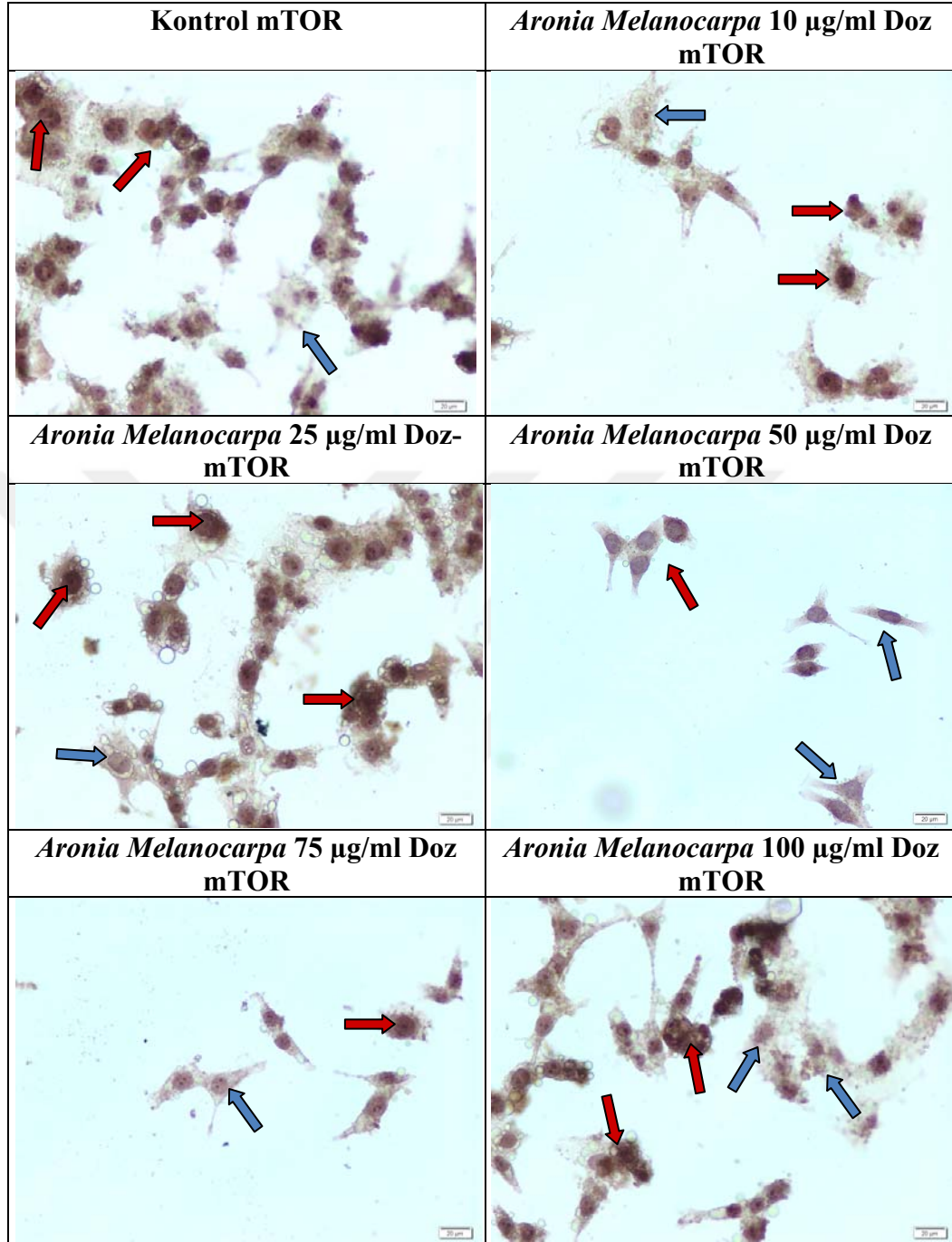
SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinin immünohistokimyasal mTOR boyaması sonucunda oluşan *Aronia Melanocarpa*'nın 5 farklı dozu için immün pozitifliğin değerlendirilmesinde; 24 saatlik kontrol grubunda immünpozitifliğin yüksek olduğu (++++) bu değerın 10 µg/ml kontrole göre anlamlı derece de azaldığı görülse de (++) (p < 0.009), 50 ve 75 µg/ml (+) (p < 0.001) negatife yakın görüldüğü, 25 µg/ml ve 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* uygulamasında ise immün pozitifliğin kontrole yaklaştığı (+++) (p > 0.05) belirlendi (Tablo 14). 48 saatlik *Aronia Melanocarpa* uygulamasına ise kontrole (++++) göre kıyaslandığında 10 µg/ml dozda immünpozitifliğin azaldığı (++) (p < 0.002), en iyi pozitifliğin azaldığı grupların 25, 50 ve 75 µg/ml'de (+) (p < 0.001) görüldüğü, 100 µg/ml dozda ise (+++) (p > 0.05) anlamlı bir azalma olmadığı belirlendi (Tablo 15) . 72 saatlik *Aronia Melanocarpa* uygulamasına ise kontrole (++++) göre kıyaslandığında 10 µg/ml dozda immünpozitifliğin azaldığı (++) (p < 0.003), en iyi pozitifliğin azaldığı grupların 25, 50 ve 75 µg/ml'de (+) (p < 0.001) görüldüğü, 100 µg/ml dozda ise (+++) (p > 0.05) anlamlı bir azalma olmadığı gibi dramatik bir şekilde pozitifliğin yükseldiği belirlendi. (Tablo 16).

SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinin immünohistokimyasal mTOR boyaması sonucunda oluşan paklitaksel 0,02 µM'da ve paklitaksel 0,02 µM + *Aronia Melanocarpa* 50 µg/ml'de dozu için immün pozitifliğin değerlendirilmesinde; 24 saatlik kontrol grubunda (++++), paklitakselin tek başına kullanıldığı grupta pozitiflik (++) (p < 0.009) iken paklitakselin *A. Melanocarpa* ile kombine grubunda (+) (p < 0.001) immün pozitifliğin anlamlı ölçüde azaldığı görüldü (Tablo 17). 48 saatlik kontrol grubunda (++++), paklitakselin tek başına ve *A. Melanocarpa* ile kombine kullanıldığı gruplarda pozitiflik (+) (p < 0.001) olarak immün pozitifliğin anlamlı ölçüde ve eşit miktarda azaldığı görüldü (Tablo 18). 72 saatlik kontrol grubunda (++++), paklitakselin tek başına kullanıldığı grupta pozitiflikte azalma (++) (p < 0.004) görülmesine rağmen 48 saate göre pozitifliğin fazla olduğu görüldü (Tablo 19).

72 saat için SKOV-3 hücrelerinde paklitaksele karşı direnç gelişmeye başladığı şeklinde yorumlandı. Paklitakselin, *A. Melanocarpa* ile kombine

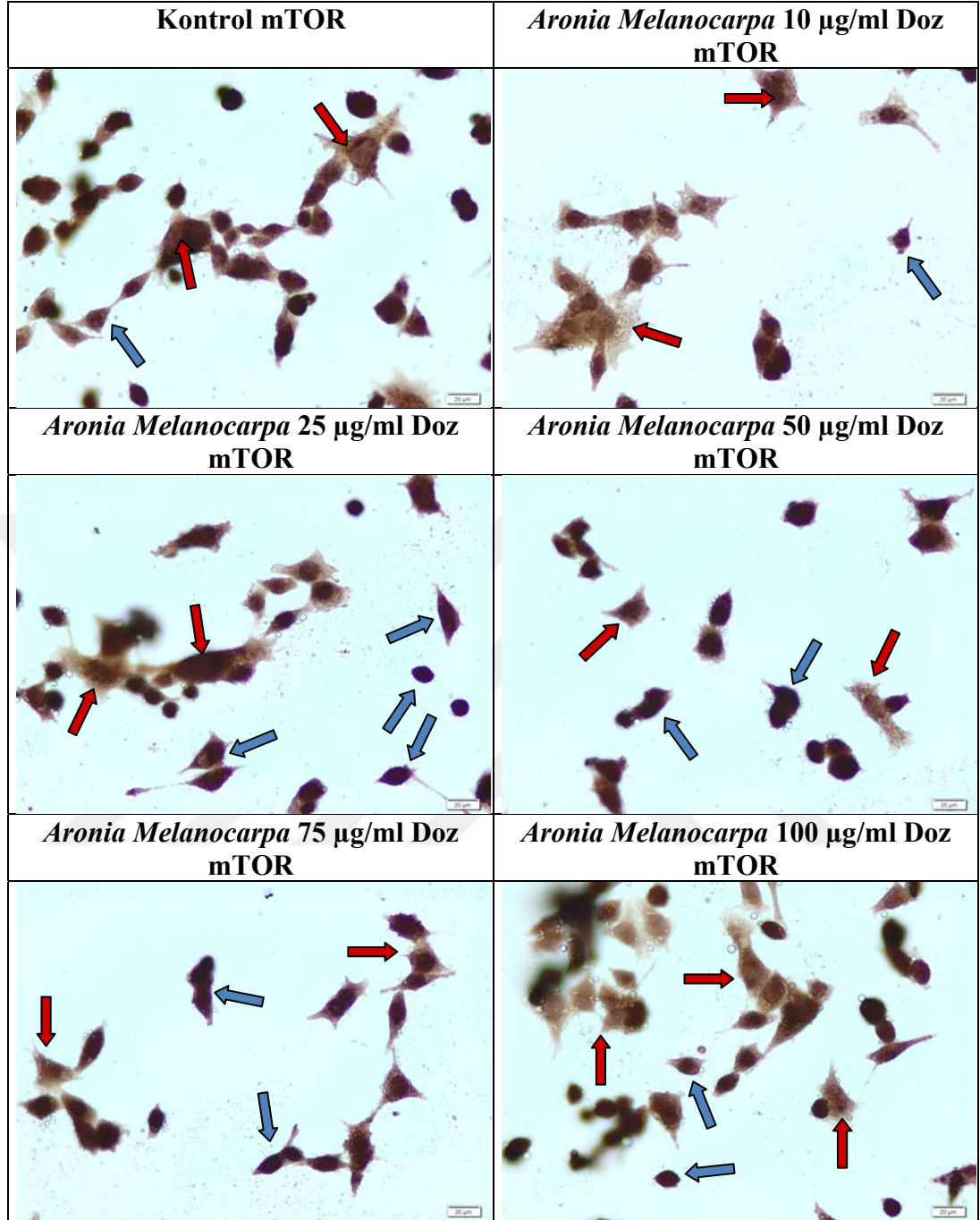
kullanıldığı grupta ise 24 ve 48 saate benzer şekilde (+) ($p < 0.001$) immün pozitiflik görülerek kontrole göre anlamlı ölçüde azaldığı görüldü. *A. Melanocarpa*'nın paklitaksel ile kombinasyonunun daha iyi olduğu kanıtlanmış oldu.





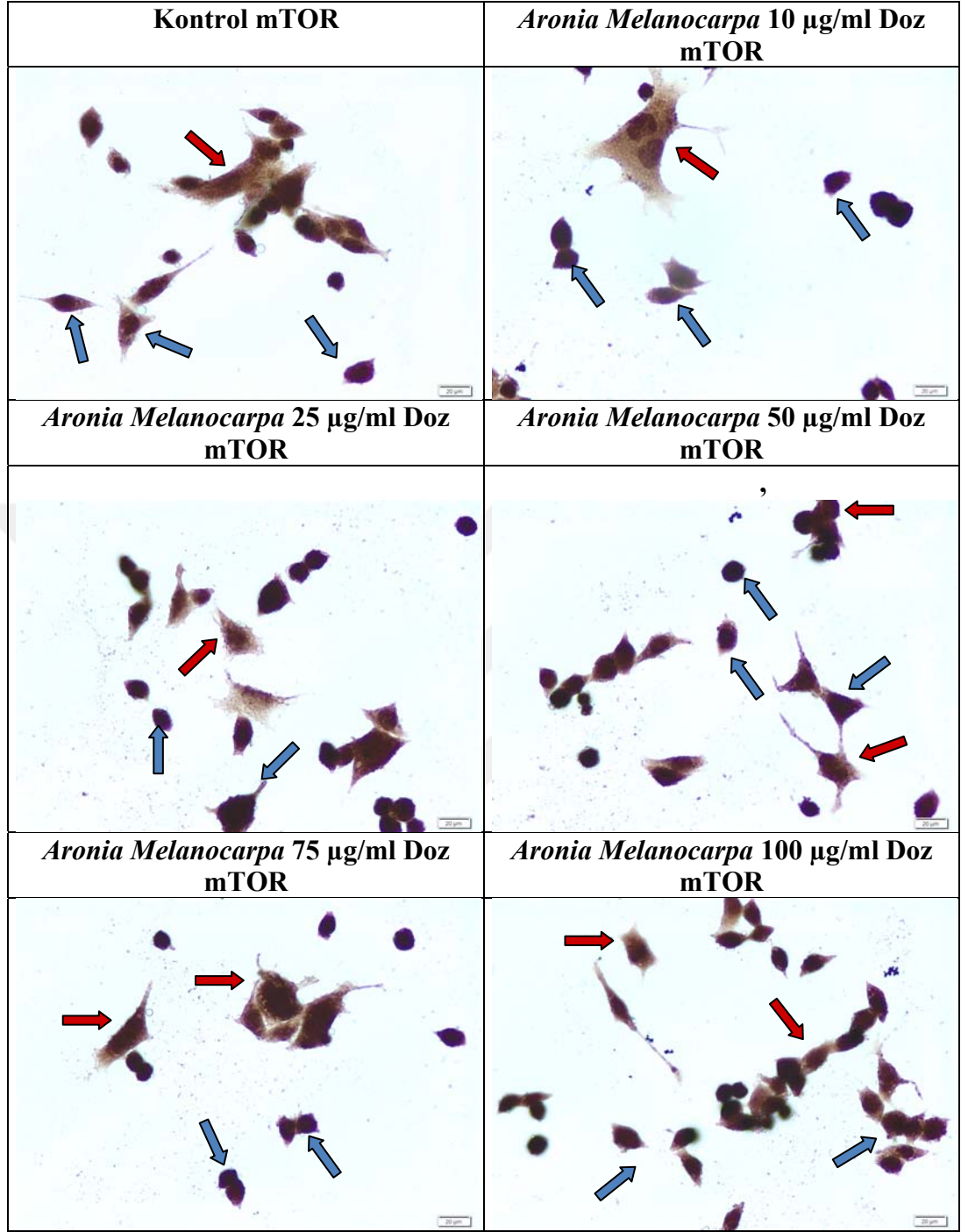
Şekil 22: *Aronia Melanocarpa*'ya ait 24 saat mTOR immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda mTOR immün pozitifliğinin (++++), 10 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda mTOR immün pozitifliğinin (++) , 25 ve 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen grupta mTOR immün pozitifliğinin (+++), 50 ve 75 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda ise mTOR immün pozitifliğinin (+) olduğu görüldü. . (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



