



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE SARIMSAK (*Allium sativum*) VE MANTAR (*Laetiporus sulphureus*) EKSTRAKTLARININ ETKİLERİ

Fevziye Emin AKMAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN

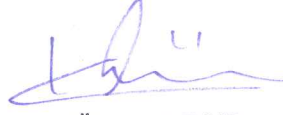
II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Engin ULUKAYA

Aralık, 2017

İSTANBUL

Bu çalışma, 27.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

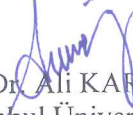
Tez Jürisi



Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ali KARAGÖZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU
Bezmialem Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Doç. Dr. Ayşe ÖZDEMİR
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 1493 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Heyecanlı, bir o kadar da zorlu ve çok sabır gerektiren kariyer yolculuğumun önemli adımlarından biri olan doktora çalışmalarımı tamamlamak üzereyim. Tez konusu seçiminde özgürce hayallerimin doğrultusunda karar vermeme destek olan, yol gösteren, deney sonuçlarıma küstüğümde motivasyonumu yüksek tutmayı bilen, sabrına, güler yüzüne ve hayata bakış açısına hayran olduğum danışman hocam Prof. Dr. Keriman Günaydın'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Öğrenimim ve çalışmalarım sırasında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümündeki bütün öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma ve Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Nazlı Arda'ya teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarının planlanması ve yürütülmesi süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşan, hücre kültürü çalışmalarımı gerçekleştirdiğim laboratuvarının kapılarını açan, ekibine dâhil eden ve her türlü imkânı sunan eş danışmanım olan Prof. Dr. Engin Ulukaya'ya ve ekibine sonsuz teşekkür ederim. Laboratuvarda geç saatlere kadar tecrübesiyle çalışmalarına destek veren, hoşgörülü, sabırlı ve güler yüzlü, beraber çalışmaktan keyif aldığım Pınar Alp'e tüm kalbimle teşekkür ediyorum.

Doktora izleme komitesinde yer alan Bezmi Âlem Vakıf Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya değerli katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi destek olan, benim başarılarımla gurur duyan sevgili ailem, canım ablam, annem ve babama; ekstraktların hazırlık aşamasında bana yardımcı olan geceleri geç saatlere kadar çalıştığım bana öpücükle destek ve güç veren canım kızıma; ev işi yükünü sessizce kaldıran ve her zaman yardımcı olan değerli eşime tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Aralık 2017

Fevziye Emin AKMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. KARSİNOGENEZİS	6
2.2. KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ	10
2.3. KANSEROGEN METABOLİZMASI.....	12
2.4. BESLENME VE KANSER	14
2.5. MEME KANSERİ	16
2.5.1. Meme kanserinde risk faktörleri.....	16
2.5.2. Meme kanser genetiği.....	16
2.5.2.1. <i>Onkogenler</i>	16
2.5.2.2. <i>Meme kanserinde etkili olan onkogenler</i>	18
2.5.2.3. <i>Tümör baskılayıcı genler</i>	20
2.5.3. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması.....	22
2.6. APOPTOZİS	23
2.6.1. Apoptozis ve Tarihçesi	23
2.6.2. Apoptozisin İndüklenmesi	24
2.6.3. Apoptozisin Mekanizmaları	26
2.6.3.1. <i>Ekstrinsik (Dışsal) Yolak</i>	26
2.6.3.2. <i>İntrinsik Yolak</i>	27
2.6.3.3. <i>Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması</i>	28
2.6.4. Apoptozisin Genetik Kontrolü	28
2.6.4.1. <i>Antiapoptotik Proteinler</i>	29
2.6.4.2. <i>Proapoptotik Proteinler</i>	29

2.6.5. Apoptozis ve Nekrozis Morfolojisi	30
2.6.6. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar	31
2.6.7. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar	32
2.6.8. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	33
2.6.8.1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri	33
2.6.8.2. İmmunohistokimyasal yöntemler	34
2.6.8.3. Biyokimyasal yöntemler	34
2.6.8.4. İmmunolojik yöntemler	34
2.6.8.5. Moleküler biyolojik yöntemler	34
2.7. KANSER VE DOĞAL ÜRÜNLER.....	34
2.8. SARIMSAK (<i>ALLIUM SATIVUM</i>)	36
2.8.1. Sistematik Sınıflandırılması	36
2.8.2. Taşköprü Sarımsağı	36
2.8.3. <i>Allium sativum</i> özellikleri.....	37
2.8.4. Sarımsağın Antikanserojen Aktivitesi.....	43
2.9. MANTARLAR	46
2.9.1. Kükürt mantarı (<i>Laetiporus sulphureus</i>)	47
2.10. KEMOTERAPİ İLAÇLARI	50
2.10.1. Paklitaksel.....	50
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	51
3.1. KİMYASAL MADDELER	51
3.2. SARF MALZEMELER	51
3.3. CİHAZLAR.....	52
3.4. YÖNTEM.....	52
3.4.1. <i>Allium sativum</i> 'un Toplanması ve Tanımlanması	52
3.4.2. <i>Laetiporus sulphureus</i> 'un Toplanması ve Tanımlanması	52
3.4.3. <i>Allium sativum</i> ve <i>Laetiporus sulphureus</i> 'un Ekstraksiyon İşlemleri.....	53
3.4.3.1. Maserasyon ekstarksiyonu.....	53
3.4.3.2. Soxhlet ekstraksiyonu.....	53
3.4.4. <i>Allium sativum</i> ve <i>Laetiporus sulphureus</i> 'un Ekstraktının Hazırlanması	53
3.4.5. Kemoterapötiklerin Hazırlanması	54
3.4.6. Hücre Kültürü	54
3.4.6.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması.....	55
3.4.6.2. Hücre Soylarının Pasajlanması.....	55

3.4.6.3. Hücre Soylarının Stoklanması	55
3.4.6.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	56
3.4.6.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı	56
3.4.7. Morfolojik Değerlendirme.....	56
3.4.8. SRB (Sulforhodamine B) Metodu	56
3.4.9. Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi.....	58
3.4.9.1. Hoechst 33342, Propidyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi.....	58
3.4.10. M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Metodu	60
3.4.11. Akım Sitometri Analizleri- Annexin/Kaspaz 3/7	61
3.4.11.1. Annexin V ve Dead Cell Boyama.....	61
3.4.11.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesi.....	63
3.4.12. Apoptotik Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi.....	65
3.4.12.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	65
3.4.12.2. Eş Zamanlı PZR.....	67
3.4.12.3. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu.....	67
3.4.12.4. İzole Edilen RNA'ların Kontrolü.....	68
3.4.12.5. cDNA Sentezinin Yapılması	68
3.4.12.6. Hücre Ölümü (Apoptozis, Nekroz, Otofaji) ile İlişkili Genlerin Real Time PCR ile Ekspresyon Analizleri.....	69
3.4.14. İstatistiksel Analiz	72
4. BULGULAR.....	73
4.1. SRB (SULFORHADAMİNE B) CANLILIK TESTİ BULGULARI.....	73
4.1.1. <i>Laetiporus sulphureus</i> ve <i>Allium sativum</i> Türlerinin Morfolojik Değerlendirme Sonuçları	75
4.2. PAKLİTAKSEL VE LSMM EKSTRAKTİNİN KOMBİNASYONU	79
4.3. FLORESAN MİKROSKOBU İLE YAPILAN DEĞERLENDİRMELER.....	80
4.3.1. Hoechst 33342, Propidyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları	80
4.4. M30 ANTİJEN (KASPAZLA KIRILMIŞ SİTOKERATİN 18) BULGULARI.....	82
4.5. ANNEXİN/KASPAZ 3/7 BULGULARI.....	83
4.6. APOPTOTİK GENLERİN EKSPRESYON PROFİLLERİ	85
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	87
KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1: Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide) [3].	2
Şekil 1.2: Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide) [3].	2
Şekil 2.1: Mutasyona uğramış tek bir hücreden gelişen tümör kitlesi (https://www.dreamstime.com/stock-illustration-developmental-phases-cancer-cells-growing-tumor-stages-carcinogenesis-image).	10
Şekil 2.2: Kanserın on temel özelliği [18].	12
Şekil 2.3: Bcl – 2 Ailesi (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bcl-2_Family.jpg).	25
Şekil 2.4: Kaspaz aktivasyon yolları (https://www.nature.com/articles/).	26
Şekil 2.5: İçsel ve dışsal yol mekanizmaları kaspaz-bağımlı apoptozisin indüklenmesi [43].	27
Şekil 2.6: Apoptotik uyarı sonucu apoptozom şekillenmesi (http://www3.uah.es/daviddiaz/Apoptosis/caspasas.htm	28
Şekil 2.7: Apoptozis ve nekrozisin şematik karşılaştırılması (http://bilimvebilimadami.com/programli-hucre-olumleri-birbirlerinden-farkli-olabilir).	31
Şekil 2.8: Sarımsakta bulunan aliin için önerilen biyosentetik yol [86].	41
Şekil 2.9: Aliin metabolizması [88].	42
Şekil 2.10: Sarımsakta yaygın olarak incelenen organosülfür bileşiklerinin kimyasal yapıları [88].	43
Şekil 2.11: Eburikoik asid	49
Şekil 2.12: Paklitakselin kimyasal yapısı	50
Şekil 3.1: Sitokeratin 18'in kaspazlar aracılığıyla kesimi ve bu bölgenin M30 antikoru ile tanınmasının şematik gösterimi [130].	60
Şekil 3.2: Fosfotidilserinin translokasyonu ve Annexin V'i bağlaması [133].	62
Şekil 3.3: Annexin V & Dead Cell Boyama Protokolü [134].	63