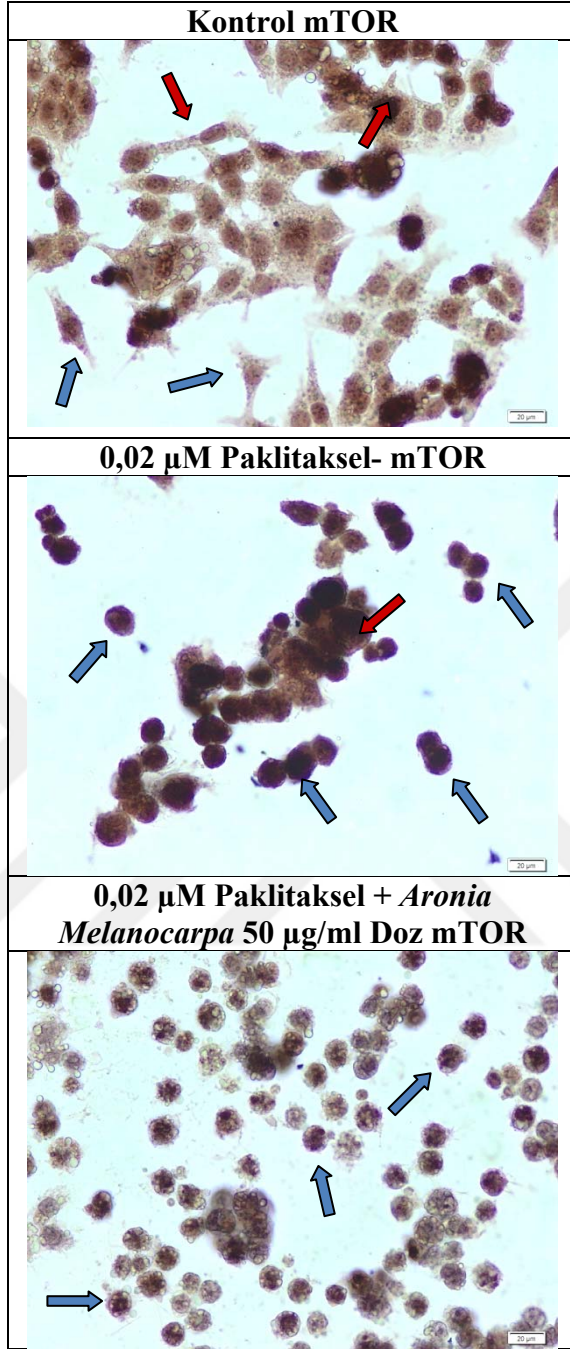
Şekil 23 : *Aronia Melanocarpa*'ya ait 48 saat mTOR immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda mTOR immün pozitifliğinin (++++), 10 µg/ml, *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda mTOR immün pozitifliğinin (++) , 25, 50 ve 75 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda (+) iken 100 µg/ml ise mTOR immün pozitifliğinin (+++) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



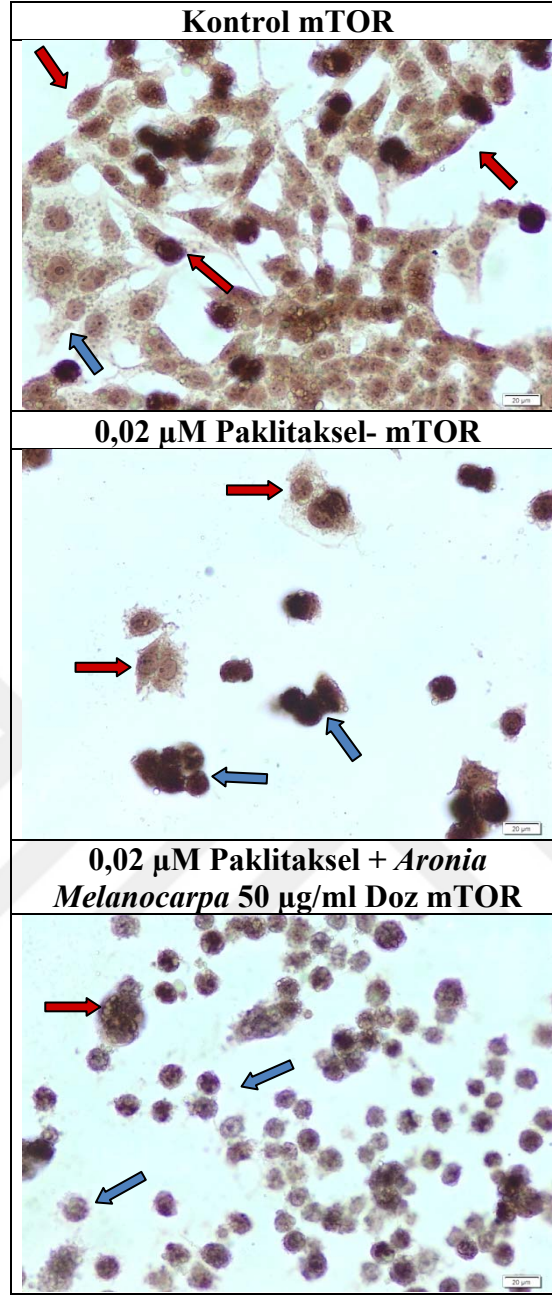
Şekil 24 : *Aronia Melanocarpa*'ya ait 72 saat mTOR immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda mTOR immün pozitifliğinin (++++), 10 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda mTOR immün pozitifliğinin (++) , 25, 50 ve 75µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda (+), 100 µg/ml verilen grupta ise (+++) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



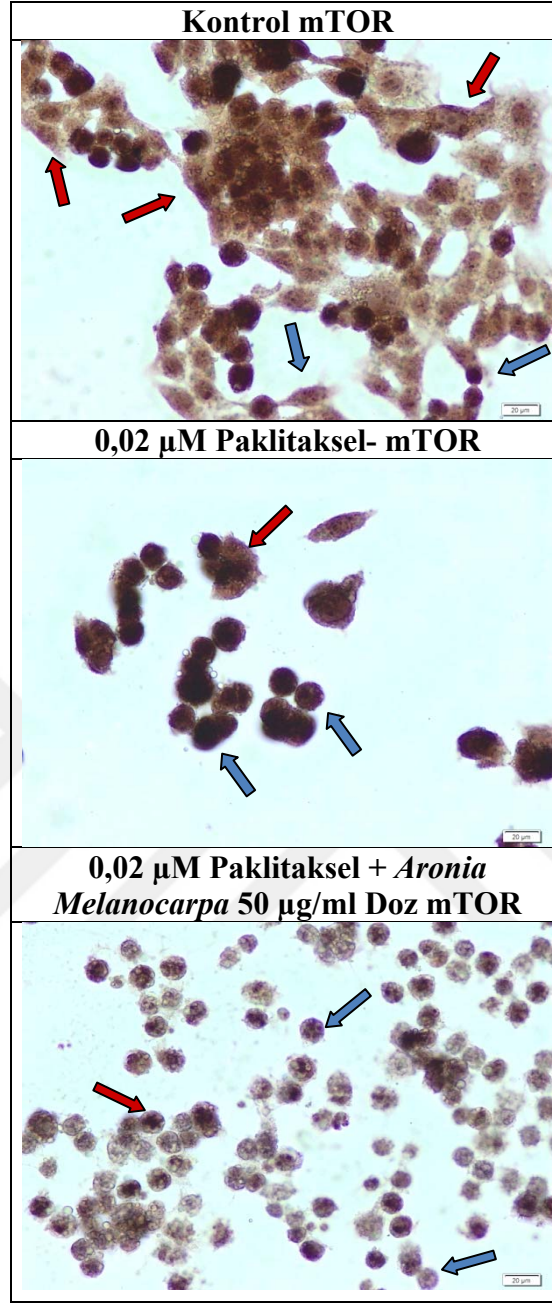
Şekil 25: En etkin olan 0,02 µM paclitaxel, 0,02 µM paclitaxel + 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 24 saat sonrası mTOR immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda mTOR immünohistokimya görüntüleri (++++), paclitaxel grubunda (++)
paclitaxel+A.melanocarpa grubunda (0) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler
immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler
(-) olarak gösterildi.



Şekil 26: En etkin olan 0,02 μM paklitaksel, 0,02 μM paklitaksel + 50 μg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 48 saat sonrası mTOR immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda mTOR immünohistokimya görüntüleri (++++), paklitaksel grubunda (+) ve paklitaksel+A.melanocarpa grubunda (+) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



Şekil 27: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 72 saat sonrası mTOR immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda mTOR immünohistokimya görüntüleri (++++), paklitaksel grubunda (++) , paklitaksel+A.melanocarpa grubunda (+) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.

Tablo 15: *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (24 Saat)

(24 Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
mTOR İmmünpozitifliği (%)	54	85	6.914; <0.009
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	68	85	1.889; >0.05
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	33	85	22.915; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	36	85	19.843; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	75	85	0.625; >0.05

Tablo 16: *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (48 Saat)

(48 Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
mTOR İmmünpozitifliği (%)	57	95	9.500; 0.002
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	48	95	15.448; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	28	95	36.496; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	

mTOR İmmünpozitifliği (%)	34	95	28.845; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	78	95	1.371; >0.05

Tablo 17: *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (72 Saat)

(72 Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
mTOR İmmünpozitifliği (%)	58	95	8.948; 0.003
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	48	95	15.448; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	38	95	24.429; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	42	95	20.504; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	75	95	2.353; >0.05

Tablo 18: Paklitaksel 0,02µm/ml İle paklitaksel 0,02µm/ml+ *Aronia Melanocarpa* 50µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (24 Saat)

(24 Saat)	Paklitaksel 0,02µM/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
mTOR İmmünpozitifliği (%)	54	85	6.914; 0.009
	Paklitaksel 0,02µM/ml+ <i>Aronia Melanocarpa</i> 50µg/ml	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	33	85	22.915; <0.001

Tablo 19: Paklitaksel 0,02µM/ml ile paklitaksel 0,02µM/ml+ *Aronia Melanocarpa* 50µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (48 saat)

(48 Saat)	Paklitaksel 0,02µM/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
mTOR İmmünpozitifliği (%)	48	90	12.783; <0.001
	Paklitaksel 0,02µM/ml+ <i>Aronia Melanocarpa</i> 50µg/ml	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	30	90	30.000; <0.001

Tablo 20: Paklitaksel 0,02µM/ml ile paklitaksel 0,02µM/ml+ *Aronia Melanocarpa* 50µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre mTOR immünpozitifliği (72 saat)

(72 Saat)	Paklitaksel 0,02µM/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
mTOR İmmünpozitifliği (%)	57	92	8.221; 0.004
	Paklitaksel 0,02µM/ml+ <i>Aronia Melanocarpa</i> 50µg/ml	Kontrol	
mTOR İmmünpozitifliği (%)	34	92	26.698; <0.001

4.6.2. PI3K İmmünohistokimya Sonuçları

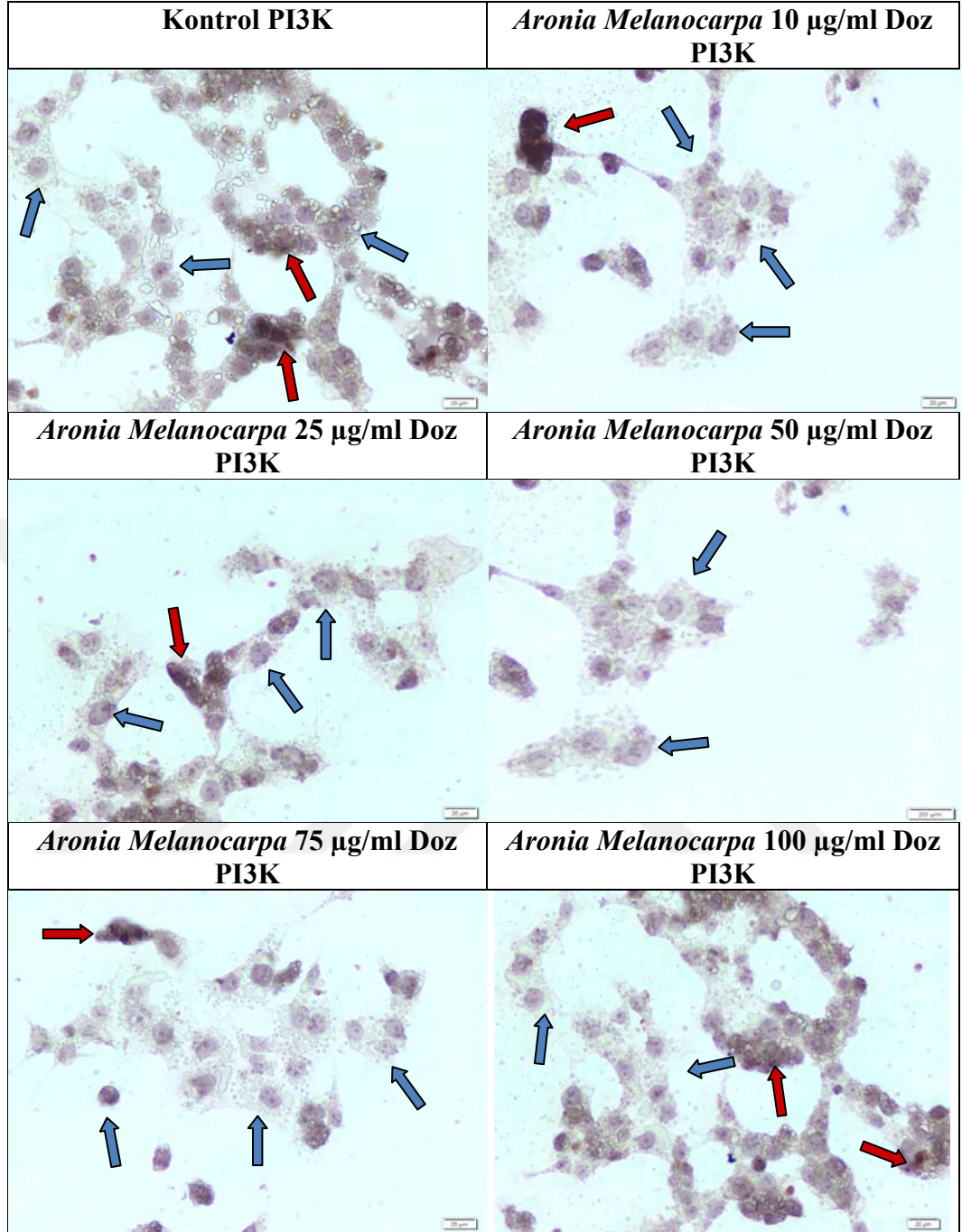
SKOV-3 ovarium kanseri hücrelerinin immünohistokimyasal PI3K boyaması sonucunda oluşan *Aronia Melanocarpa*'nın 5 farklı dozu için immün pozitifliğin değerlendirilmesinde; 24 saatlik kontrol grubunda immünpozitifliğin yüksek olduğu (++++) bu değer 10 µg/ml kontrole göre anlamlı derecede azaldığı görüldü de (++) (p < 0.005), 25 µg/ml'de (+) (p < 0.002) iken, 50 ve 75 µg/ml (+) (p < 0.001) negatife yakın görüldüğü, 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* uygulamasında ise immün pozitifliğin kontrolden çok az olduğu (+++) (p > 0.05) izlendi (Tablo 20). 48 saatlik *Aronia Melanocarpa* uygulamasına ise kontrole (++++) göre kıyaslandığında 10, 25 ve 100 µg/ml dozda immünpozitifliğin çok az olduğu (+++) (p > 0.05), 24 saate kıyasla 10 ve 25 µg/ml doza karşı SKOV-3 hücrelerinin direnç göstermeye başladığı, immün pozitifliğin azalmaya başladığı grubun 50 µg/ml'de (++) (p < 0.003) görüldüğü, 75 µg/ml dozda ise (+) (p < 0.001) en anlamlı azalmanın olduğu belirlendi (Tablo 21). 72 saatlik *Aronia Melanocarpa* uygulamasında ise kontrole (++++) göre kıyaslandığında 10 µg/ml, 25, 50 ve 75 µg/ml gruplarda (+) (p < 0.001) pozitifliğin en iyi şekilde azaldığı gözlenirken, 100 µg/ml dozda 24 ve 48 saate göre daha az pozitiflik (++) (p > 0.037) izlendi (Tablo 22).

SKOV-3 ovarium kanseri hücrelerinin immünohistokimyasal PI3K boyaması sonucunda oluşan paklitaksel 0,02 µM'da ve paklitaksel 0,02 µM + *Aronia Melanocarpa* 50 µg/ml'de dozu için immün pozitifliğin değerlendirilmesinde; 24 saatlik kontrol grubunda (++++), paklitakselin tek başına kullanıldığı grupta pozitiflik (++) (p < 0.013) iken paklitakselin *A. Melanocarpa* ile kombine grubunda (+) (p < 0.001) immün pozitifliğin anlamlı ölçüde azaldığı görüldü (Tablo 23). 48 saatlik kontrol grubunda (++++), paklitakselin tek başına ve *A. Melanocarpa* ile kombine kullanıldığı gruplarda pozitiflik (+) (p < 0.001) olarak immün pozitifliğin anlamlı ölçüde ve eşit miktarda azaldığı görüldü (Tablo 24). 72 saatlik kontrol grubunda (++++), paklitakselin tek başına kullanıldığı grupta pozitiflikte azalma (++) (p < 0.03) görülmesine rağmen 48 saate göre pozitifliğin fazla olduğu görüldü. Paklitakselin *A. Melanocarpa* ile kombine kullanıldığı grupta pozitiflik (+) (p < 0.001) olarak izlendi (Tablo 25).

72 saat için SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin tek kullanıldığı gruba bakıldığında hücrelerin paklitaksele karşı direnç geliştirmeye başladığı şeklinde

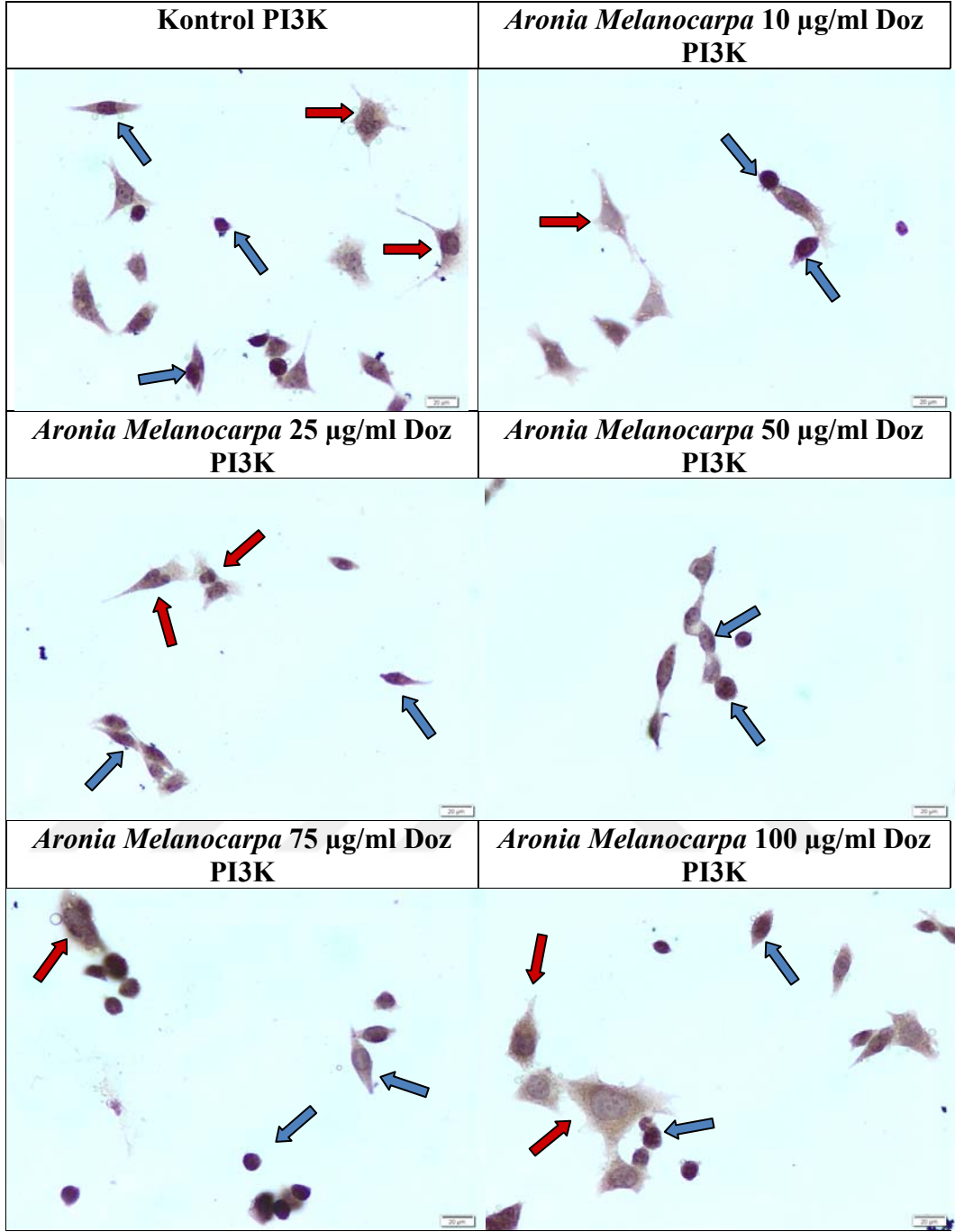
yorumlandı. Paklitakselin *A. Melanocarpa* ile kombine kullanıldığı grupta ise 24, 48 ve 72 saatlerde benzer şekilde (+) ($p < 0.001$) immün pozitiflik görülerek kontrole göre en iyi sonucu verdiği izlendi. *A. Melanocarpa*'nın paklitaksel ile kombinasyonunun daha iyi olduğu kanıtlanmış oldu.





Şekil 28: *Aronia Melanocarpa*'ya ait 24 saat PI3K immünohistokimya görüntüleri.

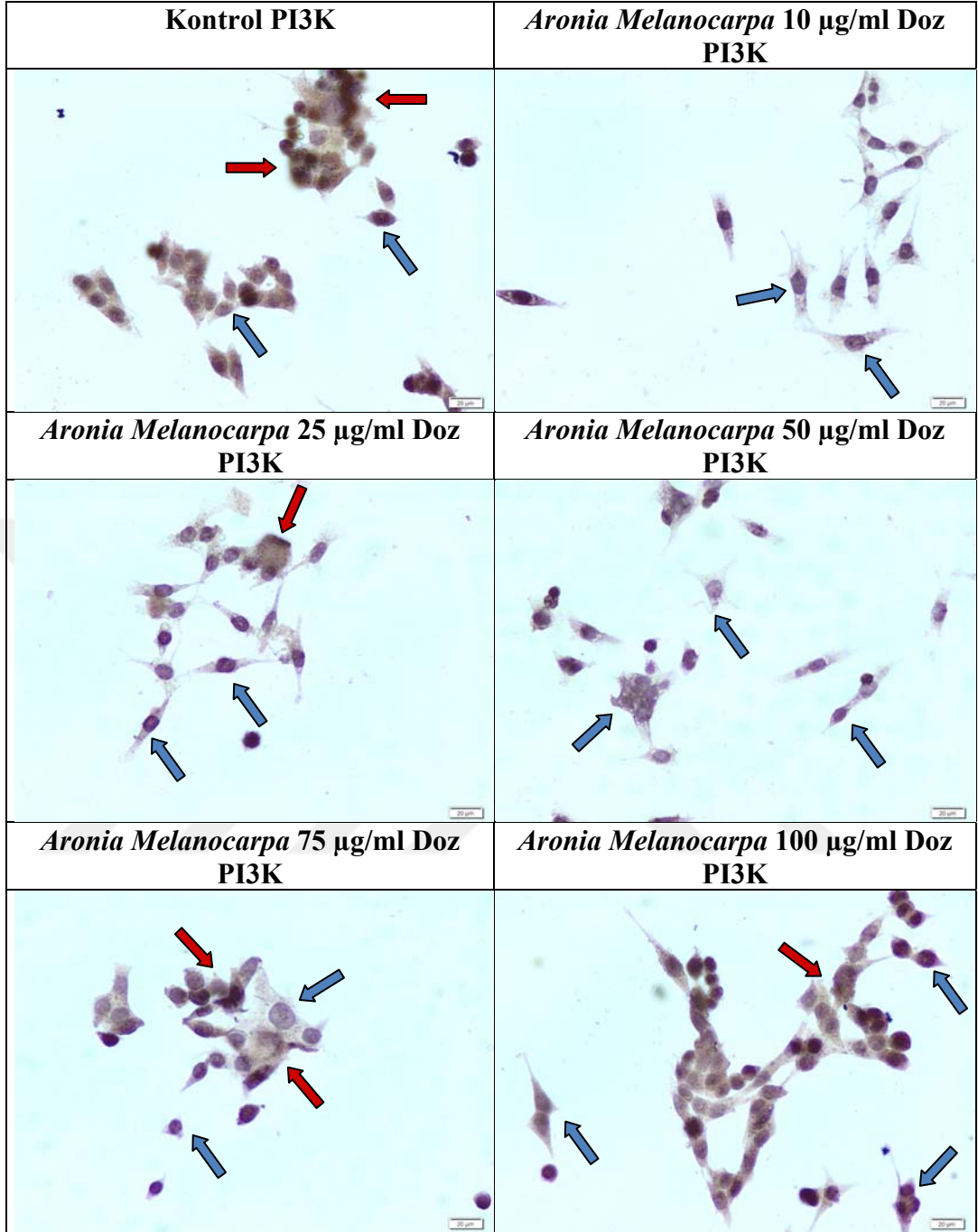
Kontrol grubunda PI3K immün pozitifliğinin (+++), 10 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen grupta PI3K immün pozitifliğinin (++), 25, 50 ve 75 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda ise PI3K immün pozitifliğinin (+) olduğu görülürken 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen grupta immün pozitifliğinin (+++) olduğu izlendi. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



Şekil 29: *Aronia Melanocarpa*'ya ait 48 saat PI3K immünohistokimya görüntüleri.

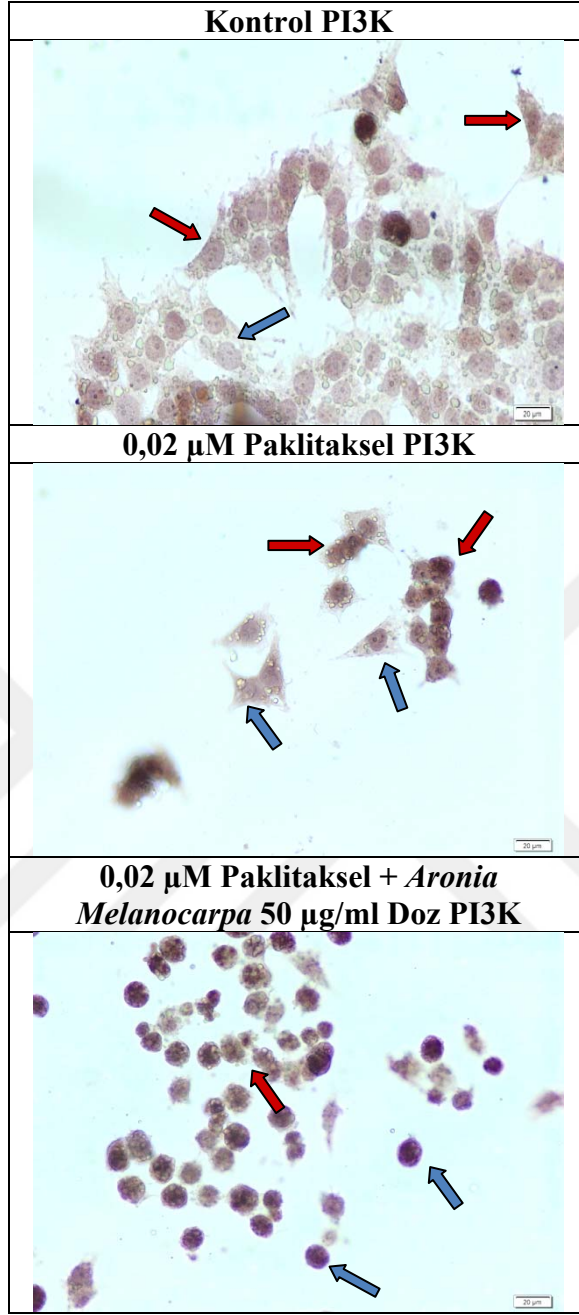
Kontrol grubunda PI3K immün pozitifliğinin (++), 10 µg/ml, 25 ve 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda PI3K immün pozitifliğinin (+++), 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda ise PI3K immün pozitifliğinin (++) olduğu ve 75 µg/ml doz grubunda pozitiflik (+) şeklinde izlendi.

(→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (←) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



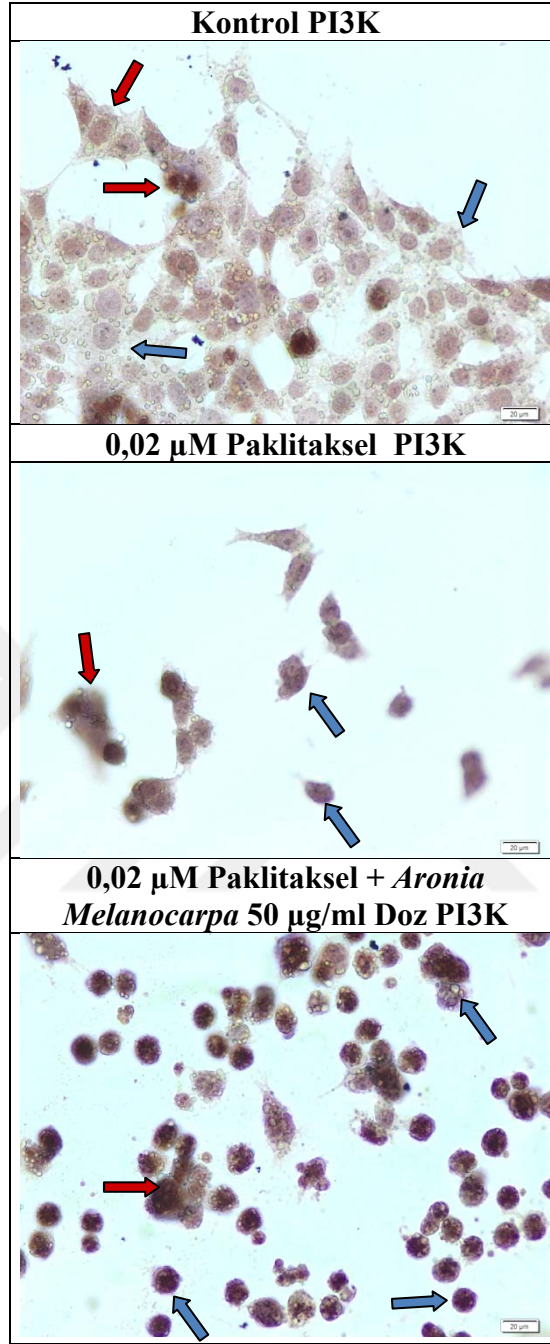
Şekil 30: *Aronia Melanocarpa*'ya ait 72 saat PI3K immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda PI3K immün pozitifliğinin (+++), 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 ve 75 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda PI3K immün pozitifliğinin (+), 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda ise PI3K immün pozitifliğinin (++) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.