Şekil 3.4: Kaspaz 3/7 Testi Protokolü [134].	64
Şekil 3.5: Polimeraz Zincir Reaksiyonu Siklusunun Basamakları [139].	65
Şekil 4.1: Sarımsak ve mantar ekstraktlarının MCF- 7 insan meme kanseri hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkilerinin SRB canlılık testi ile alınan sonuçları.	73
Şekil 4.2: Sarımsak ve mantar ekstraktlarının MCF- 7 insan meme kanseri hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkilerinin SRB canlılık testi ile alınan sonuçları.	74
Şekil 4.3: 100 µg/ml konsantrasyonunda uygulanan farklı ekstratlarının 48 saat sonra MCF- 7 hücrelerinin faz – kontrast morfolojik görüntüleri.	76
Şekil 4.4: Sarımsak (<i>Allium sativum</i>) ve farklı mantar ekstraktlarının (<i>Laetiporus sulphureus</i>) MDA MB- 231 insan meme kanseri hücreleri üzerine 100 µg/ml konsantrasyonunda, 48 saatlik sitotoksik etkilerinin, SRB canlılık testi ile alınan sonuçları.	77
Şekil 4.5: MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücreleri üzerine Laetirobinin 48 saatlik uygulamanın SRB canlılık testi ile alınan sonuçları.	78
Şekil 4.6: MCF-7 ve MDA MB-231 insan meme kanser hücreleri üzerine Eburikoik asit 48 saatlik sitotoksik etkilerinin SRB canlılık testi ile alınan sonuçları:	78
Şekil 4.7: Paklitaksel ve LSMM kombinasyonları ile 48 saat süreyle muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği.	79
Şekil 4.8: MCF- 7 hücrelerinin 12, 24 ve 48 saatlik 100 µg/ml LSMM ekstarktı ile muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. Kontrol hücreleri üst kısımda gösterilmiştir.	81
Şekil 4.9: MCF -7 hücre soyu ile yapılan çalışmanın M30-Antijen standart eğri grafiği	82
Şekil 4.10: 100µg/ ml LSMM ekstraktı 12 ve 24 saatlik uygulamadan sonra MCF-7 hücrelerinde M30-Antijen üzerine etkisi.	83
Şekil 4.11: Annexin-V boyanmasında Akım sitometri analizleri: MCF-7 hücrelerine 12, 24 ve 48 saat boyunca 100 µg/ml LSMM ile muamele edilmiştir.	84
Şekil 4.12: Kaspaz -7 aktivitesi için Akım sitometri analizleri: MCF-7 hücrelerine 12, 24 ve 48 saat boyunca 100 µg/ml LSMM ile muamele edilmiştir.	84
Şekil 4.13: MCF-7 hücre soylarında, 24 ve 48 saatlik 100 µg/ml LSMM muamelesinin; otofaji, apoptozis ve nekroptozis ile ilgili genlerin ekspresyonları üzerine olan etkisinin gösterimi.	85

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1: Uluslararası Kanseri Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre erkeklerde en sık görülen beş kanser türünün dağılımı [3].....	3
Tablo 1.2: Uluslararası Kanseri Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre kadınlarda en sık görülen beş kanser türünün dağılımı [3].....	3
Tablo 2.1: Karsinogenezde temel mekanizmalar [14].....	8
Tablo 2.2: Meme kanserinde moleküler sınıflama özellikleri ve görülme yüzdeleri [28].....	23
Tablo 2.3: Nükleer ribozomal DNA'ya dayalı sarımsağın sınıflandırılması	36
Tablo 2.4: Sarımsakta bulunan kimyasal bileşikleri (kCal 1,170 – 3,630/kg) [83].....	38
Tablo 2.5: Sarımsakta bulunan yağda ve suda çözünen bileşikler [84].....	40
Tablo 2.6: Sarımsağın farmakolojik etkileri ve sağlığa teşvik edici faydalarının özeti [88].....	44
Tablo 3.1: Hücre Ölümü (Apoptozis, Nekroz, Otofaji) ile İlişkili Genlerin Primer Dizileri.....	70
Tablo 3.2: qPCR Master Mix'in Hazırlanışı.....	70
Tablo 4.1: MCF -7 hücre soylarının 100µg/ml konsantrasyonunda, 48 saatlik uygulama sonrasındaki canlılık yüzde değerleri.	75
Tablo 4.2: LSMM uygulanan MCF -7 hücre soylarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre IC ₅₀ değeri.	75

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kisaltmalar	Açıklama
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
AIF	: Apoptozis indükleyici faktör
AL	: <i>Allium sativum</i> ekstraktı
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
CDK	: Sikline bağımlı kinazlar
CDKI	: Sikline bağımlı kinazlar inhibitörleri
CSF	: Kolonistimulan faktörler
CYP	: Sitokrom P450
DADS	: Diallyldisülfid
DATS	: Dialiltrisülfid
DD	: Ölüm Domaini, (Death Domain)
DISC	: Ölüm İndükleyici Sinyalizasyon Kompleksi, (Death Inducing Signaling Complex)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	: Östrojen reseptörleri
GFR	: Spesifik büyüme faktörü reseptörleri
GSTs	: Glutasyon S-transferazlar
GSH	: Redükte glutasyon
GTP	: Guanozin trifosfat
GPX	: Glutasyon peroksidaz
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
İGF-1 ve 2	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 ve 2
İL-2	: İnterlökin 2
LSMM	: <i>L.sulphureus</i> ekstarktı, Muğla bölgesi, maserasyon yöntemi
LSBM	: <i>L.sulphureus</i> ekstarktı, Bolu bölgesi, maserasyon yöntemi
LSBS	: <i>L.sulphureus</i> ekstarktı, Bolu bölgesi, soxhlet yöntemi
LSMS	: <i>L.sulphureus</i> ekstarktı, Muğlabölgesi, soxhlet yöntemi

MCF -7	: Michigan Kanser Vakfı-7,insan meme adenokarsinom hücre hattı
MDA MB 231	: Epitelyal, insan meme kanseri hücre hattı
MMP	: Metalloproteinazlar
MOMP	: Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
NCI	: Ulusal Kanser Enstitüsü,(National Cancer Institute)
OSC	: Organosulfid bileşikler
PDGF	: Trombosit kökenli büyüme faktörü
PR	: Progesteron
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RB	: Retinoblastoma
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium
SAC	: S-allil sistein
SAMC	: S-allil merkaptosistein
SNPs	: Tek nükleotid polimorfizm,(Single nucleotide polymorphism)
SOD	: Süperoksit dismutaz
SRB	: Sulforhodamine B Metodu
TCA	: Trikloroasetik asit
TDC	: Test edilen ilaç konsantrasyonu (Test Drug Concentration)
TGFα ve TGFβ	: Transforme edici büyüme faktörleri alfa ve beta
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TRAIL	: Tümör nekroz faktörü ile ilgili apoptoz indükleyici ligand reseptörü
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	: Dünya sağlık örgütü
YSH	:Yaşa standardize kanser hızı

ÖZET

DOKTORA TEZİ

MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE SARIMSAK (*Allium sativum*) VE MANTAR (*Laetiporus sulphureus*) EKSTRAKTLARININ ETKİLERİ

Fevziye Emin AKMAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN

II. Danışman: Prof. Dr. Engin ULUKAYA

Amaç: *Laetiporus sulphureus* ve *Allium sativum*'un maserasyon ve soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen metanol ekstraktlarının, insan meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisini araştırmak.

Metod: Sitotoksisite sulforodamin B (SRB) ile analiz edildi. Hücre ölüm modu floresan mikroskopu (Hoechst 33342 ve Propidyum iyodür (PI) boyama), M30 ELISA kiti, akış sitometrisi (canlı, erken/geç apoptotik, ölü hücreler ve kaspaz 3/7 aktivitesinin kantitatif analizi) ve RT-PCR kullanılarak morfolojik, biyokimyasal ve genetik olarak değerlendirildi. RT-PCR ile analiz edilen genler BCL-2L10, BIK, BAX, BCL-2, FASLG, HRK, TNFRSF10B ve TNFRSF10A idi.

Bulgular: MCF-7 ve MDA-MB -231 hücrelerine 48 saat uygulanan LSMM ekstraktının (*Laetiporus sulphureus*, Muğla bölgesi, maserasyon yöntemi) sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Erken piknotik nukleusların gözlemlenmesi ve Propidium iyodür (PI) pozitifliği, M30 artışı ve proapoptotik geni olan HRK'nın aşırı ekspresyonu, hücre ölümünün apoptozis benzeri bir ölüm olduğunu gösterir. Hücelere uygulanan 100 µg/mL sarımsak ekstraktı büyümeyi baskılayan herhangi bir etki göstermemiştir.

Bu çalışmada laetirobin ve eburikoik asit bileşiklerinin uygulandığı MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine, büyümeyi önleyici belirgin etkisi olmadığı gösterildi

Ayrı olarak kullanımlarına kıyasla daha güçlü bir etki yaratmak amacıyla LSMM ve paklitaksel kombinasyonunun sitotoksik aktivitesi çalışılmıştır. Çalışmalar neticesinde, kombinasyon muamelesinin artmış bir sitotoksik aktivite ile sonuçlanmadığı gösterilmiştir.

Sonuç: Elde edilen sonuçlara göre, LSMM ekstraktı MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği ve MCF-7 hücrelerinde apoptozis benzeri ölüm indüklediği bulunmuştur. Terapötik amaçlı kullanımında bunlar dikkate alınmalıdır.

Aralık 2017, .123. sayfa.

Anahtar kelimeler: *Allium sativum*, *Laetiporus sulphurous*, meme kanseri hücreleri.



SUMMARY

Ph.D. THESIS

THE EFFECTS OF THE EXTRACTS OF GARLIC (*Allium sativum*) AND MUSHROOM (*Laetiporus sulphureus*) ON BREAST CANCER CELLS

Fevziye Emin AKMAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN

Co-Supervisor: Prof. Dr. Engin ULUKAYA

Aim: To investigate the cytotoxic and apoptotic effects of methanol extract obtained by maceration and soxhlet extraction of *Laetiporus sulphureus* and *Allium sativum* on human breast cancer cell lines.

Methods: Cytotoxicity was analyzed by sulforhodamine B (SRB) assays. The mode of cell death was evaluated morphologically using the fluorescence microscopy (Hoechst 33342 and Propidium iodide (PI) staining, flow cytometry (quantitative analysis of live, early/late apoptotic, dead cells and caspase 3/7 activity), biochemically using M30 ELISA assay and the RT-PCR. The genes analyzed with RT-PCR were BCL-2L10, BIK, BAX, BCL-2, FASLG, HRK, TNFRSF10B, and TNFRSF10A.

Results. *Laetiporus sulphureus* extract from Muğla region (100µg/mL) obtained by maseration method (LSMM) demonstrated anti-growth effect at 48 h in both human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA–MB-231. The mode of cell death in cancer cells was shown to be apoptosis-like death cells due to the presence of early pyknotic nuclei, and PI positivity, increments in M30 and over expression of proapoptotic genes of HRK. The use of garlic extract of 100µg/mL was not established anti-growth effect.

In this study, it was shown that MCF-7 and MDA-MB-231, in which laetirobin and eburicoic acid were treated, which were not shown prominent growth inhibitory effects on breast cancer cells.

The cytotoxic activity of the combination of LSMM and paclitaxel has been studied to whether have a stronger effect compared to their use individually. Studies have shown that combination therapy does not lead to increase cytotoxic activity.

Conclusion: These results suggest that LSMM inhibits both the proliferation of MCF-7 and MDA–MB 231 cells and induces apoptosis like death on MCF-7 cells. This should be taken into account in its use for therapeutic purposes.

December 2017, 123. pages.

Keywords: *Allium sativum*, *Laetiporus sulphurous*, breast cancer cells

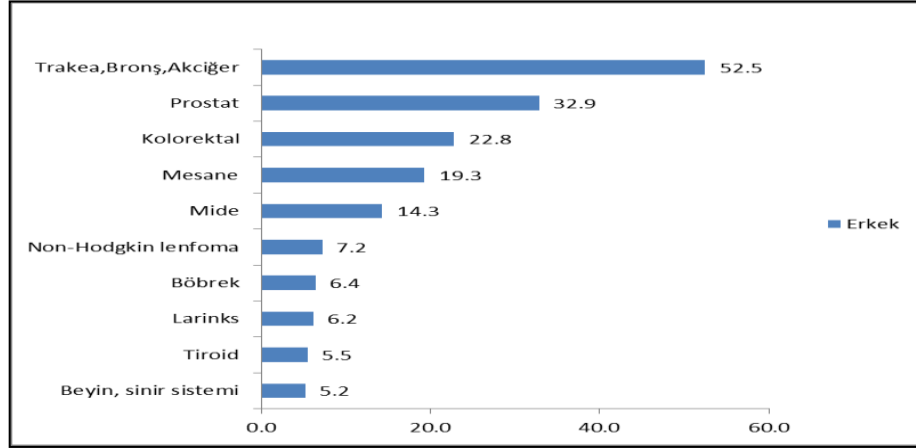


1. GİRİŞ

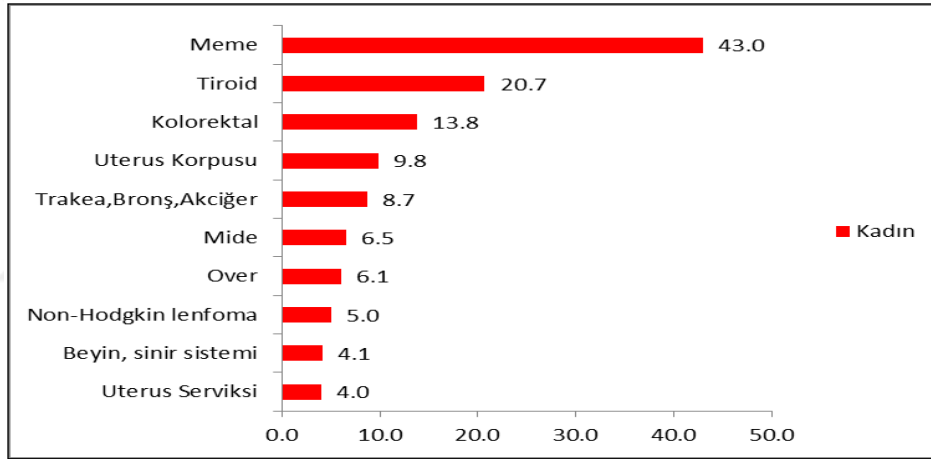
Kanser değişik organlarda hücrelerin kontrolsüz çoğalmasından oluşan klinik görünümü, tedavisi ve yaklaşımı birbirinden farklı olan hastalıklar grubudur. Kanserlere bağlı ölümlerde, akciğer kanserinden sonra meme kanseri ikinci sırada yer almaktadır. Bilinmeyen nedenler ile meme kanseri sıklığı tüm dünyada artmıştır. Kanserinin kontrol altına alınması hususunda önceliklerin belirlenebilmesi için kanser insidansının ve ölüm sayısının tahmin edilmesi gerekmektedir. Türkiye'nin de ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra kanserinin ikinci sırada yer aldığı düşünülürse bu hastalığın etyolojisinin belirlenmesi, önceliklerin tespit edilmesi anlamında büyük önem taşımaktadır [1].

Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının (IARC) verilerine göre 2012' de, son beş yılda 32,6 milyon kişiye kanser tanısı konmuştur (15 yaş ve üstü). Dünyada en çok tanı konulan kanserler akciğer (1.8 milyon, yani %13.0), meme (1,7 milyon, % 11.9), ve kolorektal (1,4 milyon, %9,7) iken kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (6 milyon, %19,4), karaciğer (0.8 milyon, %9,1) ve mideden (0,7 milyon, %8,8) gerçekleştiği belirtilmiştir. Globocan 2012 (Uluslararası Kanser Ajansının online veritabanı) tahminlerine göre küresel büyüme ve yaşlanma sebebiyle 2025 yılına kadar, yılda 19,3 milyon yeni kanser vakası meydana geleceği düşünülmektedir [2].

Türkiye'de 2014 yılında yaşa standardize kanser hızı (YSH) erkeklerde yüz binde 246,8 kadınlarda ise yüz binde 173,6'dır. Toplamda kanser insidansı ise yüz binde 210,2'dir. Türkiye'de toplam 163.417 kişiye kanser teşhisi yeni konulmuştur. Son 5 yıl verileri değerlendirildiğinde hem kadınlarda hem de erkeklerde istatistiksel açıdan kanser sıklığında herhangi bir artış ya da azalış gözlenmediği söylenebilir. Türkiye kanser insidansı, erkeklerde dünya insidansının üzerinde seyrederken kadınlarda bu oran bir miktar daha düşüktür. Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre kanser oranındaki artışın hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük olduğu görülmektedir. Ülkemizde görülen ilk beş kanser türünün dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerdeki örüntü ile benzerlikler gösterdiği görülmektedir. Erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri (52,5/100000 kişide YSH); kadınlarda ise meme kanseri (43,0/100000 kişide YSH) en sık görülen kanser türleridir (Şekil1.1.ve Şekil1.2.) [3].



Şekil 1.1: Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide) [3].



Şekil 1.2: Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 kişide) [3].

2008 sonu itibarıyla, Türkiye’de kanser insidansı, yüz binde erkeklerde yaklaşık 280, kadınlarda ise yaklaşık 172 olarak hesaplanmaktadır. Bu ülkemizde her yıl yeni 170 bin kanser teşhisi konulduğu anlamına gelmektedir. Bu kanserlerin 2/3 ü erkek olup, 1/3 ü kadınlardan oluşmaktadır. Bu oranlama dünyada da bu şekildedir. Erkek ve kadınlarda görülen kanser türlerinin dağılımı farklılık göstermektedir. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilere göre erkeklerde ilk üç kanser türü, prostat, akciğer ve kolon iken Türkiye’de bu sıralama akciğer, prostat ve kolorektal şeklinde olmaktadır. Meme kanseri ülkemizde ve dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Kadınlarda ilk üç kanser türü

dünyada meme, kolon ve akciğer kanseriyken Türkiye’de sıralama meme, tiroid ve kolorektal kanseri şeklinde olmaktadır ve kanserin insidansı 45 -75 yaş arası artmaktadır (Tablo 1.1 ve 1.2.) [3].

Tablo 1.1: Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre erkeklerde en sık görülen beş kanser türünün dağılımı [3].

Türkiye*	Dünya	IARC’a üye 24	AB (28 ülke)	ABD
1 Akciğer	Akciğer	Prostat	Prostat	Prostat
2 Prostat	Prostat	Akciğer	Akciğer	Akciğer
3 Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal
4 Mesane	Mide	Mide	Mesane	Mesane
5 Mide	Karaciğer	Mesane	Böbrek	Böbrek

*Türkiye birleşik veri tabanı, 2014.

Tablo 1.2: Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre kadınlarda en sık görülen beş kanser türünün dağılımı [3].

Türkiye*	Dünya	IARC’a üye 24	AB (28 ülke)	ABD
1 Meme	Meme	Meme	Meme	Meme
2 Tiroid	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Akciğer
3 Kolorektal	Uterus serviksi	Akciğer	Akciğer	Kolorektal
4 Uterus korpusu	Akciğer	Uterus serviksi	Uterus serviksi	Tiroid
5 Akciğer	Uterus korpusu	Uterus korpusu	Uterus korpusu	Uterus

*Türkiye birleşik veri tabanı, 2014.

Dünyada kanser olan her dört kadından biri meme kanseridir. Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %45’in 50-69 yaş arasında olduğu, %40’ın ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir. Mevcut verilere göre, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklığın olduğu tahmin edilmektedir. Bu sıklık farkı, batı Türkiye’deki yaşamın Avrupa’dakine benzerliğinden kaynaklanmaktadır. Bu farklılıkların genetik kökeninden ziyade çevresel faktörlere bağlı oldukları sanılmaktadır. Çünkü sıklığı düşük bir bölgeden sıklığı yüksek bir bölgeye göç edenlerde (veya tam tersi), göç ettikleri bölgenin kanser oranlarına adaptasyon sağladıkları gözlenmektedir. Bu durumda beslenme alışkanlıklarının da bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Eğer bu tür kanserde etkili bir koruyucu tedavi geliştirilebilirse bunun hastalık ve ölüm oranları üzerinde önemli etkisi olur. Ancak meme kanseri hücreleri kemoterapiye oldukça dirençlidir ve ileri evrelerde hastalar için özellikle de hormona bağımsız vakalarda etkili bir tedavi hala yoktur.

Sağlık Bakanlığının verilerine göre Türkiye’de meme kanseri insidansının kadınlar arasında %35 oranında olduğu görülmektedir. Erkeklerde meme kanseri gelişme riski genellikle düşüktür. Amerika’da erkeklerde meme kanseri, vakaların yaklaşık %1’ini oluşturur. 1975 - 1979 yıllarında, insidans hızı yıllık, 100.000 kişide 1.0 iken, 2008-2012 döneminde insidansın %0,8 arttığı ve 100.000 erkekte 1.3’e ulaştığını gösterilmiştir [4].

Yapılan çalışmalarda, meme kanserinin önlenmesi için beslenme gibi değiştirilebilen risk faktörlerine yer verilmektedir. Genellikle meyve ve sebze açısından zengin diyetler, özellikle meme kanserinde kanser riskinin azalması ile ilişkilidir [5]. İlk kez 1981 yılında ABD’deki kanserlerin %35’inin beslenmeye bağlı faktörlerden kaynaklandığı ortaya koymuştur [6].

İyi beslenme; meme kanseri riskini, insidansını veya nüksetme riskini azaltabilir. Beslenme ile kanser arasındaki ilişkiyi anlamak için birçok çalışma vardır. Dengeli beslenmenin diabet, obezite, yüksek tansiyon ve kalp hastalıkları gibi kronik hastalıkların oranlarını azalttığı ve aynı zamanda kişinin yaşam kalitesini arttırdığı bilinmektedir [7].

Diyetin meme kanseri teşhisinde önemli bir rol oynadığı bilinmekte olup bazı çalışmalara göre ise bu etken kanser teşhisi konulduktan sonra da önem taşımaktadır. Teşhis öncesi ve sonrası lifli gıdalar tüketen ve teşhis sonrası soya içeren gıdalar yiyen meme kanseri hastalarının ölüm riskinin daha düşük olabileceğinin altı çizilmektedir. Hastalığın gelişiminden önce, yüksek miktarda doymuş yağ içeren besinler ile beslenen kişilerde, meme kanseri teşhisinden sonra ölüm riski artabilir [8].