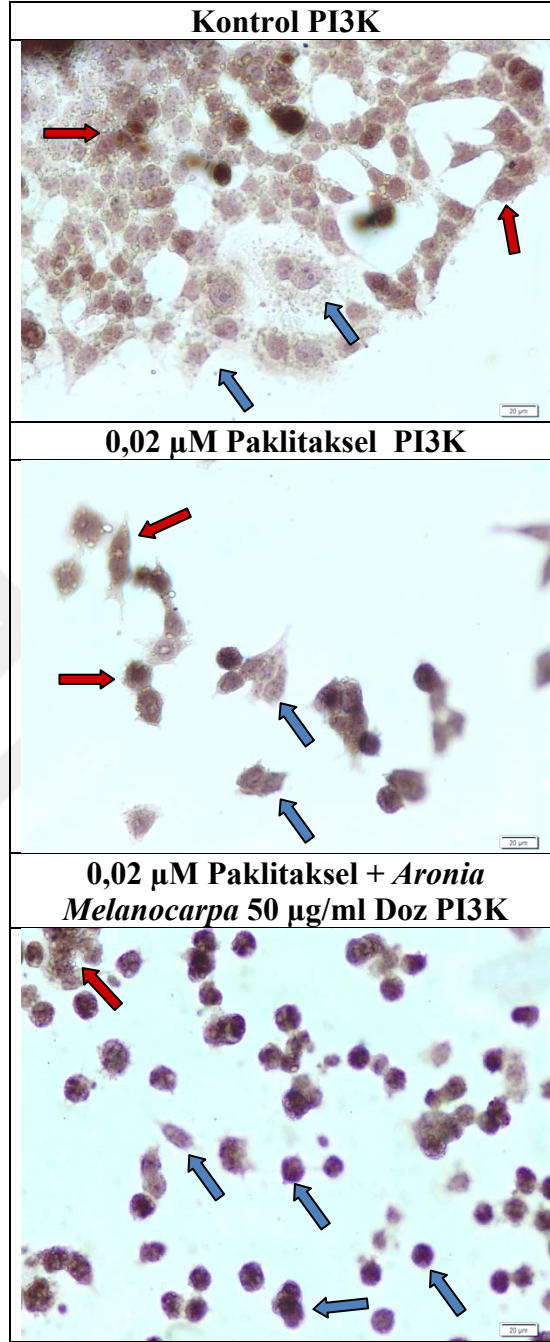


Şekil 31: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 24 saat sonrası PI3K immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda PI3K immün pozitifliği (++++), paklitaksel grubunda (++) paklitaksel+A.melanocarpa grubunda (+) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



Şekil 32: En etkin olan 0,02 μM paklitaksel, 0,02 μM paklitaksel + 50 μg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 48 saat sonrası PI3K immünohistokimya görüntüleri. Kontrol grubunda PI3K immün pozitifliği (++++), paklitaksel grubunda ve paklitaksel+A.melanocarpa grubunda (+) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



Şekil 33: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 72 saat sonrası PI3K immünohistokimya görüntüleri.
Kontrol grubunda PI3K immün pozitifliği (++++), paklitaksel grubunda (++)
paklitaksel+A.melanocarpa grubunda (+) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.

Tablo 21. *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre PI3K immünpozitifliği (24 saat)

(24Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
PI3K İmmünpozitifliği (%)	45	76	79.42; 0.005
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	42	76	9.797; 0.002
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	20	76	32.667; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	25	76	25.752; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	65	76	0.858; >0.05

Tablo 22. *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre PI3K immünpozitifliği (48 saat)

(48 Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
PI3K İmmünpozitifliği (%)	44	62	3.057; >0.05
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	44	62	3.057; >0.05
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	33	62	8.853; 0.003
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	28	62	12.844;

			<0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	58	62	0.133; >0.05

Tablo 23: *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre PI3K immünpozitifliği (72 saat)

(72 Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X^2 ; p
PI3K İmmünpozitifliği (%)	32	78	19.236; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	42	78	10.800; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	22	78	31.360; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	25	78	27.272; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	54	78	4.364; 0.037

Tablo 24: Paklitaksel 0,02µM/ml ile paklitaksel 0,02µM/ml+ *Aronia Melanocarpa* 50µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P13K immünpozitifliği (24 saat)

(24 Saat)	Paklitaksel 0,02µM/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X^2 ; p
PI3K İmmünpozitifliği (%)	45	72	6.231; 0.013
	Paklitaksel 0,02µM/ml+ <i>Aronia Melanocarpa</i> 50µg/ml	Kontrol	
PI3K İmmünpozitifliği (%)	35	72	12.794; <0.001

Tablo 25: Paklitaksel 0,02µM/ml ile paklitaksel 0,02µM/ml+ *Aronia Melanocarpa* 50µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P13K immünpozitifliği (48 saat)

(48 Saat)	Paklitaksel 0,02µM/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
P13K İmmünpozitifliği (%)	40	78	12.237; <0.001
	Paklitaksel 0,02µM/ml+ <i>Aronia Melanocarpa</i> 50µg/ml	Kontrol	
P13K İmmünpozitifliği (%)	30	78	21.333; <0.001

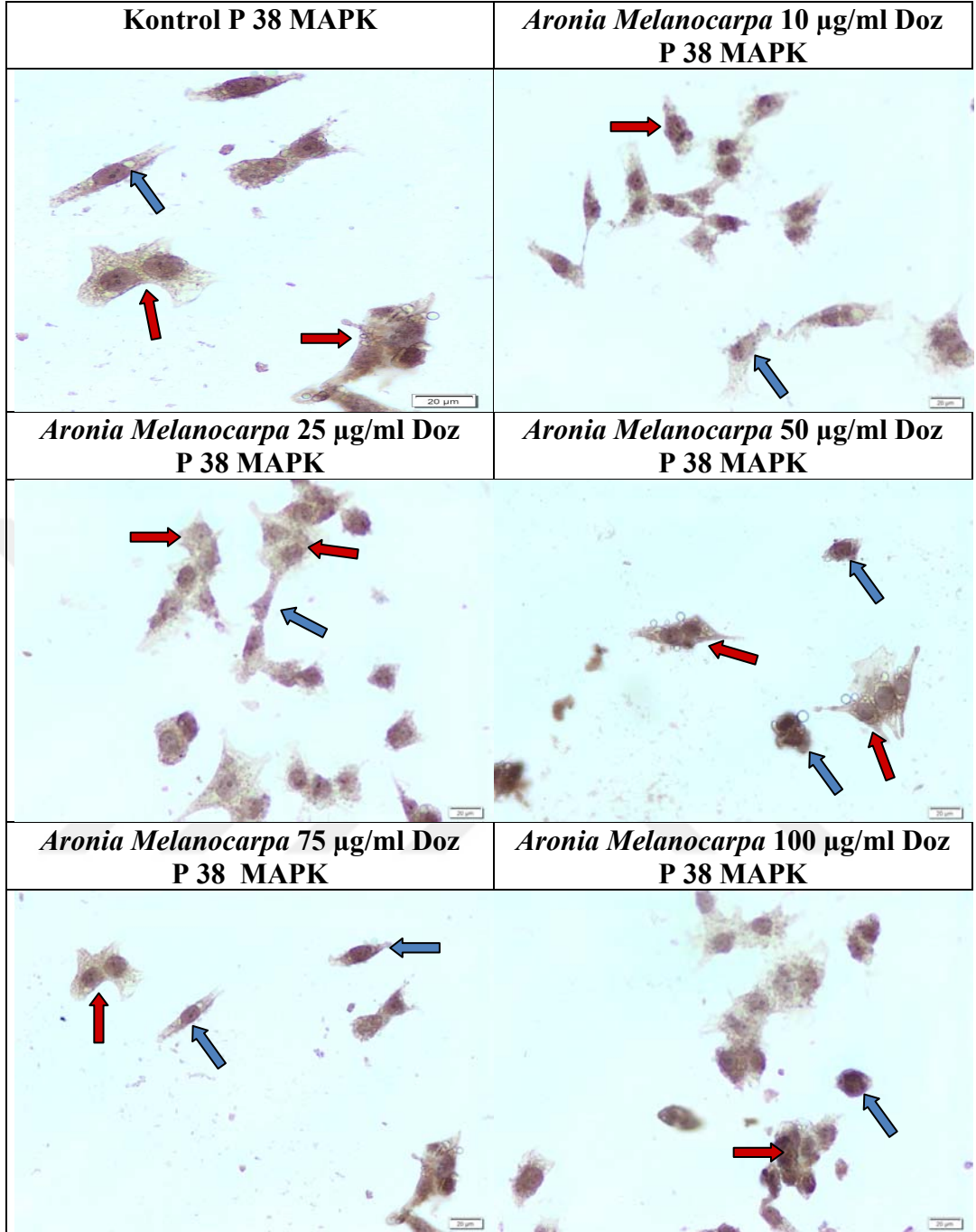
Tablo 26: Paklitaksel 0,02µM/ml ile paklitaksel 0,02µM/ml+ *Aronia Melanocarpa* 50µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P13K immünpozitifliği (72 saat)

(72 Saat)	Paklitaksel 0,02µM/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
P13K İmmünpozitifliği (%)	47	80	8.575; 0.003
	Paklitaksel 0,02µM/ml+ <i>Aronia Melanocarpa</i> 50µg/ml	Kontrol	
P13K İmmünpozitifliği (%)	28	80	25.037; <0.001

4.6.3. p 38 MAPK İmmünohistokimya Sonuçları

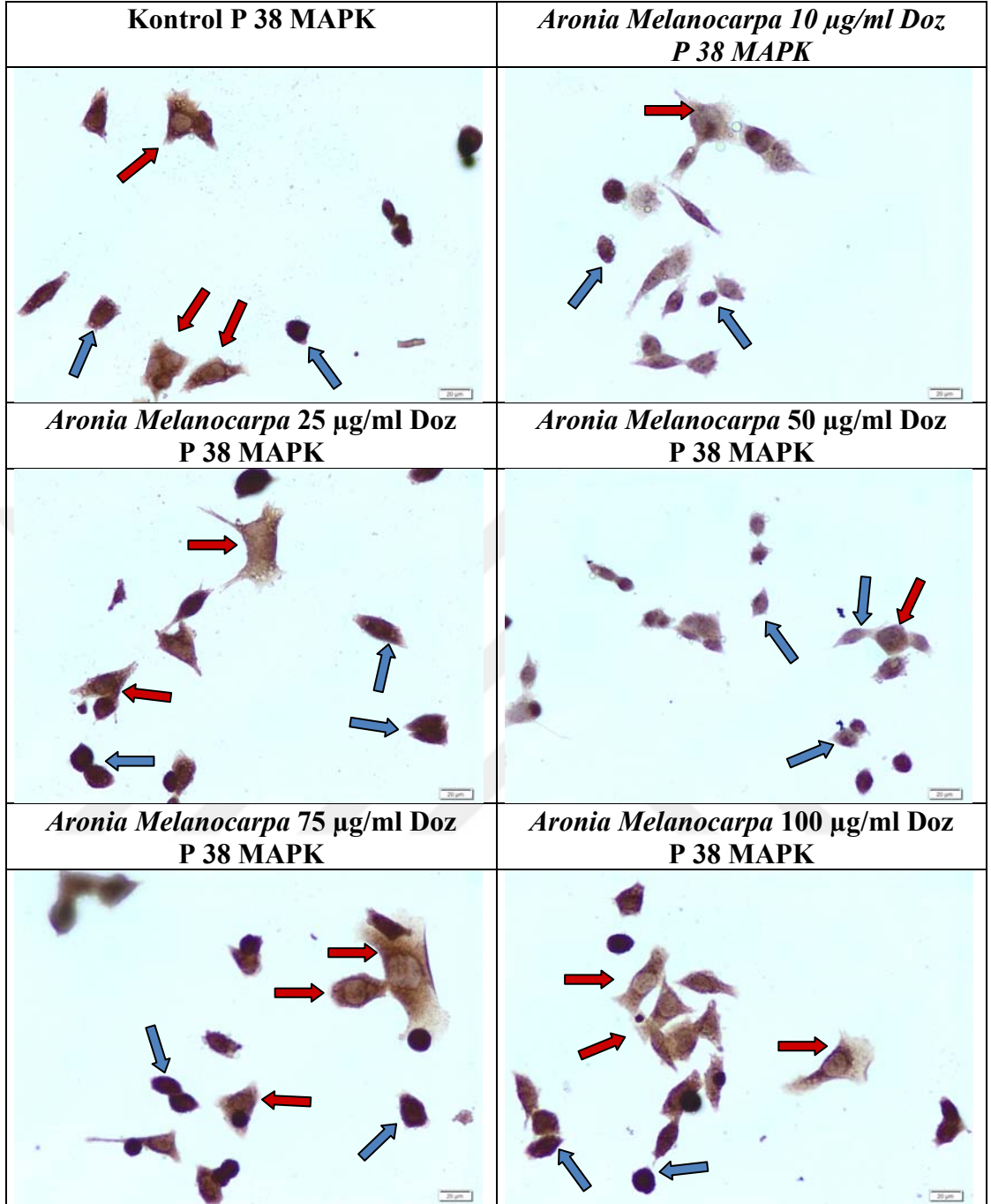
SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinin immünohistokimyasal p 38 MAPK boyaması sonucunda oluşan *Aronia Melanocarpa*'nın 5 farklı dozu için immün pozitifliğin değerlendirilmesinde; 24 saatlik kontrol grubunda immünpozitifliğin yüksek olduğu (++++) bu değerın 10 µg/ml kontrole göre anlamlı derece de azaldığı görülürken (++) (p < 0.002), 25, 50 ve 75 µg/ml (+) (p < 0.001) negatife yakın görüldüğü, 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* uygulamasında ise immünpozitifliğin kontrole yaklaştığı (+++) (p > 0.05) belirlendi (Tablo 26). 48 saatlik *Aronia Melanocarpa* uygulamasına ise kontrole (++++) göre kıyaslandığında en iyi pozitifliğin azaldığı grupların 10 ve 50 µg/ml'de (+) (p < 0.001) görüldüğü, 25 µg/ml'de immün pozitifite (++) (p < 0.012) iken, 75 ve 100 µg/ml dozda ise (+++) (p > 0.05) anlamlı bir azalma olmadığı belirlendi (Tablo 27). 72 saatlik *Aronia Melanocarpa* uygulamasına ise kontrole (++++) göre kıyaslandığında 10 µg/ml dozda immünpozitifliğin azaldığı (++) (p < 0.002), en iyi pozitifliğin azaldığı grupların 25, 50 ve 75 µg/ml'de (+) (p < 0.001) görüldüğü, 100 µg/ml dozda ise (+++) (p > 0.05) anlamlı bir azalma olmadığı gibi dramatik bir şekilde pozitifliğin yükseldiği belirlendi. (Tablo 28).

SKOV-3 ovaryum kanseri hücrelerinin immünohistokimyasal mTOR boyaması sonucunda oluşan paklitaksel 0,02 µM'da ve paklitaksel 0,02 µM + *Aronia Melanocarpa* 50 µg/ml'de dozu için immünpozitifliğin değerlendirilmesinde; 24 saatlik kontrol grubunda (++++), paklitakselin tek başına kullanıldığı grupta pozitiflik (++) (p < 0.002) iken paklitakselin *A. Melanocarpa* ile kombine grubunda (+) (p<0.001) immün pozitifliğin anlamlı ölçüde azaldığı görüldü (Tablo 29). 48 ve 72 saatlerde kontrol grubunda immün pozitiflik (++++) iken, paklitakselin tek başına ve *A. Melanocarpa* ile kombine kullanıldığı gruplarının pozitifliği (+) (p < 0.001) anlamlı ölçüde ve eşit miktarda azaldığı görüldü (Tablo 30-31).



Şekil 34: *Aronia Melanocarpa*'ya ait 24 saat p 38 MAPK immünohistokimya görüntüleri.