Doğal ürünler yeni ilaç ve kimyasalların kaynağı olmaya devam etmektedir. Meyve ve sebzelerde bulunan birçok ajan antikanser tedavilerinde kullanılmaktadır, özellikle de *Allium* familyası ve bu familyadan olan sarımsak. Sarımsağın (*Allium sativum*) antikanserojenik etkileri alliin, allisin, S-alil sistein (SAC), diallildisulfid (DADS), dialliltrisulfide (DAT) ve metilalliltrisulfid gibi organosulfid bileşiklere (OSC) bağlıdır. Anti-aterosklerotik, kan lipidlerin ve şekerin modülasyonunda, antifungal, antimikrobiyal, antitrombotik, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde bağışıklık sisteminin uyarıcı gibi diğer olumlu etkileri sayesinde sık sık kullanılması gerçeği vardır [9].

Antioksidan ve terapötik özellikleri olduğu bilinen ve bu nedenle önemli besin kaynağı olarak kullanılan mantarlar dünyada ilgi çekmeye devam etmektedir. Mantarlarda antioksidan

özelliğe sahip olan fenolik bileşikler, tokoferoller, askorbik asit ve karotenoidler yer almaktadır [10].

Kükürt mantarı (*Laetiporus sulphureus*, *Polyporales* ailesi) Avrupa ve Kuzey Amerika'da yetişen bir türdür. Biyolojik aktivite çalışmaları bu mantarın immunomodulasyon ve antitümör, hemagglütinasyon, sitotoksik, apoptozis indükleyici, antimikrobial ve insulintropik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir [11].

Bu tez çalışmasında sarımsak (*Allium sativum*) ve kükürt mantarından (*Laetiporus sulphureus*) elde edilen ekstraktların insan meme kanseri hücrelerinin (MCF-7, MDA-MB-231) üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KARSİNOGENEZİS

Canlılığın sürdürülebilmesi için yaşam döngüsünü tamamlayan hücrelerin yerine sürekli yeni hücrelerin oluşması gerekir. Hücre ölümü ve yeni hücrelerin oluşum süreçleri genler tarafından kontrol edilerek dengede tutulur. Hücrelerin bölünüp çoğalması da genler tarafından kontrol edilir. Bazı genler hücrelerin aşırı bölünmesini önler. Normal hücreler sınırlı sayıda bölünme yeteneğine sahiptir. Bu hücreler yaşam sürelerinin sonunda ya da hasar gördüklerinde ölecek yerlerini yeni hücrelere bırakmaktadır.

Bölünerek çoğalan her bir hücre biyolojik özellikler temelinde gelişir, farklılaşır, apoptozis adı verilen programlanmış hücre ölümü ile işlevini sonlandırarak yerini yeni gelişen hücrelere bırakır ve bu hücrelerin üremesi önlenir. Bölünme sürecinde mitotik (M) fazını, G₀, G₁, S ve G₂ fazlarından oluşan interfaz izler. Bölünme sinyali almayan hücre, hücre siklusunun aktif (G₁, S, G₂, M) fazlarına girmez ve dinlenme fazı denilen G₀ fazında bekler. G₀ fazı genelde hücre siklusu içinde yer almayan, siklusunu tamamlayan ve sikludan çıkan hücrelerin bulunduğu fazdır. Bölünme uyarısı alındıktan sonra bu fazdan çıkıp G₁ fazına yani siklusun ilk fazına girerler. Bazı hücreler bölünmeye devam etmeyip G₁ fazından çıkarlar ve diferansiye olmak üzere farklı yöne kayar.

İnterfaz (G₁, S, G₂) 16-24 saat sürer ve hücre döngüsünün süresinden yaklaşık %90'ını alır. Mitoz fazı 1-2 saat sürer. G₁ fazında hücreler büyür, RNA ve protein sentezi yapılarak DNA sentezi (replikasyonu) için ön hazırlık yapılır. S fazında DNA replikasyonu olur. G₂ fazında yine RNA ve protein sentezi gerçekleşir ve hücre büyümeye devam eder. Bu fazda hücre mitozu hazırlanır. Profaz, metafaz, anafaz ve telofaz mitozu oluşturur. Hücre döngüsünde, fazlar arası geçişlerde eğer bir faz tamamlanmadan bir sonraki faza geçiş yapılırsa genetik materyal tam ve doğru kopyalanamaz. Bundan ötürü hücrede hasar meydana gelebilir.

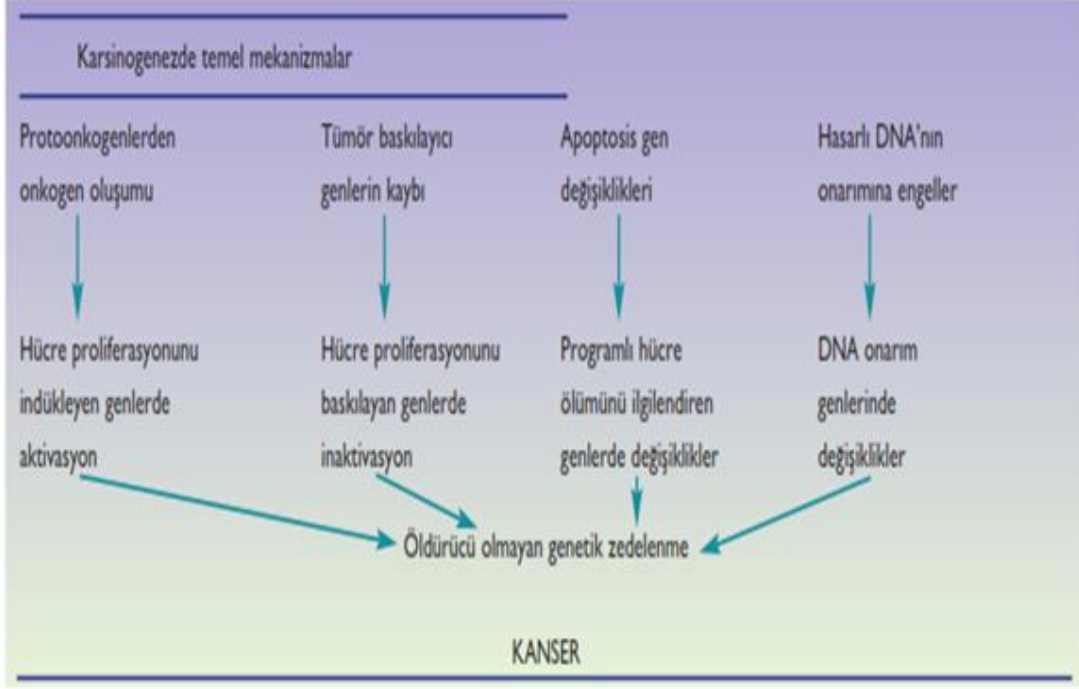
G₁-S, G₂-M ve metafaz-anafaz geçişlerinde hücre siklusunda fazlar arası kontrol noktaları vardır. Hücrenin siklusa devam edip etmeyeceği bu noktalarda karar verilir [12].

Hücre döngüsünün her evresi özgün genlerin kontrolü altındadır. Bölünme, gelişme farklılaşma ve apoptozisi yönlendiren pek çok gen söz konusudur. Proto-onkogen adı verilen genler daha çok hücre bölünmesi, gelişme ve farklılaşmasını yönlendirirken tümör süpressör gen adı verilen

genler ise apoptozisi regüle eder. Tüm bu işlevler hücrede, ilgili genlerin kontrolü altında gerçekleşir. Herhangi bir gende oluşan mutasyon, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozisi etkileyerek kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açabilecek ve kanser oluşumuna zemin hazırlayacaktır [13].

Vücütte oluşan kanser hücreleri bağışıklık sistemi tarafından yabancı hücre olarak algılanarak parçalanır. Böylece vücütte oluşan kanser hücreleri bağışıklık sistemi tarafından uzaklaştırılır. Mutasyona uğramış hücrelerin hayatta kalma şansı normal hücrelere göre daha azdır. Aşırı büyümeyi kontrol eden feedback kontrol mekanizması, tümör süpresör genlerin kontrolü altında pek çok mutasyon geçirmiş hücrelerde hala aktif durumdadır. Bu nedenle mutant hücrelerin çok küçük bir oranı kanser hücresine dönüşür. Bağışıklık sisteminin immun yanıtı ile mutant hücreler, kanser hücresine dönüşmeden önce vücütte parçalanır. Buna “immün denetim” denir. Bazen hücreler, çevresel faktörlerden dolayı çok basamaklı bir süreç içinde, hücre DNA’sında ve kromozomların fonksiyonel birimleri olan genlerde oluşturduğu değişiklikler neticesinde kontrolsüz olarak bölünmeye başlarlar. Komşu dokulara (invazyon) ve/veya uzak organlara yayılırlar (metastaz). Bu anormal hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılma özelliğine sahip olması ile gelişen hastalığa kanser veya tümör adı verilir [12].

Karsinogenezdeki temel mekanizmaların özünde, hücredeki öldürücü olmayan genetik zedelenme bulunur. Bu zedelenme öncelikle hücre proliferasyonunu indükleyen genlerde aktivasyon, hücre proliferasyonunu baskılayan genlerde inaktivasyon ve hücrenin programlı ölümünü ilgilendiren genler (apoptoz genleri) ile DNA tamir genlerinde değişiklikler şeklinde oluşabilmektedir. Karsinogenez, fenotipik düzeyde olduğu gibi genetik bakımdan da çok basamaklı bir olaydır (Tablol 2.1.) [14].

Tablo 2.1: Karsinogenezde temel mekanizmalar [14].

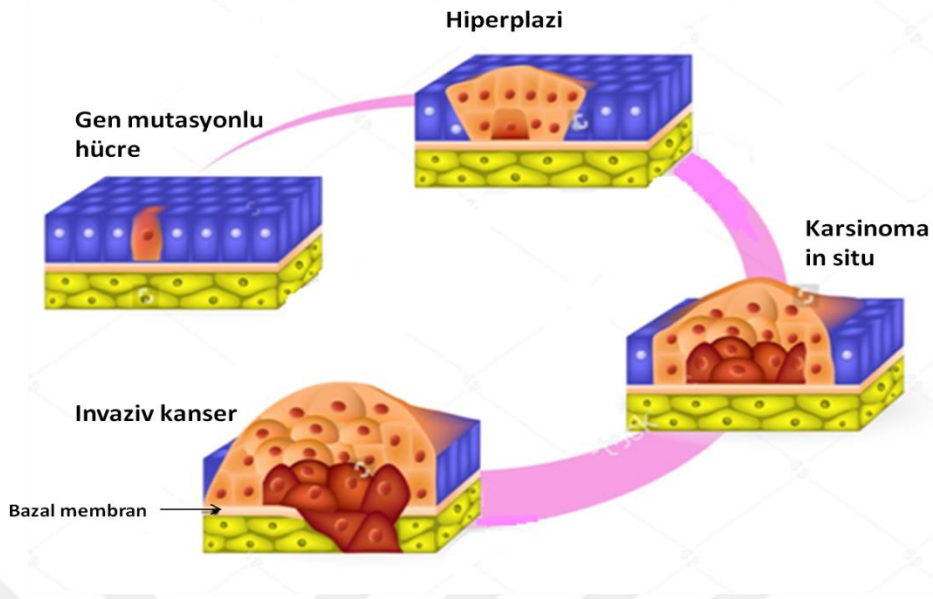
“Kontrolsüz çoğalma”, kanser hücrelerin önde gelen özelliklerinden biri olmakla beraber apoptozisten kaçabilme, hücre kültürü ortamında kontakt inhibisyonundan kaçabilme, çoğalmayı baskılayan sinyallere karşı duyarsız kalma, anjiyogenez uyarabilme, hücrenin bölünmesi için dış sinyallerine ihtiyaç göstermeme ve metastaz yapabilme gibi özellikleri vardır. Yakın zamanda “normal” bir hücrenin kanser hücreğine dönüşmesini (“onkogenez” ya da “karsinogenez”) tetikleyen olumsuz faktörleri ortaya çıkaran mekanizmalar kısmen anlaşılmıştır [15].

Tümörler iki çeşit olabilir: benign ve malign. Benign tümörlerde, tümör hücreleri invazyon yapmazlar yani yerel dokuları istila etmez ve vücudun diğer bölümlerine yayılmazlar [16]. Örneğin benign bir akciğer tümörü ise akciğerde bulunur. Akciğer dışında başka bir organa metastaz yapmaz. Benign tümörler kapsül oluşturur ve canlının yaşamını fazla tehlikeye atmaz. Bununla birlikte sinir sistemi, damarlar ve kanallara basınç yaparak hastalık belirtileri oluşturur. Bu tümörler genellikle operasyonla alınır. Ancak iyi huylu bir tümör zamanla malign bir değişime uğrayabilir (insan kolon adenomları gibi) ya da kendiliğinden gerileme gösterebilir. Malign tümörlerde hücreler, metastaz yapar yani başka dokulara yayılmak için dolaşım sistemine katılır ve gittiği dokularda kansere sebep olur. Yakın zamanlarda epigenetik değişikliklerin malign karakter kazanmasında önemli rol oynadıkları görülmüştür [17].

Çok basamaklı bir süreç olan insan tümör gelişiminde, kanserin altı farklı biyolojik yeteneği öne çıkmaktadır:

1. Çoğaltıcı sinyallerin destekleyici olması.
2. Büyüme baskılayıcı sinyallerden bağımsız olması.
3. Proliferasyonda sınır olmaması.
4. Hücre ölümüne dirençli olması.
5. Anjiogenezi uyarabilir olması.
6. İnvazyon ve metastazı uyarabilir olması [18].

Başlıca kanserojen ajanlar üç ana gruba ayrılır: kimyasal, viral ve fiziksel. Bütün bu ajanlar DNA' da mutasyonlara sebep olur. DNA' daki değişiklikler hücrelerin aşırı çoğalmasına sebep olur. Bunlar kanser nedenlerinin arasında ilk sırada yer almaktadır. Hücrelerin kanserli hücreye dönüşmesi (neoplastik hücre) çok adımlı bir süreçtir. Deneysel karsinogenezide bu süreç, başlatma (inisiyasyon), terfi etme (promosyon) ve ilerleme (progresyon) olmak üzere üç aşamaya bölünmüştür. İnisiyasyon hızlı gerçekleşir; kalıtsal ve geri dönüşümsüzdür. Kimyasal, fiziksel veya biyolojik etkenler, DNA'ya kalıcı hasar (örn., mutasyon) verir. Bu hücreler fenotip olarak, DNA'sı hasara uğramamış komşu hücrelerle aynıdır. Üçüncü adım olan ilerleme, transformasyona uğramış hücrelerin çoğalmasıdır. Bu süreçte destekleyiciler tarafından indüklenen değişiklikler geri dönüşümlüdür. Başlatma sürecine uğramamış hücreler transformasyona uğramaz. Bu aşamada hücrelerin aşırı bölünmesi ek mutasyonlar da içerebilir. Sonuçta bu süreçler neoplazi gelişimine neden olmaktadır (Şekil 2.1.) [19, 20].



Şekil 2.1: Mutasyona uğramış tek bir hücreden gelişen tümör kitlesi (<https://www.dreamstime.com/stock-illustration-developmental-phases-cancer-cells-growing-tumor-stages-carcinogenesis-image>).

Sırasıyla tümör oluşumunu basamaklara ayıracak olursak: (1) hücrenin malignleşmesi ve transformasyonu, (2) çoğalması (proliferasyon), (3) invazyonu, (4) metastaz olarak özetlenebilir [14].

2.2. KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ

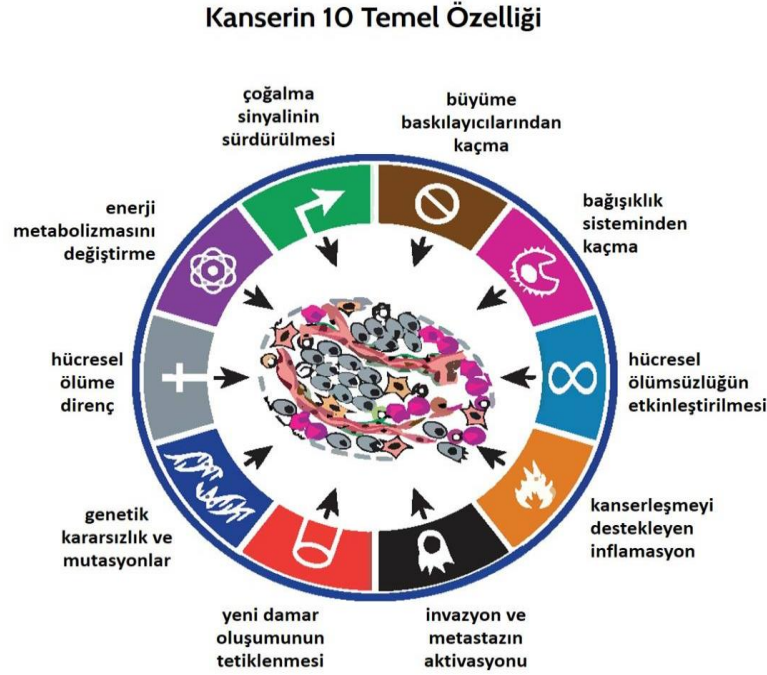
Hücre proliferasyonu için gerekli olan sinyal iletim sistemi en başta proto-onkogen, nonproto-onkogen kaynaklı büyüme faktörlerinden ve daha bir dizi polipeptidten oluşur. Bunlardan başlıcaları PDGF (trombosit kökenli büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü), CSF (kolonistimulan faktörler), TGF α ve TGF β (transforme edici büyüme faktörleri alfa ve beta), İL-2 (interlökin 2), İGF-1 ve 2 dir (insülin benzeri büyüme faktörü). Büyüme faktörleri tirozin kinaz aktivitesi gösterir. Proto-onkogen proteini olan hücre membranının içine veya her iki tarafına yerleşmiş olan spesifik büyüme faktörü reseptörlerine (GFR) ve bazı hormon reseptörlerine bağlanarak bu reseptörlerin sitoplazmik bölgeleri üzerinde bulunan tirozin kinaz enzimleri aktif hale getirilir. Böylece ekstrasellüler, sinyal aktifleşen tirozin kinazların sayesinde sitoplazmada ve nukleusta bulunan proteinlere aktarılır. Bu sinyal iletimi kaskadın son aşamasında DNA'nın replikasyonunu uyarır ve hücrelerin bölünüp çoğalması aktif hale gelir. Bu sinyal iletimini kontrol eden genlerin birinde meydana gelen aşırı aktivasyon kontrolsüz çoğalmaya sebep olabilir [12].

Kanserli dokular kan desteği olmadan en fazla 1mm çap olarak buyeyebilir. Kapiller damarlardan ilk önce difüzyonla beslenen tümör hücrelerine, anjiogeneze gerek kalmadan 2-3 mm çapına ulaşabilir. Böylece artan proliferasyona karşılık hücre ölümü çoğalır. Tümör dokusunun büyümesi için yeni damar oluşturma gereksinimi ortaya çıkar. Kan desteğinin sağlanmasıyla hücre ölüm hızı azalır; tümör büyür ve metastaz yapabilir [21].

Tümörün çoğalmasında ve metastaz yapmasında önemli rol alan hücreler, endotel hücrelerdir. Yeni kan damarlarının oluşumunda başlıca iki faktör vardır: endotel hücreler ve anjiogenikler (VEGF, TGF alfa, IGF 1 ve 2, p 53). Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) anjiogenezi indüklerken bu süreçte yer alan diğer büyüme faktörlerinin de sentezini ve aktivasyonunu sağlar. Uyarılmış epitelyum hücrelerinde VEGF'e apoptozisinin baskılandığı görülmüştür [21, 22].

Tümör dokusu belli bir büyüklüğe eriştiğinde, bazı kanser hücreleri bu dokudan ayrılır ve ilerlemeye (invazyon) başlar. Damara rastlayan hücre, damarın endotel etrafındaki bazal membranı eritir ve damarın içine girer. Böylece kan akışıyla birlikte vctta dolaşır. Bu hücre damar içindeki yolculuğunda hedef organlarının yüzeyine tutunarak, o bölgenin damar duvarını tekrar eritmeye başlar. Böylece kanser hücreleri hedef dokuya yerleşir ve çoğalmaya devam eder. Tüm vücudu dolaştıkları halde damar içinde, bazı kanser türlerinin hücreleri genellikle belli organlara metastaz yapmaktadır. Örneğin; meme kanseri kemiğe ve akciğere, mide kanseri daha çok karaciğere, kemik tümörleri akciğere metastaz yapar. Bu “organ seçiciliğini” belirleyen başlıca faktörler: organın damar yapısı, kanser hücrelerinin yüzey özellikleri ve organların damar duvarındaki hücrelerin yüzey özellikleridir. Primer tümör dokusundan ayrılan kanser hücresinin damar içine girerek başka organlara yerleşmesine metastaz denir. Bulunduğu ekstrasellüler matrikste ilerlemesi için, primer tümörden ayrılan tümör hücreleri; lizozomal enzim, protein kinazlar, matriks metalloproteinazlar (MMP) gibi enzimler salgılayarak ilerler (invazyon). Damar içinde ilerleyen yaklaşık 10.000 tümör hücresinden bir tanesinin metastaz yapabileceği gösterilmiştir [12].

Hedefe yönelik tedavi, kanserin yıllardır sürdürülen çalışmalarının meyvesi olarak tanımlanmıştır. Kansere karşı etkili tedavilerin geliştirilmesi, kanserin özelliklerine göre sınıflandırılabilir Şekil 2.2.[18].