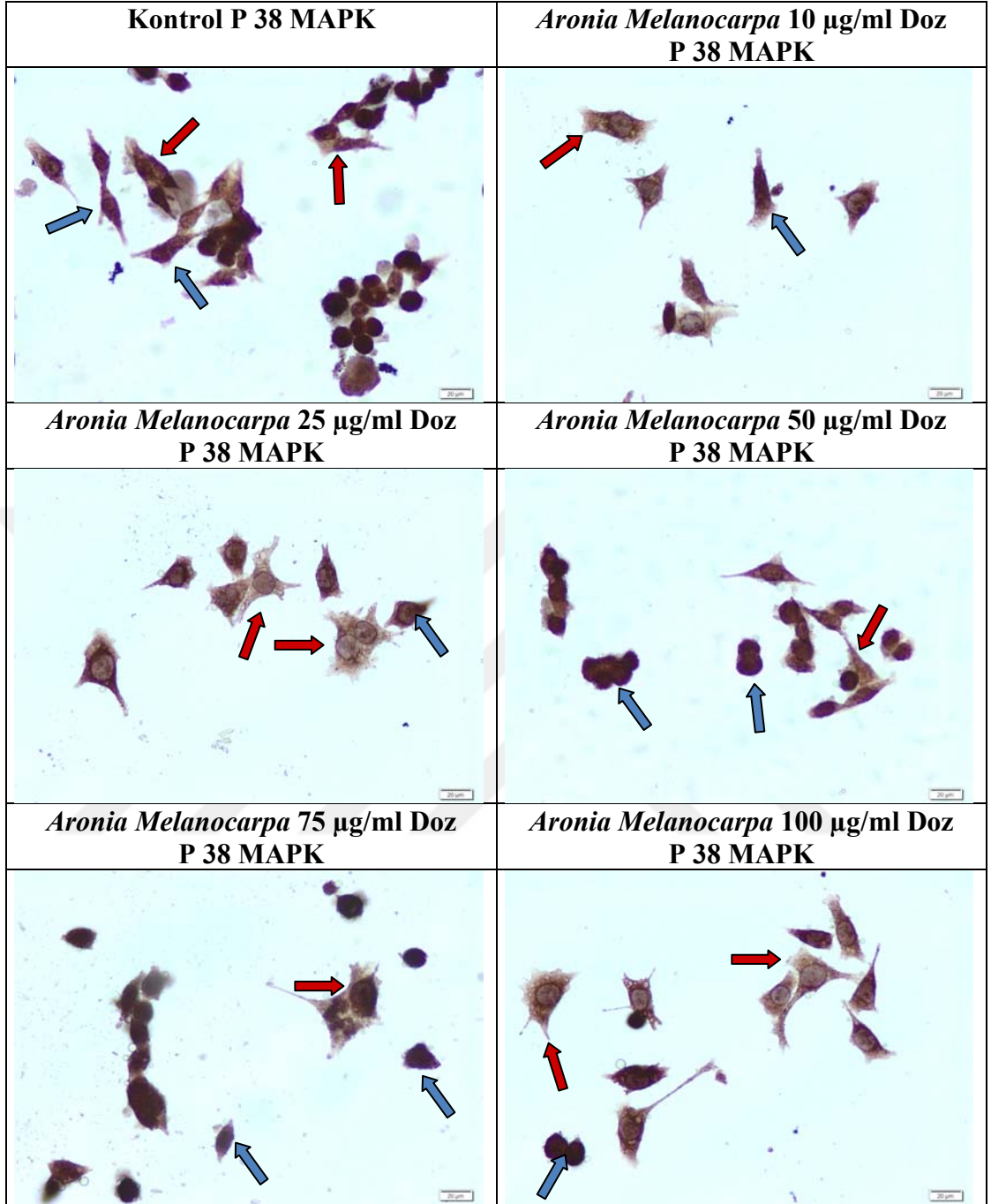
Kontrol grubunda p 38 MAPK immün pozitifliğinin (+++), 25 µg/ml, 50 ve 75 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda p 38 MAPK immünpozitifliğinin (+), 10 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda ise p 38 MAPK immün pozitifliğinin (++) olduğu, 10 µg/ml doz için ise pozitifitenin (++) görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



Şekil 35: *Aronia Melanocarpa*'ya ait 48 saat p 38 MAPK immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda p 38 MAPK immünopozitifliğinin (+++), 10 ve 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda p 38 MAPK immün pozitifliğinin (+), 25 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen grupta ise p 38 MAPK immün pozitifliğinin (++), 75 ve 100 µg/ml dozlarda ise pozitifite (+++) olarak izlendi.

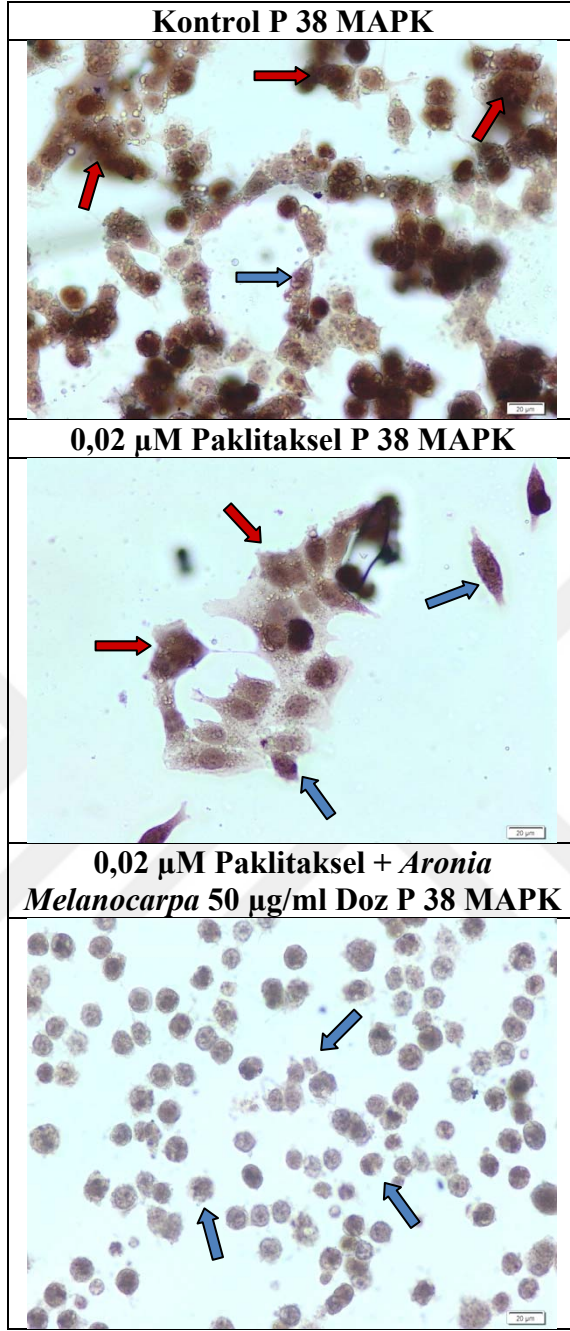
(→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



Şekil 36: *Aronia Melanocarpa*'ya ait 72 saat p 38 MAPK immünohistokimya görüntüleri.

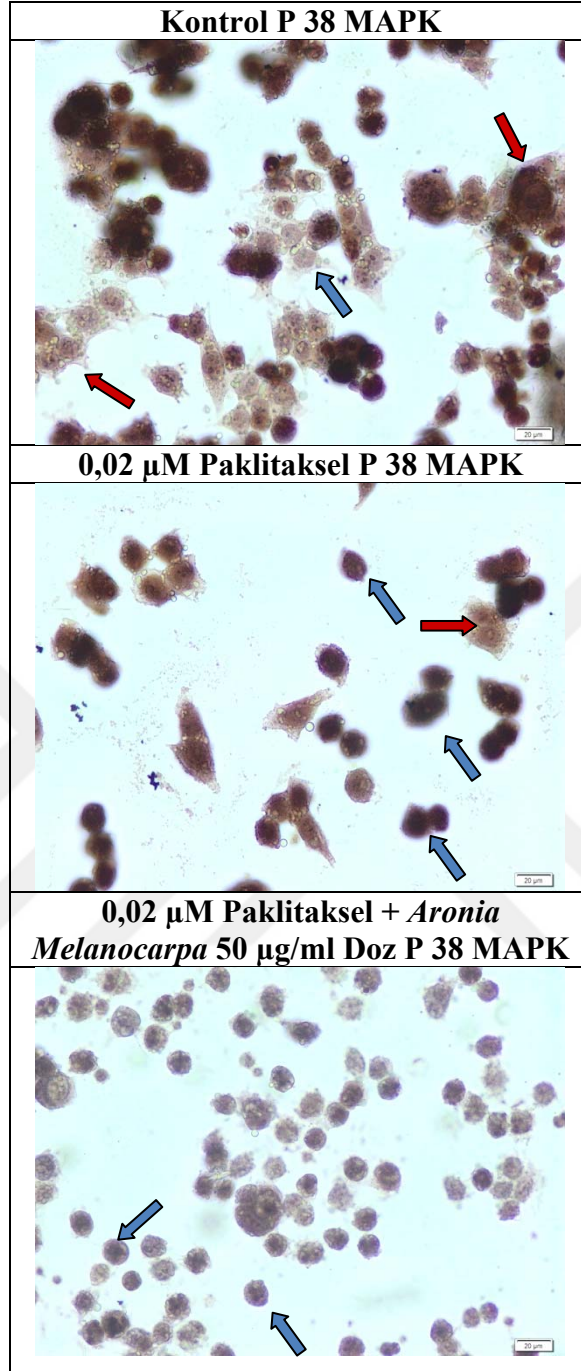
Kontrol grubunda p 38 MAPK immünpozitifliğinin (+++), 25 µg/ml , 50 ve 75 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda p 38 MAPK immünpozitifliğinin (+) iken 10 µg/ml'de (++), 100 µg/ml *Aronia Melanocarpa* verilen gruplarda ise p 38 MAPK immün pozitifliğinin (++) olduğu görüldü.

(→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.

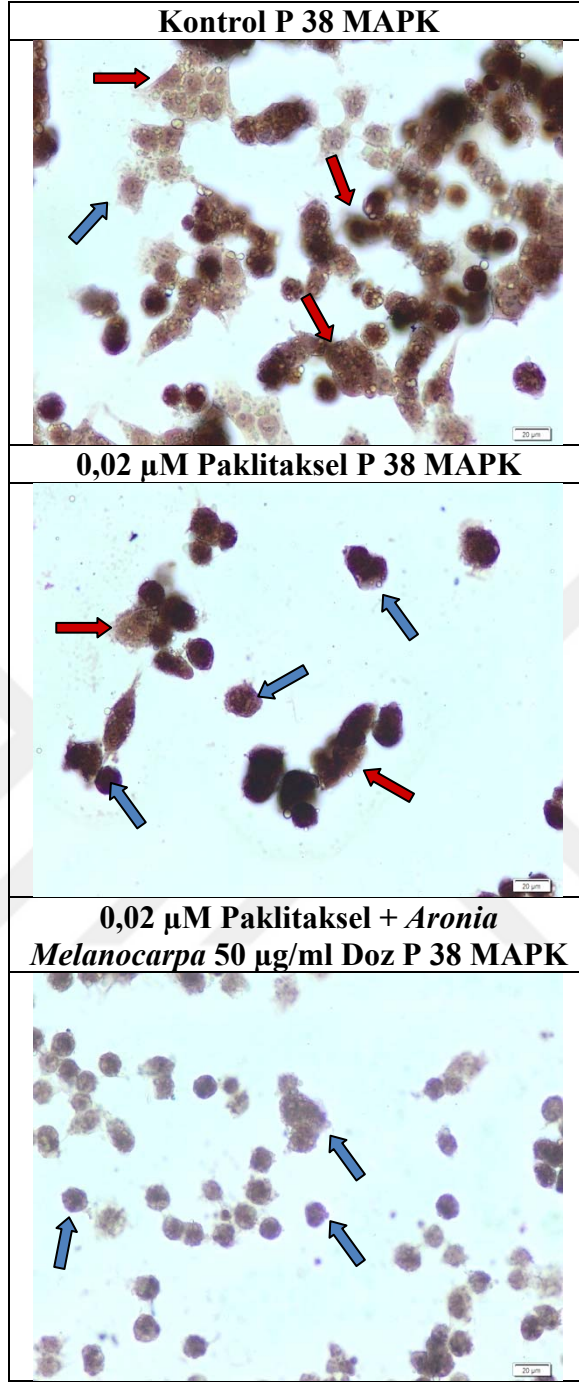


Şekil 37: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 24 saat sonrası p 38 MAPK immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda p 38 MAPK immünopozitifliği (++++), paklitaksel grubunda (++) paklitaksel+A.melanocarpa grubunda (+) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünoreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünoreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



Şekil 38: En etkin olan 0,02 µM paklitaksel, 0,02 µM paklitaksel + 50 µg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 48 saat sonrası p 38 MAPK immünohistokimya görüntüleri. Kontrol grubunda p 38 MAPK immünopozitifliği (++++) , paklitaksel ve paklitaksel+A.melanocarpa gruplarında (+) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.



Şekil 39: En etkin olan 0,02 μM paklitaksel, 0,02 μM paklitaksel + 50 μg/ml *Aronia Melanocarpa* konsantrasyonunun 72 saat sonrası p 38 MAPK immünohistokimya görüntüleri.

Kontrol grubunda p 38 MAPK immünopozitifliği (++++) , paklitaksel ve paklitaksel+A.melanocarpa grubunda (+) olduğu görüldü. (→) Kahverengi boyanan hücreler immünreaktivite gösteren hücreler (+), (→) diğer hücreler immünreaktivite göstermeyen hücreler (-) olarak gösterildi.

Tablo 27: *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği (24 saat)

(24Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	45	80	9.800; 0.002
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	43	80	11.130; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	35	80	17.609; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	32	80	20.571; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	73	80	0.320; >0.05

Tablo 28: *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği (48 saat)

(48 Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	35	81	18.241; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	52	81	6.323;

			0.012
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	30	81	23.432; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	60	81	3.128; >0.05
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	72	81	0.529; >0.05

Tablo 29: *Aronia Melanocarpa* dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği (72 saat)

(72 Saat)	<i>Aronia Melanocarpa</i> 10 µg/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	54	92	9.890; 0.002
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 25 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	28	92	34.133; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 50 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	42	92	18.657; <0.001
	<i>Aronia Melanocarpa</i> 75 µg/ml Doz	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	48	92	13.829; <0.001
	<i>Aronia</i>	Kontrol	

	<i>Melanocarpa</i> 100 µg/ml Doz		
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	72	92	2.439; >0.05

Tablo 30: Paklitaksel 0,02µM/ml ile paklitaksel 0,02µM/ml+ *Aronia Melanocarpa* 50µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği (24 saat)

(24 Saat)	Paklitaksel 0,02µM/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	45	80	9.800; 0.002
	Paklitaksel 0,02µM/ml+ <i>Aronia</i> <i>Melanocarpa</i> 50µg/ml	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	31	80	21.631; <0.001

Tablo 31: Paklitaksel 0,02µM/ml ile paklitaksel 0,02µM/ml+ *Aronia Melanocarpa* 50µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği (48 saat)

(48 Saat)	Paklitaksel 0,02µM/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz X ² ; p
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	42	84	14.000; <0.001
	Paklitaksel 0,02µM/ml+ <i>Aronia</i> <i>Melanocarpa</i> 50µg/ml	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	30	84	25.579; <0.001

Tablo 32: Paklitaksel 0,02µM/ml ile paklitaksel 0,02µM/ml+ *Aronia Melanocarpa* 50µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre P38 MAPK immünpozitifliği (72 saat)

(72 Saat)	Paklitaksel 0,02µM/ml Doz	Kontrol	İstatistiksel analiz χ^2 ; p
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	52	90	10.169; <0.001
	Paklitaksel 0,02µM/ml+ <i>Aronia</i> <i>Melanocarpa</i> 50µg/ml	Kontrol	
P38 MAPK İmmünpozitifliği (%)	32	90	27.574; <0.001

5. TARTIŞMA

Ovaryum kanseri, kadınlardaki maligniteler içinde yedinci sırada görülmektedir. Epitelyal over kanseri tüm ovaryum malign hastalıklarının yaklaşık % 90'ını oluşturur. Hastalıkta çözüm olabilmesi ve objektif bir sonuç elde edilmesi için endokrin tedavinin ya da kemoterapinin tek tek veya beraber uygulanması durumunda dahi süreç ölümle sonuçlanabilmektedir (77).