Şekil 2.2: Kanserinin on temel özelliği [18].

2.3. KANSEROGEN METABOLİZMASI

Gıda ve beslenme ile birlikte kanserogenezisin ortaya çıkması ve ilerlemesi birçok faktör tarafından değiştirilir. Besinlerde bulunan selenyum, allil kükürt, sülfüran ve izoflavonoidler, karsinogenezisi değiştiren maddelerdir. Çoğu diyet karsinogenler, DNA'ya bağlanabilen reaktif ara maddelerini üretmek için aktivasyona ihtiyaç duyar. Karaciğerde ve diğer organlarda bulunan Faz I ve Faz II metabolik enzimler bu süreçte yer alır. Bu enzimler aerobik metabolizma sonucu oluşan ksenobiyotiklerin, ilaçların ve karsinojenlerin metabolik detoksifikasyonunu kataliz eder, bu da hücreleri oksidatif strese ve reaktif elektrofilik karsinogenlerden korur. Karsinojenlerin metabolik aktivasyonu genellikle oksidasyon sonucu Faz I enzimleri olan sitokrom P450 (CYP) ailesi tarafından suda çözünür moleküllere dönüştürülerek gerçekleşir. Bu sırada oluşan bazı ara maddeler kanserojen olabilir ve DNA'ya bağlanarak DNA adüktleri oluşturabilirler. Bu adüktler DNA'nın yapısını bozar ve potansiyel

olarak yanlış translasyona neden olabilir. DNA zincirini bozarak genetik materyalinde mutasyon veya delesyonlar oluşmasına neden olabilir. P450 enzimlerinin yanı sıra peroksidazlar (siklooksigenazlar dâhil) ve bazı transferazlar (N-asetiltransferaz ve sülfotransferaz) kanserojenlerin biyolojik aktivasyonunu etkileyebilir. İkinci grup Faz II enzimleri karsinojenlerin detoksifikasyon sürecini devam ettirir. Konjugasyon reaksiyonları sonucu, bunların idrarla veya safra ile atılabilen moleküllere dönüşmesini sağlar. Asetiltransferazlar, glutatyon S-transferazlar (GSTs), UDP-glukuroniltransferazlar, NAD(P)H kinon oksidoredüktaz ve sülfotransferazlar gibi enzimler Faz II enzimlere dâhildir. Faz II enzimlerinin induksiyonu spesifik genlerin promotör bölgesinde bulunan antioksidant yanıt elemanları tarafından sağlanır. Bu enzimlerin her biri, diyet bileşenlerinin potansiyel bir hedefini temsil eder. Enzim aktivitesi diyet faktörleri tarafından modüle edilebilir. Örneğin turpgil sebzelerinde bulunan tiosianatların, Faz II detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunu indüklediği ancak Faz I enzimlerinin ekspresyonunda etkili olmadığı gösterilmiştir. CYP3A4 enzimi, tüm farmasötik ajanların çoğunun metabolizmasına katılır ve özellikle diyeti etkilemeye duyarlıdır. Örneğin, greyfurt suyu, kırmızı şarap, sarımsak ve çeşitli ilaçlar ile etkileşimleri bildirilmiştir. Faz I ve II enzimlerin aktivitesi yani kanserojen metabolizması ve kanser gelişimi kişiden kişiye değişir. Tek nükleotit polimorfizmlerin (single nucleotide polymorphism: *SNPs*) birçok Faz I ve Faz II enzimlerinde kanser riskini modüle ettiği gösterilmiştir. GST'ler çevresel karsinojenler ve reaktif oksijen türlerin metabolizmasında rol alır. Bu enzim eksikliğini taşıyan insanlarda, kanserojen aktivitesini bertaraf etme kapasitesi düşük olduğu için kanser riski yüksektir. GST'ların ekspresyonu düşük olan bireylerde kolorektal kanser riski yüksektir, ancak izotiosianitlerden (sebzelerden türemiş glükozinolatlar) zengin olan bir diyet bu durumu iyileştirebilir.

Epidemiyolojik çalışmalar, bu genotiplere sahip bireylerin meme, prostat, karaciğer ve kolon dâhil olmak üzere birçok kansere yatkın olduğu fikrini desteklemektedir. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geninde SNP'lar, MTHFR aktivitesini azaltarak folat metabolizmasını etkilemekte ve kolorektal kanser riskinde bir azalma ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Diyetlerinde kırmızı ve yüksek ısıda işlenmiş et tüketen ve CYP2E1 varyantı taşıyanlarda, rektal kanser riski daha yüksektir. *Cruciferae* ailesinden sebzelerin tüketilmesi, GSTM1 geni bulunmayan bireyleri akciğer kanserine karşı korur [5].

2.4. BESLENME VE KANSER

Hücrelerin aşırı çoğalması gen fonksiyonlarının bozulmasından (mutasyon) ortaya çıkan bir sonuçtur. Bunun nedeni beslenme, yiyeceklerdeki katkı maddeleri, radyasyon, hava kirliliği vb. gibi faktörler olabilir. Hücrelerin aşırı üremesi kontrol altında tutulamayınca kanser oluşmaya başlar.

Besinlerde bulunan mutajenik ya da kanserojenik ajanlar DNA'ya bağlanarak nukleik asit zincirinde hasar oluşturur. DNA tamir mekanizmalarıyla hasarın düzeltilememesi veya kritik bir seviyeye ulaşması durumunda normal hücreler kanser hücresine dönüşür. 24 saat içinde DNA onarım mekanizmaları ve diğer gen koruyucu mekanizmalar, DNA'da oluşan hasarların %90'ını tamir eder. İnsanda bulunan DNA onarım mekanizması en gelişmiş mekanizmadır. İnsan hücrelerinde günde yaklaşık 10. 000 mutasyon meydana gelir. Tamir mekanizmaları olmasaydı normal hücreler mutasyonlar sonucu hızla kanser hücrelerine dönüşürdü. Hücrelerde DNA onarım kapasitesi sınırlı olduğundan gen koruyucu mekanizmalar çok önemlidir. Büyük ölçüde genlerin korunması beslenmeyle sağlanabilir [23].

Kanser gelişimi veya kanser oluşumu, bir dizi hücre değişikliği gerektirir. Tek bir gen kansere neden olamaz. Hücresel süreçleri kontrol eden genlerde, birikmiş hataların neden olduğu çok adımlı bir süreçtir. Bir genetik mutasyon, tek bir özelliğin (artmış sağkalım gibi) değişmesine neden olabilirken kanser normal komşu hücrelere kıyasla büyüme ve hayatta kalma avantajları sağlayan birkaç gen değiştirildiğinde gelişir. Bir hücrenin kanseri önlemesi ve kanserin onarılması için etkili kapasite elde etmesi, ekstrasellüler mikro çevreye yani uygun makro ve mikro besin maddelerinin varlığına bağlıdır. Tümörler kanser hücrelerinin basit bir topluluğu değildir. Daha ziyade, bunlar stromal hücreler olarak adlandırılan birçok başka hücre tipinden oluşan heterojen kanser hücrelerinin koleksiyonlarıdır. Kanser hücreleri, tümör içindeki stromal hücrelerle iletişim kurar. Endotel hücreler, sinir hücreleri, fibroblastlar ve infiltrate edici bağışıklık hücreleri (lenfositler ve makrofajlar) de dâhil olmak üzere tümörün mikro çevresi birçok hücre tipini içermektedir. Tüm bu hücre tipleri, malign transformasyonu ve tümör büyümesini destekleyebilen, konak yanıtını zayıflatabilen büyüme faktörleri, inflamatuvar mediatörler ve sitokinler üretebilir. Buna ek olarak kanser hücreleri tarafından üretilen faktörler, tümör stromasının aktivitesini ve davranışını modüle eder.

İnisiyasyon, bir hücrenin veya dokunun bir faktöre maruz kalması sonucunda genetik mutasyona uğramasıdır. Bu kalıtsal bir mutasyon, ekzojen ya da endojen (oksidatif metabolizma yoluyla üretilen) faktör olabilir. Dış oksidatif stresi olmadan da her gün DNA'daki yüzlerce bölge hasar görür, ancak normal durumlarda bu hasar tamir edilir veya yok edilir. Kanserojene maruz kalma, genellikle DNA adüktlerinin oluşmasıyla DNA hasarını başlatır. DNA onarılmadığında adüktler, bölünme sırasında yeni oluşan hücrelere aktarılabilir ve neoplastik (yeni ve anormal) büyüme potansiyelini sunabilir. Kanserin gelişmesi için tek başına inisiyasyon yeterli değildir. Hücreler promosyon ve progresyon süreçlerinden geçirilmelidir. Her gün binlerce diyet bileşeni tüketildiği için diyet ve kanser arasındaki bağlantıları çözmek karmaşıktır. Atipik diyetle 25.000'den fazla biyoaktif gıda bileşeni sağlanabilir. Normal ve kanserli hücreler, biyoaktif gıda bileşenlerine verdiği cevaplar; konsantrasyon, zamanlama ve maruz kalma süresi açısından farklılık gösterir [5].

Gelecekte kanser insidansının artması beklenmektedir ve bu zorlukla yüzleşmek için etkili bir koruyucu stratejiye ihtiyaç duyulmaktadır. Diyet alışkanlıklarının değişmesi kanser riskini azaltmak için potansiyel olarak etkili bir yaklaşımdır. Kansere ve bireysel duyarlılığın tahminiyle bağlı olan belirli gıda veya biyoaktif bileşenin biyolojik etkilerinin değerlendirilmesi, besini- besin etkileşimleri ve genetiğin bir fonksiyonu olarak öngörmesi, diyet müdahalelerinin yararlanıcılarını değerlendirmek için önemli bir unsurdur. Genel olarak, bireylerin kansere karşı hassasiyetlerini değerlendirmek için biyolojik belirteçlerin kullanımı kolay erişilebilir ve güvenilir olmalıdır. Bununla birlikte, bireylerin biyoaktif gıda bileşenlerine verdikleri tepki, sadece biyoaktif gıda bileşenlerinin etkin konsantrasyonuna değil, aynı zamanda hedef dokulara da bağlıdır. Bireylerin gıda bileşenlerine verdikleri yanıt kişiden kişiye değişir.

Nutrigenomik, bireyde genler ve beslenme arasındaki etkileşimin anlaşılmasına ve biyoaktif gıda bileşenlerine verilen cevabın kişinin genlerinden nasıl etkilendiğine odaklanır. Besinlerin gen ekspresyonunu etkilediğini, DNA ve protein moleküllerinde değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Nutrigenomik yaklaşımlar, besin maddeleriyle gen ekspresyonunun nasıl regüle edildiğini ve beslenmenin gen varyasyonlarını ve epigenetik olayları nasıl etkilediğini incelemek için fırsat sağlar.

Genler ve beslenme arasındaki etkileşimde yer alan bileşenleri bulmak, potansiyel olarak kanser semptomlarının önlenmesinde ve / veya azaltılmasında önemli olan hedef moleküllerin belirlenmesine yardımcı olabilir [24].

2.5. MEME KANSERİ

2.5.1. Meme kanserinde risk faktörleri

Meme kanseri ile ilişkili birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bu risk faktörleri şu şekilde sınıflandırılabilir:

1. Etnisite, yaş ve ırk (demografik faktörler).
2. Reprodüktif faktörler (ilk canlı doğum yaşı, menarş yaşı, menopoz yaşı).
3. Genetik faktörler (ailede meme kanseri olduğu bilinen veya şüphe edilen gen mutasyonları p53, BRCA 1/2, PTEN veya diğer).
4. Çevre faktörleri (beslenme, sosyo-ekonomik düzey, alkol kullanımı, 30 yaşından önce toraks bölgesine radyoterapi. Örneğin; Hodgkin hastalığı tedavisi, hormon replasman tedavisi, vb.) [25].

İstanbul'daki Türk kadınları arasında yapılan bir çalışmada, yaş ve indüklenen düşüklerin önemli ölçüde meme kanseri riskinin artması ile ilişkili olduğu, oral kontraseptif kullanımının meme kanseri riskinde azalma ile ilişkili olduğu görülmüştür [26].

2.5.2. Meme kanser genetiği

2.5.2.1. Onkogenler

Hücresinin büyümesini ve gelişimini etkileyen genetik değişiklikler sonucu çok adımlı bir sürecin ardından, meme kanseri ve diğer maligniteler ortaya çıkabilir. Germ hücrelerinde genetik değişiklikler ile meydana gelen maligniteler, kalıtsal özellik taşır ve daha az bir sıklıkla ortaya çıkar. Daha sık genetik değişimler kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenir.

Onkogenler, genomdaki kalıtsal veya kalıtsal olmayan değişikliklerin ve belli hücre genleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Onkogenler normal işleve sahip proto-onkogen gen grubundan türevlenir. Proto-onkogenler hücrenin normal büyümesi ve diferansiyasyonu olmasından sorumlu

proteinlere ait bilgileri içerir. Bu genlerde mutasyon sonucu oluşan hasar, genin tüm ürünlerinin yapısında değişime neden olur, hücre bölünmesi kontrolsüzleşir ve ortaya malignite çıkar.

Tümör baskılayıcı genler, kanser oluşumunda önemli olan ikinci bir gen grubudur. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler kanserogeneizde birbiriyle zıt etki göstermektedir. Tümör baskılayıcı genler hücrelerin büyümesinden sorumlu genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerken onkogenler malignitelere sebep olur. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen hasar, hücrelerde büyüme kontrolünü bozar ve bu hücrelerde kanser oluşur.

Onkogenlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler, kanser oluşumuna katılımlarında ki hipotezlerden birini oluşturur. Diğer hipotez ise onların yapısında oluşan değişikliklerdir. Onkogenler hücre yüzeyi (büyüme faktörü reseptörleri), hücre dışı (büyüme faktörleri), nükleer ya da sitoplazmik (sinyal iletici moleküller) olarak sınıflandırılabilir.

Gen delesyonu, nokta mutasyonu, gen amplifikasyonu (gen çoğalması), insersiyon, kromozomlarda yeni düzenlemeler gibi değişiklikler onkogenlerde sıralanabilir. Sadece bir bazın değişmesiyle (nokta mutasyon) proto-onkogenler onkogene dönüşebilir. Oluşan onkogenin ürünü olan onkoproteinler, somatik hücrelerde hücre gelişimini ve bölünmesini uyararak kansere neden olur. Proto-onkogenlerin aktivasyonunu etkileyen mekanizmalardan biri kromozomlarda oluşan yapısal mutasyonlardır. Bir kromozomun aynı yerinde translokasyon veya kırık oluşması bir kanser türü için spesifiktir. Onkogene ait DNA parçasının çok fazla replike olması gen amplifikasyonunu ifade eder. Bu durum normal hücrelerde çok nadir ya da hiç görünmezken kanser hücrelerinde sık gerçekleşir. Proto- onkogenlede bazı genlerin fazla amplifikasyonu o gen ürünlerinin de örneğin onkoproteinler ve m-RNA aşırı ekspresyonuna yol açar. Onkoproteinler anormal işlev görür veya normal işlevlerini tamamen kaybeder. Tümör gelişiminin ve ilerlemesinin, gen amplifikasyonu ile yakın ilişkili olduğu anlaşılmıştır. CerbB-2(Her2-neu) onkogeninin amplifikasyonu meme kanserinde görülen bir örnektir.

Proto-onkogenlerin onkogen olarak faaliyet göstermesine sebep olan bir diğer mutageniz olayı insersiyondur. Bazen retrovirüslerin küçük genom parçaları onkogenlerin sonuna kaynaştığı zaman promotör etki yapar. Bu durum *c-myc* protoonkogeni için bildirilmiştir [27].

2.5.2.2. Meme kanserinde etkili olan onkogenler

Büyüme faktörleri: Endokrin hormonlar, tümör hücresinden ve komşu hücrelerden salgılanan faktörler, büyüme faktörü olabilir. Tümör hücrelerinin hem büyüme faktörleri hem de o faktörlere has reseptörlerinin salgıyıyor olması, onların otokrin büyümesine ve daha agresif davranmasına neden olur.

Büyüme faktörü reseptörleri: Hücre dışı, hücre içi (intrasitoplazmik) ve transmembran parçadan oluşan kendilerine spesifik olan büyüme faktörlerini bağlayarak intrasitoplazmik bölgeleri genelde tirozin kinaz aktivitesiyle dışarıdan aldıkları sinyali, sinyal iletilici moleküller aracılığıyla nükleusa iletir. Onkogenik hale gelmiş reseptörlere (mutant reseptör) büyüme faktörü bağlanmasına gerek kalmadan sürekli aktivasyon oluşturulur ve aralarında mitojenik sinyaller kesintisiz iletilir. [14].

EGFR ailesi: Tirozin kinaz aktivitesine sahip membran reseptörleridir (EGFR, HER2, HER3 ve HER4). Bu faktörler transfosforilasyon sonucu bazı etkileşimler ile heterodimerler oluşturur ve farklı proteinlerin aktivasyonunu düzenler. EGF reseptöre bağlanarak reseptör uyarılır ve EGF hücrenin içine alınır. EGFR otofosforilasyonla diğer substratların fosforilasyonuna yol açarak nükleusta transkripsiyon faktörlerin aktif duruma gelmesini sağlar ve hücre bölünmesini uyarır. Sinyalin membranından nükleusa doğru iletilmesini *ras*, ve *src* gibi proto-onkogenler sağlar. Birçok karsinomda EGFR gen amplifikasyonun kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hormona bağımsız ve bağımlı meme kanseri hücre soylarına bakıldığında yüksek EGFR düzeyleri ve ER (östrojen reseptörü) yokluğu gözlenmiştir. Meme kanserlerinde EGFR'nin artmış amplifikasyon bulgularına karşılık herhangi bir mutasyon bildirilmemiştir [27].

HER-2/Neu: CerbB-2 ya da p185 olarak bilinen bu onkogenin protein ürünü hücre bölünmesi ve farklılaşmasına katılır. CerbB-2 onkoproteini plazma membranında bulunan bir membran reseptörüdür. Meme kanseri araştırmalarında ve tedavisinde en yoğun çalışılan bir onkogendir. Tümör şiddeti ve onkogenin kopya sayısı arasında doğru orantı olduğu saptanmıştır [27].

Sinyal iletilici moleküller: Büyüme faktörleri reseptörel aracılığıyla ve kompleks sinyal iletim mekanizmalarıyla proliferasyon sinyalini nükleusa iletir. Onkogen olma özelliğini taşıyan ve en sık rastlanan molekül *ras* molekülüdür. Bu molekülü inaktif durumda GDP, aktif durumda GTP bağlar. Sinyal nükleusa iletilince defosforile olarak hemen inaktif duruma geçer.

Malignitelere mutasyon geçirmiş *ras* geni sınırsız ve tekrarlayan proliferasyon sinyallerine neden olmaktadır [14].

Nükleer Transkripsiyon Faktörleri – *myc* ve *Ras*: Translokasyon ya da amplifikasyon ile *myc* geni mutasyona uğrar. *myc* molekülü sentezlendikten hemen sonra nükleusa taşınır. *max* molekülü ile taşınma sırasında ve nükleusta heterodimer oluşturur. *myc-max* heterodimerler transkripsiyon aktivatörüdür. Bu nedenle *myc-max* bağlanmasını inhibe eden mutasyonlar onkogenik aktiviteyi azaltmaktadır. *Mad* başka bir regülatör proteindir ve *max*'a bağlanarak *max-mad* heterodimerleri oluşturan bir diğer transkripsiyon baskılayıcısıdır. Yani transkripsiyon aktivasyonu sadece *c-myc*'e bağlı değil, aynı zamanda *max* ve *mad* proteinlerinin miktarına ve varlığına da bağlıdır. Bir diğer önemli konu olan *myc* molekülü, sadece hücre büyümesini kontrol eden bir molekülle değil, aynı zamanda apoptoz ile de ilişkilidir. Büyüme faktörlerinin ve hormonların (yaşam sinyallerinin) yetersiz kaldığı ya da olmadığı durumlarda *myc* aktive olur ve hücreyi apoptoz ile ölüme tetikler. Sadece onkogenik *myc* ekspresyonu meme karsinogenezi için yeterli olabilir. Hatta *myc*'in kemoterapiye dirençten veya hormona yanıt vermemesinden sorumlu olduğu ileri sürülür. Meme kanserindeki en sık rastlanan genetik değişikliklerden biri *c-myc* gen amplifikasyonudur. Meme kanserlerinden 1/3'i bu genetik değişikliği taşır. *C-myc* gen amplifikasyonu kolon, meme, akciğer kanserinde görülür. L- *myc* ve N-*myc* genleri ise küçük hücreli akciğer ve nöroblastom kanserlerinde amplifiye olur [14].

***Ras*:** Bu genin onkogenik özellik kazanması gen ekspresyonunun artışıyla veya nokta mutasyonuyla olur. *Ras* proteinleri, büyüme faktörü reseptörlerinin sitoplazmik kısmına yakın bölgeye yerleşir. Guanozin nükleosidlerinin bağlama yeteneği olduğu için GTP ile aktif hale gelip diğer protein kinazlara sinyal iletimini gerçekleştirerek hücre bölünmesinin aktifleşmesinde rol alır [27].