Son on yıl boyunca bu hastalığın tedavisinde kullanılan pek çok ilaç geliştirilmiştir. Bu ilaçlar arasında sisplatin, paklitaksel, doksorubisin, letrozol, anastrozol gibi ilaçlar sayılabilir (78). Bu şekilde kullanılan ve yeni uygulanan anti-tümör ilaçları ile kanser kemoterapisi hızla gelişmekte ve böylelikle pek çok kanser türü üzerinde daha pozitif sonuçlar elde edilmektedir. Çoğunlukla çeşitli kanser türleri üzerinde uygulanan kemoterapi başarılı sonuçlar doğururken, bazı durumlarda bu ilaçlar normal doku ve hücreler üzerinde yan etkiler oluşturmaktadır. Ayrıca vücudun ilaca karşı geliştirdiği direnç sonucunda tedavi etkinliğini kaybetmektedir. Klinik olarak da çok ciddi bir problem olan ilaç direncinin sebepleri ve mekanizmaları hâli hazırda araştırılmakta olan önemli bir konudur. Hücrenin apoptoz ya da anti-apoptoz yolunu seçmesi tamamen ilaca karşı göstermiş olduğu hassasiyetle veya dirençle ilgilidir (79).

Bazen çeşitli anti-tümör ajanları vasıtasıyla kanser hücrelerinde aktif hücre ölüm mekanizması olan apoptoz başlatılabilmektedir (80). Ancak bazı durumlarda apoptozun durdurulması ya da engellenmesi söz konusu olmakta, bu gibi durumlarda meydana gelen ilaç direncinin nedeninin ne olduğunun ortaya koyulması gerekmektedir (79).

Kemoterapötik ajanların amacı, normal hücrelere göre oldukça hızlı büyüyen ve çoğalan neoplastik hücreleri proliferatif dönemde iken tahrip edip ortadan kaldırmaktır. Birçok doku bu ilaçlardan olumsuz etkilenmektedir. Yan etkilerden en çok kan hücreleri, gastrointestinal sistemdeki hücreler, kıl folikülleri, spermiler, oositler, kalp, mesane, böbrekler, akciğerler ve sinir sistemi organları gibi hayati organlar etkilenmektedir (81).

Ayrıca bu ilaçlar ROS düzeylerinde artışa ve antioksidanlarda (GSH, GSH-Px, katalaz, vitamin A, E, C, çinko, melatonin ve sitokrom C) azalmalara neden olmaktadır (82). Bu nedenle parenteral veya oral yolla alınan farklı yapı ve özellikteki antioksidan maddeler yardımıyla ROS düzeyleri azaltılmaya ve antioksidan aktiviteleri arttırılarak kemoterapötiklerin oluşturduğu muhtemel yan etkiler azaltılmaya veya tamamen önlenmeye çalışılmaktadır.

Aronia melanocarpa flavonoidler (antosiyeninler, flavonoller ve flavanoller) ve fenolik asitler (hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler) gibi birkaç fenolik bileşik sınıfı dahil olmak üzere biyoaktif fitokimyasallar açısından zengindir. *Aronia* fenolikleri, antioksidan ve antosiyenin içeriği potansiyel olarak antikanserojenik aktiviteye neden olarak çoğalma, farklılaşma ve apoptozu kontrol eden hücre sinyal yollarında yer alan ana proteinleri yukarı veya aşağı yönde regüle ederek çok sayıda hücresel işlemleri modüle edebilir (83). İn vitro modeller, *Aronia melanocarpa* bileşenlerinin biyoaktivitesini değerlendirmek için önemli bir araçtır ve fenoliklerin proliferasyon ve apoptoz üzerindeki biyolojik etkileri açısından çok fazla kanıt mevcuttur. Bu sonuçların uygunluğu çalışmalar arasında değişen maruziyet süresi, doz ve kullanılan ekstrakt gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğu gösterilmiştir (83). Bu çalışmada yukarıda bahsedilen şekliyle yan etkisi olmayan, ilaç direnci geliştirmeyen, antioksidan ve anti-kanserojenik etkileri bilinen *Aronia melanocarpa*'yı SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin in vitro ortamda gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda gruplarımızdaki hücre yoğunluğunun, *Aronia* uygulanmayan grupta en yüksek değere sahip olduğunu ve bu değer *Aronia*'nın belirli konsantrasyonlarında düştüğü tespit edilmiştir.

Rugina ve ark. HeLa insan servikal tümör hücresi için *A.melanocarpa*'nın %50 baskılayıcı değerinin (IC50) 48 saat sonra 200 µg/ml olarak belirtmişlerdir (84). Bir çalışmada Zerdeçal ve *chokeberry* ekstresi için belirlenen IC50 değerleri sırasıyla 48 saat inkübasyon ile 15 ve 200 µg / ml olarak belirlenmiştir. Thani ve ark. Tarafından yapılan çalışmada, AsPC-1 pankreatik kanser hücre hattı için *Aronia melanocarpa* ve *gembisibisin* kombinasyonu kullanmışlar ve *Aronia*'yı tek kullandıkları grupta IC75 değeri 1 µg/ml bulunmuştur (85). *A.melanocarpa* gibi *chokeberry* türlerinden *Polaris* ile yapılan çalışmada HepG2 insan karaciğer kanser

hücre hattı üzerine 1 µg/ml 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml *Polaris* dozlarının hücre canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (75) .

Aronia meloncarpa ekstraktı normal kolon ve insan HT-29 kolon kanseri hücre dizileri üzerine uygulanmış ve 24 saat maruziyet sonrasında, 50 µg / ml dozda insan HT-29 kolon kanseri hücrelerinde % 60 oranında hücre inhibisyonu ile sonuçlanmıştır (86).

Bunların dışında liteartürde *Aronia melanocarpa*'nın etkin maruziyet süreleri ile ilgili çalışmalarda bulunmaktadır. Hwang ve Thi, *Aronia melanocarpa* suyunun subtoksik dozunun tekrarlayan maruziyetine (4 günlük bir periyot için günde 2 saat), subkonfluent Caco-2 hücrelerinin (bir insan kolon karsinomu modeli) yanıtını araştırmış, bu sürelerde uygulamanın G2 / M hücre döngüsü tutulmasına neden olarak Caco-2 hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Başka bir çalışmada SK-Hep1 insan hepatoma karsinom hücrelerinde 24 ve 48 saatte 200 µg/ml ve 400 µg/ml 'de *Aronia* uygulaması sonucu kanser hücrelerinde sırasıyla %24,6 ve %47,2 oranında inhibisyon gerçekleştiği gösterilmiştir (66).

Yukarıda belirtildiği gibi *Aronia Melonocarpa* farklı kanser türlerinde değişik doz ve maruziyet sürelerinde kanser hücrelerinin inhibisyonunda etkili olmuştur. Bu çalışmada ise, literatürde ilk defa ovaryum kanseri için *Aronia melanocarpa*'nın etkin doz ve maruziyet süresi araştırılmıştır. Bu bağlamda, literatürdeki çeşitli çalışmalarda kullanılan *Aronia melanocarpa* konsantrasyonları göz önüne alınarak bu çalışmada 11 farklı doz (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 ve 400 µg/ml) incelenmiştir. Bunun yanında benzer şekilde 3 farklı maruziyet süresinin (24, 48 ve 72 saat) etkisi incelenmiştir. Belirtilen doz ve maruziyet sürelerinin oluşturduğu tüm durumlar için MTT testi uygulanmış ve sitotoksik IC50 değeri 24 saat için 75 µg/ml, 48 ve 72 saat için 50 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Kanser hastaları paklitaksele karşı uzun vadede ilaç direnci geliştirir. Bu nedenle bu çalışmada ilaç direncini azaltmaya yönelik *Aronia melanocarpa* ile literatürde daha önce belirtilen dozda paklitaksel kombinasyonu kullanılmıştır. Bu çalışmayı gerçekleştirebilmek amacıyla en uygun paklitaksel konsantrasyonu literatürdeki çalışmalarda incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada paklitaksel ile flavanoid içeriğe sahip silibinin'in oluşturduğu kombinasyonun SKOV-3 hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve paklitakselin tek başına kullanıldığı farklı dozların

MTT sonucunda, en uygun konsantrasyonun 48 saat inkübasyon sonucunda IC50 değeri 0,02 µM olarak elde edilmiştir (65).

Fakat laboratuvar koşullarımızda literatürde belirtilen paklitaksel dozunun etkili olup olmadığını kanıtlamak amacıyla 0,002 µM ,0,02 µM ve 0,2 µM olarak 3 farklı doz denemesi uygulanmıştır. MTT test sonucunda 0,02 µM paklitaksel dozunun literatürdeki gibi etkin olduğu bulunmuştur. Daha sonra *Aronia melanocarpa*'nın 48 ve 72 saatte elde edilen etkin dozu ile kombinasyonunu immünohistokimyasal ve TUNEL yöntemleri ile SKOV-3 hücreleri üzerine inhibisyonu ortaya koyulmuştur.

Yapılan kolorektal kanseri çalışmalarında, kolorektal kanseri temsil eden modellerden alınan in vitro kanıtlar, *Aronia* polifenollerin proliferasyon ve apoptoz gibi kanser hücresi sağkalımı için gerekli hücresel süreçleri modüle edebileceğini göstermektedir (83).

Bir çalışmada *Ganoderma resinaceum* antioksidan içeriği sebebiyle SKOV-3 hücrelerine uygulanmış ve hücrelerin apoptoza yönlendirildiği kanıtlanmıştır (87).

Kang ve ark'nın yaptığı çalışmada ise flavonoid içeriği yüksek olan *Rhus verniciflua stokes* ekstraktı kullanılarak ovaryum kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (88). *Aronia melanocarpa* suyu, lenfoblastik lösemi Jurkat hücre hattına uygulanmış ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durumun, G2 / M fazında hücre döngüsünü arreste uğratarak apoptozisin indüksiyonuna neden olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca *Aronia melanocarpa* suyu tedavisi, farklı insan lenfoblastik lösemi hücrelerinin (HSB-2, Molt-4 ve CCRF-CEM) apoptozisini de indüklediği gösterilmiştir (89). Zerdeçal ve *chokeberry* ekstraktlarının, glioblastoma hücre hattında (U373) apoptozisi indükleme özellikleri ile dikkat çekmiştir (90).

Bu çalışmada *Aronia melanocarpa* ekstraktının SKOV-3 hücreleri üzerine apoptotik etkisi TUNEL yöntemi ile ortaya koyulmuştur. TUNEL yöntemi DNA kırıkları sonucu oluşan apoptozun belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir (91). Hücre siklusundaki duraksamalar sonucunda DNA kırıkları oluşur. Bu sayede hücrenin apoptoza yönlendirildiği belirlenmiş olur. Çalışmamızda *Aronia melanocarpa*'nın 5 farklı (10, 25, 50, 75, 100 µg/ml) dozunda istatistiksel olarak anlamlı TUNEL pozitif hücreler görülmüştür. Fakat *Aronia*'nın 50 µg/ml dozu

paklitaksel'in 0,02 µM/ml kombinasyonu sonucu TUNEL pozitiflik değeri belirgin şekilde arttığı ortaya koyulmuştur.

PI3K / mTOR ve MAPK sinyal yolları fosforilasyon dinamikleri araştırılmış ve onkolojide önemli sinyal yollarından olduğu belirlenmiştir (92). PI3K yolu, onkojenleri ve birçok reseptör sınıfını, birçok temel hücresel fonksiyonlara bağlayan kritik bir sinyal transdüksiyon sistemi, insan kanser hücrelerinde belki de en yaygın aktive edilen sinyal yolağıdır. AKT ve mTOR dahil olmak üzere, sinyal yolundaki PI3K izoformlarını ve diğer ana düğümleri hedefleyen inhibitörler klinik çalışmalarda kullanılmakla birlikte, hala önemli sorunlar devam etmektedir (93). Son yirmi yılda yapılan kapsamlı araştırmalar, protein sentezinden otofajiye kadar pek çok temel hücre sürecini düzenleyen mTOR için merkezi bir rol oynamıştır ve downregüle edilmiş mTOR sinyali kanser ve diyabetin yanı sıra yaşlanma sürecinin ilerlemesinde de rol oynamaktadır. Ayrıca klinikte mTOR sinyal yolunu, terapötik olarak hedefleyerek insan hastalığına nasıl katkıda bulunduğunu gösteren mekanizmalar için, mevcut ve gelecekteki beklentiler yüksektir (53). MAPK / ERK sinyal yolunun da hücre proliferasyonu, farklılaşması, migrasyonu, yaşlanması ve apoptozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (59). Bu çalışmada kanser sinyal mekanizmalarında bu derece önemli olan PI3K, mTOR ve p 38 MAPK sinyal yollarının *Aronia melanocarpa* ve paklitaksel'in bu yolları kullanarak SKOV-3 ovaryum kanseri üzerindeki etkilerinin açıklanması amaçlanmıştır.

Jiang ve ark.'nın yaptıkları çalışmada *Sepiella Maindron* (SIP-SII)'nin SKOV-3 hücre membranı üzerine yerleştiğini ve EGFR ekspresyonunu ve aktivasyonunu inhibisyonu yolu ile, p38 / MAPK ve PI3K / Akt / mTOR sinyal yollarını önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (31). Bir diğer çalışmada *Kaempferia parviflora* (KP)'nin SKOV-3 hücrelerinde hücre proliferasyonu, migrasyonu ve hücre ölümü üzerindeki etkileri araştırılmış ve ERK ve AKT fosforilasyonu ve kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-9 düzeyi araştırılarak AKT'in fosforilasyonu ve ERK1 / 2'nin azalması nedeniyle KP'nin antitümör aktiviteleri PI3K / AKT ve MAPK yolları ile düzenlenebileceği kanıtlanmıştır (34). Sunayama ve ark.'nın çalışmasında, mTOR sinyal yolu ile glioblastoma kök hücre benzeri hücrelerin, proliferasyonu ve tümörjenitesini koruduğu gösterilmiştir. mTOR inhibisyonunun, gastrointestinal kanser hücrelerinde CD133 ekspresyonunu anlamlı

şekilde arttırarak kanser hücre inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Chang ve ark. yaptığı çalışmada, prostat kanserinde, PI3K / Akt / mTOR sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) artmış ve kanser kök hücre fenotipleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (13).

Bu çalışmada ise, SKOV-3 hücreleri üzerine uygulanan *Aronia melanocarpa*'nın tek başına ve paklitaksel ile kombinasyonlarının PI3K, mTOR ve p 38 MAPK sinyal yollarının inhibisyonu kanıtlanmıştır. Kontrol gruplarında yüksek yoğunlukta pozitiflik değerleri gözlenirken diğer tüm dozlarda anlamlı ölçüde pozitifliğin düştüğü görülmüştür.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Sitotoksitite analizleri yapılarak en etkili *Aronia melanocarpa* dozu belirlendi. *Aronia melanocarpa* baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değerinin 50 µg/ml olduğu tespit edildi.
2. SKOV-3 ovaryum kanseri hücre hattına uygulanan, antioksidan bir madde olan *Aronia Melanocarpa*'nın kontrol grubuna göre inhibitör etkileri ve apoptotik etkileri belirlendi.
3. Bu etkilerini PI3K/mTOR ve p 38 MAPK sinyal yolları üzerinden gerçekleştirdiği ortaya koyuldu. Antikemoterapotik ajan olan paklitakselle kombine edildiğinde en etkili dozun 50 µg/ml *Aronia* ve 0,02 µM paklitaksel olduğu belirlendi.
4. Çalışmadan elde edilen bulguların değerlendirilmesi, kanser tedavisinde yeni açılımların, yeni ilaçların ve tedavi ajanlarının geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir. Kanserli hastaların tedavi sürecinde yaşadığı olumsuzluklar ve ilaçların yarattığı güçlü yan etkiler düşünüldüğünde, antioksidan ve antikanserojen etkisi olan yeni fitoterapötiklerin araştırılması ve kullanılması önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz tüm veriler değerlendirildiğinde, *Aronia melanocarpa*'nın ovaryum kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapotik ilaçlarla kombinasyonunun tedavide yarar sağlayacağı kanısına varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Özlük AA, Oytun MG, Güneç D. Kanser İmmünoterapisi. *Istanbul Bilim Univ Florence Nightingale Transplant J.* 2017 Feb 8;2(1):21–3.
2. Shi C, Wang M. LINC01118 Modulates Paclitaxel Resistance Of Epithelial Ovarian Cancer By Regulating Mir-134/ABCC1. *Med Sci Monit.* 2018 Dec 6;24:8831–9.
3. Liu X-D, Liu Y, Gong T-T, Guo J-Y, Wang Y-N, Wang L, Et Al. Prognostic Influence Of The Time Interval Between Surgery And Chemotherapy İn Epithelial Ovarian Cancer. *J Cancer.* 2018;9(22):4172–8.
4. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian Cancer. *Lancet.* 2014 Oct 11;384(9951):1376–88.
5. Deng J, Wang L, Chen H, Hao J, Ni J, Chang L, Et Al. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition And Cancer Stem Cells For Chemoresistant Ovarian Cancer. *Oncotarget.* 2016 Aug 23;7(34):55771–88.
6. Kucukkaya B, Afrasyap L. Mitojenle Etkileşen Protein Kinazların Heterotrimerik G Proteinleri İle Düzenlenmesi. *Turkish J Biochem.* 2013;38(2):218–28.
7. Singel KL, Grzankowski KS, Khan ANMNH, Grimm MJ, D’Auria AC, Morrell K, Et Al. Mitochondrial DNA İn The Tumour Microenvironment Activates Neutrophils And İs Associated With Worse Outcomes İn Patients With Advanced Epithelial Ovarian Cancer. *Br J Cancer.* 2018 Dec 6;1.
8. Jaaback K, Johnson N, Lawrie TA. Intraperitoneal Chemotherapy For The İnitial Management Of Primary Epithelial Ovarian Cancer. In: Jaaback K, Editor. *Cochrane Database Of Systematic Reviews.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2011. P. CD005340.
9. Norouzi-Barough L, Sarookhani M, Salehi R, Sharifi M, Moghbelinejad S. CRISPR/Cas9, A New Approach To Successful Knockdown Of ABCB1/P-Glycoprotein And Reversal Of Chemosensitivity İn Human Epithelial Ovarian Cancer Cell Line. *Iran J Basic Med Sci.*
10. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway İn Cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Aug 1;8(8):627–44.
11. Weir NM, Selvendiran K, Kutala VK, Tong L, Vishwanath S, Rajaram M, Et Al. Curcumin İnduces G2/M Arrest And Apoptosis İn Cisplatin-Resistant Human Ovarian Cancer Cells By Modulating Akt And P38 MAPK. *Cancer Biol Ther.* 2007 Feb;6(2):178–84.
12. Xie Y, Peng Z, Shi M, Ji M, Guo H, Shi H. Metformin Combined With P38 MAPK İnhibitor İmproves Cisplatin Sensitivity İn Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer. *Mol Med Rep.* 2014 Nov 1;10(5):2346–50.

13. Xia P, Xu X-Y. PI3K/Akt/Mtor Signaling Pathway In Cancer Stem Cells: From Basic Research To Clinical Application. *Am J Cancer Res.* 2015;5(5):1602–9.
14. Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, Et Al. Fruits Of Black Chokeberry Aronia Melanocarpa In The Prevention Of Chronic Diseases. *Molecules.*
15. Bermudez-Soto M, Larrosa M, Garcia-cantalejo J, Espin J, Tomas-barberan F, Garcia-conesa M. Up-Regulation Of Tumor Suppressor Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 In Human Colon Cancer Caco-2 Cells Following Repetitive Exposure To Dietary Levels Of A Polyphenol-Rich Chokeberry Juice. *J Nutr Biochem.* 2007 Apr;18(4):259–71.
16. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology.* Lippincott Williams & Wilkins; 2004. 534 P.
17. Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology.* 6th Ed. Philadelphia; 2002.
18. Yıldırım M. *Resimli Sistemik Anatomi.* 2nd Ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2013. 1000 P.
19. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text And Atlas: With Correlated Cell And Molecular Biology.* 6th Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2011. 974 P.
20. Seçkin İ, Koyutürk M, Güzel Meydanlı E. *Genitoüriner Sistem Histoloji Ve Embriyoloji Ders Kitabı.* Seçkin İ, Koyutürk M, Editors. İstanbul: Kültür Sanat Basımevi; 2016. 217 P.
21. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology And Cell Biology: An Introduction To Pathology.* 4th Ed. Philadelphia; 2016.
22. John E. Guyton And Hall, *Textbook Of Medical Physiology.*
23. Gedikli S. Melatoninin Mcf-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun Ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr), MTT Hücre Canlılık Testi ve İmmünohistokimya Yöntemleriyle Araştırılması. Atattürk Üniversitesi; 2013.
24. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. *Concepts Of Genetics.* 8th Ed. Pearson/Prentice Hall; 2006.
25. Kaplan F. Salinomisin'in İnsan Over Kanseri Hücre Serisi (Ovcar-3) Üzerine Olan Apoptotik Ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. Ankara Üniversitesi; 2014.
26. Çakır Gündoğdu A. Niklozamid Uygulamasının Epitelyal Ovaryum Kanseri Hücre Hattı Ovcar-3 Üzerine Etkileri. Gazi Üniversitesi; 2015.
27. Baykara O. *Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar.* İstanbul Üniversitesi; 2016.
28. Erdem Sibel S., Parlar Rabia Edibe, Obeidin Vildan Akgül, Şahin Ubeydullah. Skov-3 Over Kanseri Hücre Hattında Fotodinamik Terapi Uygulaması. *Haydarpaşa Numune Med J.* 2017; 57(3):119–24.
29. Zhang W, Yu F, Wang Y, Zhang Y, Meng L, Chi Y. Rab23 Promotes The Cisplatin Resistance Of Ovarian Cancer Via The Shh-Gli-ABCG2 Signaling Pathway. *Oncol Lett.* 2018 Apr;15(4):5155–60.
30. Dursun Polat. İleri Evre Over Kanserinde Tedavi _Yumurtalık Kanserinde Tedavi.
31. Jiang W, Cheng Y, Zhao N, Li L, Shi Y, Zong A, Et Al. Sulfated Polysaccharide Of Sepiella Maindroni İnk Inhibits The Migration, Invasion And Matrix Metalloproteinase-2 Expression Through Suppressing EGFR-Mediated

- P38/MAPK And PI3K/Akt/Mtor Signaling Pathways İn SKOV-3 Cells. *Int J Biol Macromol.* 2018 Feb;107(Pt A):349–62.
32. Kolaç T, Gürbüz P, Yetiş İletişim G, Kolaç İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO T, Yetiş G. Doğal Ürünlerin Fenolik İçeriği Ve Antioksidan Özellikleri Phenolic Content And Antioxidant Characteristics Of Natural Products. Vol. 5, Cilt. 2017.
33. Song Q, Jiang S, Zhang X, Pan C, Lu C, Peng J, Et Al. Radiosensitivity Of Human Ovarian Cancer Cells İs Enhanced By Pseudolaric Acid B Due To The İnhibition Of The Ras/Raf/ERK Signaling Pathway. *Exp Ther Med.* 2017;15(1):685–90.
34. Paramee S, Sookkhee S, Sakonwasun C, Na Takuathung M, Mungkornasawakul P, Nimlamool W, Et Al. Anti-Cancer Effects Of Kaempferia Parviflora On Ovarian Cancer SKOV3 Cells. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):178.
35. Pashaei-Asl R, Pashaei-Asl F, Mostafa Gharabaghi P, Khodadadi K, Ebrahimi M, Ebrahimi E, Et Al. The İnhibitory Effect Of Ginger Extract On Ovarian Cancer Cell Line; Application Of Systems Biology. *Adv Pharm Bull.;*7(2):241–9.
36. Attar R, Cincin ZB, Bireller ES, Cakmakoglu B. Apoptotic And Genomic Effects Of Corilagin On SKOV3 Ovarian Cancer Cell Line. *Onco Targets Ther.* 2017 Mar;Volume 10:1941–6.
37. Haftacı Mesci S, Yıldız E. Erken Evre Epitelyal Over Kanserinde Fertilitte Koruyucu Cerrahi. Düzce; 2014.
38. Ayrım A. Ovaryum Kanserinde Hücre İçi Kalsiyum Değişimlerinin Ultrayapısal Olarak İncelenmesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü;* 2016.
39. Mastanabad MV. Kaspaz Promotör Bölge Polimorfizmleri Ve Ovaryum Kanseri Arasındaki İlişki / Mehtap Vafai Mastanabad ; Dnş. Melek Öztürk. 43927. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2009
40. AKŞİT H, BİLDİK A. Apoptozis. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet Fakültesi Derg. 2008 Mar 1;19(1):55–63.
41. Gülfidan Coşkun, Özgür H. Apoptoz Ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Vol. 20, ARŞİV. 2011.
42. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, Autophagy, Necroptosis, And Cancer Metastasis. *Mol Cancer.* 2015 Feb 21;14(1):48.
43. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Yüzüncü Yıl Vet Fakültesi Derg. 2008;(2):73–8.
44. Yılmaz İ. Erişkin Ratlarda Deneysel Varikozel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi; Ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi Ve Süresinin Tunel Yöntemi İle Değerlendirilmesi. *Taksim Eğitim Ve Araştırma Hastanesi;* 2005.
45. Li J-P, Yang Y-X, Liu Q-L, Pan S-T, He Z-X, Zhang X, Et Al. The İvestigational Aurora Kinase A İnhibitor Alisertib (MLN8237) İnduces Cell Cycle G2/M Arrest, Apoptosis, And Autophagy Via P38 MAPK And Akt/Mtor Signaling Pathways İn Human Breast Cancer Cells. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:1627–52.
46. Küçüköner M, Işıkdoğan A. Kanser Tedavisinde Mtor Sinyal Yolağı Ve Mtor İnhibitörleri. *Dicle Med J.* 2013;40(1):156–60.

47. Yan H, Xin S, Wang H, Ma J, Zhang H, Wei H. Baicalein Inhibits MMP-2 Expression In Human Ovarian Cancer Cells By Suppressing The P38 MAPK-Dependent NF-Kb Signaling Pathway. *Anticancer Drugs*. 2015 Mar;1.
48. Gasparri M, Bardhi E, Ruscito I, Papadia A, Farooqi A, Marchetti C, Et Al. PI3K/AKT/Mtor Pathway In Ovarian Cancer Treatment: Are We On The Right Track? *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2017 Oct 26;77(10):1095–103.
49. Zhang F, Chen H, Du J, Wang B, Yang L. Anticancer Activity Of Metformin, An Antidiabetic Drug, Against Ovarian Cancer Cells Involves Inhibition Of Cysteine-Rich 61 (Cyr61)/Akt/Mammalian Target Of Rapamycin (Mtor) Signaling Pathway. *Med Sci Monit*. 2018 Sep 1;24:6093–101.
50. Yang N, Qu Y-J, Cheng Y, Liang T, Zhang M-N, Zhang D, Et Al. Endoplasmic Reticulum Stress Regulates Proliferation, Migration And Invasion Of Human Ovarian Cancer SKOV3 Cells Through PI3K/AKT/Mtor Signaling Pathway. *Cancer Biomarkers*. 2017 Jul 4;19(3):263–9.
51. Zhou Y-Y, Li Y, Jiang W-Q, Zhou L-F. MAPK/JNK Signalling: A Potential Autophagy Regulation Pathway. *Biosci Rep*. 2015 Apr 22;35(3).
52. Lin B-W, Gong C-C, Song H-F, Cui Y-Y. Effects Of Anthocyanins On The Prevention And Treatment Of Cancer. *Br J Pharmacol*. 2017 Jun;174(11):1226–43.
53. Saxton RA, Sabatini DM. Mtor Signaling In Growth, Metabolism, And Disease. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):960–76.
54. Qin L, Bromberg-White JL, Qian C-N. Opportunities And Challenges In Tumor Angiogenesis Research. In: *Advances In Cancer Research*. 2012. P. 191–239.
55. Pazarbaşı A, Kasap M, Kasap H. Kanser Yolakları. Vol. 20, ARŞİV. 2011.
56. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing Roles For The Mtor Pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Dec;17(6):596–603.
57. Follo MY, Manzoli L, Poli A, Mccubrey JA. PLC And PI3K/Akt/Mtor Signalling In Disease And Cancer. *Adv Biol Regul*. 2015 Jan 1;57:10–6.
58. Doğan L-A, Güç D. Sinyal İletimi Mekanizmalar. *Ve Kanser - Hacettepe Tıp Derg*. 2004;35–34:42.
59. Sun Y, Liu W-Z, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou H-F. Signaling Pathway Of MAPK/ERK In Cell Proliferation, Differentiation, Migration, Senescence And Apoptosis. *J Recept Signal Transduct*. 2015 Nov 2;35(6):600–4.
60. Xu L, Zhang X, Li Y, Lu S, Lu S, Li J, Et Al. Neferine Induces Autophagy Of Human Ovarian Cancer Cells Via P38 MAPK/ JNK Activation. *Tumor Biol*. 2016 Jul 7;37(7):8721–9.
61. Erdemoğlu N, Şener B. Taksan Sınıfı Bileşiklerin Antitümör Etkileri. 2000.
62. Işık Gamze. Meme Kanseri Tedavisinde Paklitaksel Yüklü Polikasyonik Ve Anyonik Siklodekstrin Nanoküre Formülasyonu Ve In Vitro Değerlendirilmesi. *Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji Ve Nanotıp Anabilim Dalı*; 2013.
63. Benekli Mustafa. *Kemoterapi Prensipleri*. 2016.
64. Lim W, Song G. Inhibitory Effects Of Delphinidin On The Proliferation Of Ovarian Cancer Cells Via PI3K/AKT And ERK 1/2 MAPK Signal Transduction. *Oncol Lett*. 2017 Jul;14(1):810–8.
65. Pashaei-Asl F, Pashaei-Asl R, Khodadadi K, Akbarzadeh A, Ebrahimie E, Pashaiasl M. Enhancement Of Anticancer Activity By Silibinin And Paclitaxel Combination On The Ovarian Cancer. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol*. 2018 Oct 3;46(7):1483–7.

66. Hwang E-S, Thi D. Effects Of Black Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Extracts On Adhesion, Invasion And Migration In SK-Hep1 Human Hepatoma Cancer Cells. *FASEB J Nutr*. 2015 Apr;
67. Gao N, Wang Y, Jiao X, Chou S, Li E, Li B. Preparative Purification Of Polyphenols From *Aronia Melanocarpa* (Chokeberry) With Cellular Antioxidant And Antiproliferative Activity. *Molecules*. 2018 Jan 10;23(1):139.
68. Kapcı B, Neradova E, Cizkova H, Voldrich M, Rajchl A, Capanoglu E. Investigating The Antioxidant Potential Of Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Products. *J Food Nutr Res* . 2013;52(4):219–29.
69. <http://www.Milliyet.Com.Tr/Kanser-Savascisi-Bitki-Artik-Turkiye-Yalova-Yerelhaber-2289146/>
70. Case AJ, Agraz D, Ahmad IM, Zimmerman MC. Low-Dose *Aronia Melanocarpa* Concentrate Attenuates Paraquat-Induced Neurotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 Dec 6;2016:1–11.
71. Kedzierska M, Olas B, Wachowicz B, Glowacki R, Bald E, Czernek U, Et Al. Effects Of The Commercial Extract Of *Aronia* On Oxidative Stress In Blood Platelets Isolated From Breast Cancer Patients After The Surgery And Various Phases Of The Chemotherapy. *Fitoterapia*. 2012 Mar;83(2):310–7.
72. Kozuka M, Yamane T, Nakano Y, Nakagaki T, Ohkubo I, Ariga H. Identification And Characterization Of A Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor From *Aronia* Juice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Sep 25;465(3):433–6.
73. Keleş Y. Antosiyenin Pigmentlerin Biyokimyası Ve Analizi. *Türk Bilim Derlemeler Derg*. 2015 Feb 1;(1):19–25.
74. Kędzierska M, Głowacki R, Czernek U, Szydłowska-Pazera K, Potemski P, Piekarski J, Et Al. Changes In Plasma Thiol Levels Induced By Different Phases Of Treatment In Breast Cancer; The Role Of Commercial Extract From Black Chokeberry. *Mol Cell Biochem*. 2013 Jan 5;372(1–2):47–55.
75. Li X, Liu H, Lv L, Yan H, Yuan Y. Antioxidant Activity Of Blueberry Anthocyanin Extracts And Their Protective Effects Against Acrylamide-Induced Toxicity In Hepg2 Cells. *Int J Food Sci Technol*. 2018 Jan 1;53(1):147–55.
76. Leonel C, Ferreira LC, Borin TF, Moschetta MG, Freitas GS, Haddad MR, Et Al. Inhibition Of Epithelial-Mesenchymal Transition In Response To Treatment With Metformin And Y27632 In Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017 Jul 28;17(8).
77. Muss HB, Case LD, Richards F, White DR, Cooper MR, Cruz JM, Et Al. Interrupted Versus Continuous Chemotherapy In Patients With Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 1991 Nov 7;325(19):1342–8.
78. Andre F, Slimane K, Bachelot T, Dunant A, Namer M, Barrelier A, Et Al. Breast Cancer With Synchronous Metastases: Trends In Survival During A 14-Year Period. *J Clin Oncol*. 2004 Aug 15;22(16):3302–8.
79. Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Et Al. Molecular Targeting Therapy Of Cancer: Drug Resistance, Apoptosis And Survival Signal. *Cancer Sci*. 2003 Jan;94(1):15–21.
80. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction Of Apoptosis By Cancer Chemotherapy. *Exp Cell Res*. 2000 Apr 10;256(1):42–9.
81. Türk G. Kemoterapötiklerin Erkek Üreme Sistemi Üzerindeki Yan Etkileri Ve Koruyucu Stratejiler. *DERLEME Marmara Pharm J*. 2013;17:73–92.

82. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant Systems And Oxidative Stress in the Testes. *Oxid Med Cell Longev*. 2008;1(1):15–24.
83. Brown EM, Gill CIR, Mcdougall GJ, Stewart D. Mechanisms Underlying The Anti-Proliferative Effects Of Berry Components In In Vitro Models Of Colon Cancer. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Jan;13(1):200–9.
84. Rugină D, Sconța Z, Leopold L, Pinteș A, Bunea A, Socaciu C. Antioxidant Activities Of Chokeberry Extracts And The Cytotoxic Action Of Their Anthocyanin Fraction On Hela Human Cervical Tumor Cells. *J Med Food*. 2012 Aug;15(8):700–6.
85. Thani NAA, Keshavarz S, Lwaleed BA, Cooper AJ, Rooprai HK. Cytotoxicity Of Gemcitabine Enhanced By Polyphenolics From Aronia Melanocarpa In Pancreatic Cancer Cell Line Asp-1. *J Clin Pathol*. 2014 Nov;67(11):949–54.
86. Malik M, Zhao C, Schoene N, Guisti MM, Moyer MP, Magnuson BA. Anthocyanin-Rich Extract From Aronia Meloncarpa E. Induces A Cell Cycle Block In Colon Cancer But Not Normal Colonic Cells. *Nutr Cancer*. 2003 Jul;46(2):186–96.
87. Sedky NK, El Gammal ZH, Wahba AE, Mosad E, Waly ZY, El-Fallal AA, Et Al. The Molecular Basis Of Cytotoxicity Of A-Spinasterol From Ganoderma Resinaceum: Induction Of Apoptosis And Overexpression Of P53 In Breast And Ovarian Cancer Cell Lines. *J Cell Biochem*. 2018 May;119(5):3892–902.
88. Kang S-H, Hwang I-H, Son E, Cho C-K, Choi J-S, Park S-J, Et Al. Allergen-Removed Rhus Verniciflua Extract Induces Ovarian Cancer Cell Death Via JNK Activation. *Am J Chin Med*. 2016 Jan;44(08):1719–35.
89. Sharif T, Alhosin M, Auger C, Minker C, Kim J-H, Etienne-Selloum N, Et Al. Aronia Melanocarpa Juice Induces A Redox-Sensitive P73-Related Caspase 3-Dependent Apoptosis In Human Leukemia Cells. Srivastava RK, Editor. *Plos One*. 2012 Mar 8;7(3):E32526.
90. Thani Naa, Sallis B, Nuttall R, Schubert Fr, Ahsan M, Davies D, Et Al. Induction Of Apoptosis And Reduction Of Mmp Gene Expression in the U373 Cell Line By Polyphenolics In Aronia Melanocarpa And By Curcumin. *Oncol Rep* . 2012 Oct;28(4):1435–42.
91. Dinçel GÇ, Kul O. Patolojik Apoptozis Ve Tanı Yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilim Derg*. 2016 Jan 1;5(1):86–108.
92. De Graaf EL, Kaplon J, Mohammed S, Vereijken LAM, Duarte DP, Redondo Gallego L, Et Al. Signal Transduction Reaction Monitoring Deciphers Site-Specific PI3K-Mtor/MAPK Pathway Dynamics In Oncogene-Induced Senescence. *J Proteome Res*. 2015 Jul 2;14(7):2906–14.
93. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway In Cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Aug 1;8(8):627–44.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adres : Adalet Mahallesi 1593/14 sokak. Barış Sitesi A blok Bayraklı/İZMİR
Cep : 0 (505) 996 04 61
Mail : sinem_cobanoglu@hotmail.com



Kişisel Bilgiler

Toplam Tecrübe : 4 yıl
Medeni Durum : Evli
Uyruk : T.C.
Doğum Tarihi : 10.02.1989
Doğum Yeri : Antalya
Sürücü Belgesi : B sınıfı
Bilgisayar Bilgileri : Microsoft ofis uygulamaları (Word, Excel ve Powerpoint iyi seviyede,), Probel hasta kayıt sistemi.

Eğitim Bilgileri

Eğitim Durumu : Yüksek Lisans(devam etmekte)
Üniversite/Bölüm : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2008-2013)
Not Ortalaması : 2.47
Lise : Manavgat Anadolu Lisesi (2003-2007)
Yabancı Dil : İngilizce-yokdil 66 puan.
Yüksek Lisans : İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı (Eylül 2014-Ocak 2015)
Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (Eylül 2015- Ağustos 2016)
Y.L. Not Ortalaması: 3.94
Yüksek Lisans : İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (Eylül 2016- devam etmekte)
Y.L. Not Ortalaması: 3.49

İş Tecrübesi

Diş Hekimi Asistanlığı

Dr. Halile Kemikçioğlu Özel Diş Kliniği (06.2007-09.2007) – Doktor Asistanlığı

- ✓ Tedavi sırasında kullanılan aletler öğrenildi.
- ✓ Ağız ve çene cerrahisinde yapılan ameliyatlarda doktor, asiste edildi.

Ege üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı (07.2012-01.2013) stajyer

- ✓ Parazitoloji laboratuvarında hasta numunelerinin parazit analizi mikroskopta tanımlandı.
- ✓ Seroloji laboratuvarında Eliza Testi, İmmün Florasan Antikor Testi (İFAT), Western blood testi hastaların kan serumlarına uygulanarak sonuçlar başarı ile elde edildi.
- ✓ Ayrıca staj süresince hastanenin kan alma merkezinde hastalar üzerinde kan alma uygulaması yapıldı.

Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi Doku Tiplendirme Laboratuvarı (2014-2015) Yüksek Lisans Öğrencisi

- ✓ Organ Naklinde doku uyum testleri yapıldı.

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı 3 ay staj deneyimi. (2014)

Celal Bayar Hafsa Sultan Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Stajyer Embriyolog (2015 -2016)

- ✓ Androloji Laboratuvarı'nda spermiyogram testi öğrenildi.
- ✓ IUI işlemi başarı ile gerçekleştirildi.

**Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans 1 yıl**

- ✓ İmmünohistokimya testi, Tunel testi, Histolojik Boyama Teknikleri öğrenilip, uygulandı.
- ✓ Hücre kültürü laboratuvarında OPU yapıldı.
- ✓ Proje kapsamında hayvan deneylerinden mezenkimal kök hücre eldesi yapıp, hücreler çoğaltı.

Medikal Park Hastahanesi İzmir (07-08/2018)

- ✓ Tüp bebek laboratuvarında IVF eğitimini başarı ile tamamladı.(07-08/2018)

Sertifika Bilgileri

Kanser Biyolojisi ve Genetiği Sempozyumu, EBİLTET – 03.2013 (Genetiğin kanser oluşumuna etkisi, vücut hücrelerinin kanserleşme süreci, kanserli hücrelerin tedavisi)

Geleneksel 3. Kök Hücre Sempozyumu, EBİLTET – 04.2011 (Mezenkimal kök hücrenin elde edilmesi, doku mühendisliğinde ve klinikte kök hücre uygulamaları)

Celal Bayar Üniversitesi Gamet Biyolojisi Makale Kulübü 14. Toplantısı (GABİMAK 45) 21.11.15 Katılım Belgesi

Türkçe Bilim Dili Çalıştayı (CBÜ) 20.11.15

4.Genetik ve Biyomühendislik Günleri- Yeditepe Üniversitesi

I. Yaşam Bilimleri Sempozyumu- AGÜ

Kanser ve Genetik Kursu – EÜTF

I.Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi- CBÜ

Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanımı Sertifikası 07.12.2016

Ege Üniversitesi EGESEM Tübitak 1001, 1002 ve 3001 Projesi Hazırlama Teknikleri 23.08.17

KÖGEM Kök Hücrede Uygulamalı Flow sitometri Eğitimi 2-6.10.17

KÖGEM XXIII.Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu 06.10.17

Projeler

Lisans Eğitimi Bitirme Tezi

Kök Hücre ve Kök Hücrenin Kullanıldığı Hastalıklar

Bitirme Tezi Danışmanı: Prof. Dr. Gürsel ERGEN (Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı Başkanı)

TÜBİTAK 3001 BAŞLANGIÇ AR-GE PROJELERİ DESTEKLEME PROGRAMI

Proje Başlığı: “Deneysel Olarak Polikistik Over Sendromu Oluşturulmuş Sıçanlarda Alternatif Tedavi Yöntemlerinin Ovaryum Dokusu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı projeye 17.10.17 tarihinde başvurulmuştur. Revize edilip tekrar gönderilecektir.

Projedeki görev: Bursiyer

Projedeki katkı: Literatür özeti, yöntem ve özgün değere katkıda bulunularak hak sahipliği beyan formu’nda belirtilmiştir.

Proje Başlığı: “Sıçanlarda doksorubisin kaynaklı over hasarında resveratrol ve darbeli elektromanyetik alan uygulaması (PEMF) etkisinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi” adlı projenin etik onayı Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi’nden alınmıştır. Tubitak 3001 projesindeki değişikliğin sonucu beklenmektedir. Ardından en kısa süre içerisinde Tübitak projesi olarak gönderilecektir.

Projedeki görev: Bursiyer

Projedeki katkı: Literatür özeti, yöntem ve özgün değere katkıda bulunularak hak sahipliği beyan formu’nda belirtilmiştir.

BAP-ÖNAP PROJELERİ

Proje Başlığı: “Polikistik Over Sendromu Oluşturulmuş Sıçanlarda D Vitamini İle Kombine Edilen *Aronia Melanocarpa*’nın Ovaryum Dokusu Üzerine Etkilerinin Ultrastrüktürel ve Histopatolojik İncelenmesi ” adlı proje 01.03.2018 tarihinde kabul edilmiştir.

Proje No: 2018-ÖNAP-TIPF-0003

Projedeki görev: Proje Çalışanı

Projedeki katkı: Deney hayvanlarında model oluşturma, İmmünohistokimyasal, TUNEL ve western Blot testlerini gerçekleştirme aşamalarına katkıda bulunulacaktır.

Proje Başlığı: “**Deksmedetomidin, Fentanil ve Klonidinin Antinosiseptif Etkisinin Sıçanlar Üzerinde Araştırılması**” adlı proje 01.03.2018 tarihinde kabul edilmiştir.

Projedeki görev: Proje Çalışanı

Projedeki katkı: Deney hayvanlarında model oluşturma, immünohistokimyasal, TUNEL ve Western Blot testlerini gerçekleştirme aşamalarına katkıda bulunulacaktır.

BAP-YÜKSEK LİSANS TEZ PROJELERİ

Proje Başlığı: “*Aronia Melanocarpa* Uygulamasının Epiteliyal Ovaryum Kanseri Hücre Hattı Skov-3 Üzerine İmmünohistokimyasal ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi ” adlı projeye 13.08.2018 tarihinde kabul edilmiştir.

Proje No: 2018-TYL-SABE-0065

Projedeki görev: Araştırmacı

Projedeki katkı: Hücre kültürü yöntemlerini uygulama ,MTT, immünohistokimyasal, TUNEL ve testlerini aşamalarını gerçekleştirilmiştir.

ULUSAL POSTER BİLDİRİLERİ

Histoloji ve Embriyoloji Kongresi- 2018 – Poster Başlığı” Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Okreotid’in JNK ve p38 MAPK Sinyal Yolağı Üzerinden Kalp ve Aort Üzerine Etkileri”

BİLİMSEL MAKALELER

Bahçeci, S., Kara, S., & Bahçeci, M. (2018). An interesting and very rare ectopic localization of the thyroid gland; lingual thyroid, a case report. *Journal of Clinical and Translational Endocrinology: Case Reports*, 9, 6-8.

Referanslar

Doç. Dr. Selen BAHÇECİ

İzmir Katip Çelebi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı Öğretim Üyesi-Yüksek Lisans Tez Danışmanı

Tel : 0236 233 19 20

Prof.Dr. Meltem KURUŞ

İzmir Katip Çelebi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı Başkanı

Tel : 0236 233 19 20

Dr.Öğr.Gör. Fatma ŞİMŞEK

İzmir Katip Çelebi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı Öğretim Üyesi

Tel : 0236 233 19 20

Prof.Dr.Kemal ÖZBİLGİN

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı Öğretim Üyesi

Tel : 0236 233 19 20

Doç.Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı Öğretim Üyesi

Tel : 0236 233 19 20

Prof.Dr.Nevin TURGAY

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi – Parazitoloji Anabilim Dalı Profesörü

Tel: 0232 390 31 36 e-mail: nevin.turgay@ege.edu.tr

Prof.Dr.Gürsel ERGEN

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü – Zooloji Anabilim Dalı Başkanı

Tel: 0232 311 24 16 e-mail: gursel.ergen@ege.edu.tr

Dr.Halile KEMİKÇİOĞLU

Diş Hekimi Tel: 0242 746 58 44 e-mail: kemikcioglu07@gmail.com