Hücre siklus regülatörleri: Sikline bağımlı kinazlar (CDK), sikline bağımlı kinazlar inhibitörleri (CDKI) ve siklinler hücre döngüsünü doğrudan kontrol eden proteinlerdir. Amplifiye siklinler onkogen gibi davranabilirken, CDKI'de tümör baskılayıcı gibi davranma olasılığı yüksektir. Aktif CDK'lar Rb (retinoblastoma) ve bazı nükleer proteinleri fosforilleyerek hücrenin G0 fazından mitoz girmesini sağlar. Siklinler CDK'ların işlevlerini düzenler. Silkin E ve siklin D1 ekspresyonlarındaki aşırı artış hücre siklusunun kontrolünün kalkmasına yol açar. CDK ve siklinlerin regülasyonundaki mutasyonlar hücre proliferasyonuna

sebepe olacaktır. Örneğin; invazif meme kanserlerinin ortaya çıkması, siklin D'in ekspresyonunda yaklaşık %20-30 oranında artışa sebep olur [27].

Steroid reseptörleri: Progesteron (PR) ve östrojen reseptörleri (ER) gen regülasyonunda görev alan reseptörlerdir. ER ve PR izoformlarının dimerizasyon çeşitliliği, substratın bağlanma özgülüğündeki değişikliğe sebep olarak meme kanserinde, hedef genin farklı şekilde düzenlenmesine neden olabilir. ER veya PR'nin analizi her zaman olmasa da iyi prognoz olarak kabul edilir ve antihormonal terapiye cevap verir. Ancak %60'dan fazla olan meme kanserleri ER pozitif olmasına rağmen bu oranın yaklaşık üçte biri hormonal tedaviye cevap vermez. ER ve PR'nin aktivasyonu, hormona bağımlı meme kanserlerinde normale göre daha fazladır. Reseptör kontrolündeki bir proteinin etkisi, reseptörde bir mutasyon veya reseptör izoformlarının farklı seçimi, hormonda bağımsız olan meme kanserlerine neden olabilir. ER ve PR tümör baskılayıcı gen veya onkogen olarak sınıflandırılmaz ancak meme kanserinin başlangıcında ve aynı zamanda ilerlemesinde aracı rol oynadıklarından kanser genleri gibi düşünülebilir [27].

2.5.2.3. Tümör baskılayıcı genler

Onkogenler aktive olan proto-onkogenlerdir. Aktif durumda onkogenler, hücre proliferasyonunu indükler. Hücre proliferasyonunu engelleyen tümör baskılayıcı genlerdir. Aslında baskılayıcı genlerin ana fizyolojik rolü tümör oluşumunu engellemek değil, normal hücre proliferasyonunu durdurmaktır. [14].

Hücre yüzey reseptörleri: Büyümeyle inhibe eden faktörlerin reseptörleri TGF- β olduğu düşünülürken hücrelerarası ilişkiyi belirleyen adezyon molekülleri ise kadherinler olabilir. TGF- β 'nin reseptörlerine bağlanması ile siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) uyarılır ve büyümeyle engelleyici gen ürünleri sentezlenir. Bazı kolon ya da pankreatik tümörlerinde TGF- β normal olduğu halde büyümenin engellenmediği anlaşılmıştır. Bunun nedeni TGF- β reseptörlerinin mutant veya inaktive olduğu gösterilmiştir. Kadherinler Epitelyal hücre adhezyonunda görev alır. Bu moleküllerin olmaması hücrenin metastazını ve lokal invazyonunu kolaylaştırır.

Sinyal iletimi ile ilgili genler: NF-1 ve APC genleri burada yer alır. Sitoplazmadan nukleusa geçen APC gen ürünü, hücre bölünmesine neden olan β -katenine bağlanarak onu parçalar. β -katenin düzeyinin artması ve hücrenin proliferasyonu olması, APC gen inaktivasyonuna bağlıdır. *Ras*

proteininin sinyal iletimi, NF-1gen ürünü olan nörofibromin tarafından regüle edilir. Normal proliferasyonda inaktif ras GDP'yi, aktive olunca GTP'yi bağlayarak sinyalin nukleusa iletilmesinde görev alır ve hemen defosforile olur. Nörofibromin, aktif olan ras molekülünün inaktif hale geçmesinde önemli rol oynar. NF-1 tümör baskılayıcı gen ürününün yokluğunda ras molekülü aktif halde kalacak ve anormal proliferasyona yol açacaktır.

Transkripsiyonu ve hücre siklusunu regüle eden nükleer tümör baskılayıcılar: p53, Rb, BRCA-1 ve 2, Wilms tümör baskılayıcı geni gibi önemli tümör baskılayıcı gen ürünleri nükleer yerleşimlidir.

Rb geni: Her hücre tipinde mutlaka eksprese olur. Aktif hali az fosfor taşır. E2F ailesinde olan transkripsiyon faktörlerini bağlar ve mitozu engeller. Siklin ve CDK komplekslerinden fosfor alarak hiperfosforile olur. Bu durum Rb molekülünü inaktife eder ve E2F faktörlerini bağlayamaz. Açığa çıkan E2F transkripsiyon faktörleri hücrenin G1 fazından S fazına geçmesini sağlar. Bir kez S fazına giren hücre, büyüme faktörü stimülasyonu olmasa da bölünmeye devam eder. M fazında, Rb molekülünden fosfor alınır ve Rb defosforile olarak aktif az fosforile haline geçer. Somatik Rb mutasyonları: meme, akciğer, küçük hücreli kanserleri ve mesane kanserleri olarak bildirilmiştir.

p53: Tümör, baskılayıcı genler arasında en sık değişikliğe uğrayandır. Genetik olarak hasar görmüş hücrelerin çoğalmasını engellemek bu genin görevlerinden biridir. Transkripsiyonu uyaran ya da engelleyen hücre proliferasyonu ile ilgili pek çok genin promotor bölgelerine yerleşir ve onları kontrol eder. Rb geninden farkı, her hücre proliferasyonunda görev almamaktır. Sadece acil durumlarda bunlardan UV, mutajenik kimyasallar, radyasyon gibi faktörler DNA'da hasar oluşturur ya da hipokside görev başına geçer. Bu gibi durumlarda p53 proteini hücre içinde birikir ve ilgili hücreyi siklusunun G1 fazında durdurur ve DNA hasarı ortadan kalkana kadar etkin kalır. Aynı zamanda DNA hasarı onarılmamış hücrelerde p53 molekülü, apoptoz genlerinden *bax* molekülünü uyarır ve DNA'sı onarılmamış hücreyi apoptoza tetikler. p53 allellerinden herhangi birinde bir mutasyon olması veya kaybolması durumunda, p53 proteini hücrede birikse de hasarlı DNA taşıyan hücre proliferasyona devam edecektir. p53 molekülünün inaktivasyonu için mutasyon şart değildir. Örneğin: Adenovirüs E1B proteini p53 molekülüne bağlanarak onu engeller veya HPV E6 proteini p53 proteininin molekülünü yıkarak proliferasyon engelleyici fonksiyonunu ortadan kaldırır.

BRCA1 ve BRCA2: Her iki gen ürünü de nükleusta yer alır. Görevleri ise transkripsiyonda regülatör olarak yer almaktır. Rad 51 proteini bu genlerin ürünüdür ve çift sarmal DNA'ya radyasyon sonrası tamirinin regülasyonunda görev alan bir genle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. BRCA1 gen mutasyonu taşıyan kişilerde meme kanserine yakalanma riski %60 olup; prostat, over ve kolon kanserine yakalanma riskleri de yüksektir. BRCA2 mutasyonu taşıyan kişilerde de kansere yakalanma riskleri yüksektir [14].

2.5.3. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması

Meme epitelyal hücrelerinin gelişim hiyerarşisinde ilk önce meme kök hücresinden multipotent erken progenitörler oluşur, onlardan sonra myoepitelyal ve luminal progenitörler gelişir. Asimetrik bölünmeler sonunda luminal progenitörlerden diferansiye alveolar ve luminal hücreler, myoepitelyal progenitörlerden ise diferansiye myoepitelyal hücreler gelişir. Bu gelişim hiyerarşisinin herhangi bir aşamasında meydana gelen karsinogenez mekanizmalar, sonunda farklı türlerde kanserlerin ortaya çıkmasına neden olur. Normal kök hücrelerden gelişen ve ortaya çıkan tümörler heterojen yapıya sahiptir ve metastatik potansiyelleri daha yüksektir. Progenitörlerin mutasyonundan oluşan tümörler daha homojen yapıdadır ve daha az metastaz olasılıkları vardır.

Gen ekspresyonu çalışmalarıyla belirlenen ve meme kanserinde prognostik önem taşıyan 4 moleküler alt tipi vardır: luminal A, luminal B, HER-2-pozitif ve üçlü negatif (Triple negatif-TN). Üçlü negatifler alt tipi bazal benzeri, klaudin^{düşük} ve normal benzeri gibi tiplere ayrılır (Tablo 2.2.) [28].

Tablo 2.2: Meme kanserinde moleküler sınıflama özellikleri ve görülme yüzdeleri [28].

	Luminal A	Luminal B	HER-2 Pozitif	Bazal Benzeri	Klaudin ^{düşük}	Normal Benzeri
ER	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
ve/veya PR	Yüksek ER ekspresyonu	Orta ER ekspresyonu				
ER-2	(-)	(- /+) HER-2	(+)	(-)	(-)	(-)
Özellik	Düşük Ki 67 ≤ %14, GATA-3,CK8/18 yüksek,p53 Mut.%13	Yüksek Ki 67 > %14 p53 Mut.%40	HER-2 ve HER-3 (+) p53 Mut.%71	CK5/6(+) EGFR (+) p53 Mut.%80, BRCA Mut.sık	Klaudin 3,4,7 ve E-Cadherin düşük CD44+/CD24- /düşük ve Kök Hücre benzeri	Yağ dokusu belirteçleri,Lipoprotein,Lipaz, İntegrin Alfa 7,p53 Mut.%33
Meme Kanseri %	%30	%20	%15-20	%10-25	%5-7	%7

EGFR,epidermal growth factor receptor; ER,estrogen receptor ;HER-2,human epidermal growth factor receptor 2, PR, progesterone receptor

2.6. APOPTOZİS

2.6.1. Apoptozis ve Tarihi

Apoptozis: Genetik olarak kontrol edilen, biyolojik görevini tamamlamış, organizmanın ihtiyaç duymadığı veya hasarlı hücrelerin kaldırılmasını sağlayan programlı hücre ölümüdür [29]. Gelişmiş yüksek yapılı organizmalarda hücre ölümü iki çeşit olur: nekroz ve apoptozis. Apoptozis fizyolojik ve patolojik durumlarda ortaya çıkar ve hücreleri tek tek etkiler. Genelde inflamasyon etkili değildir [30].

Apoptozis kelimesi Yunancadan apo (= ayır) ve ptosis (= düşen) kelimelerinden oluşmuştur ve sonbaharda yaprak dökümü anlamını taşımaktadır. İlk 1842 yılında Vogt hücrelerin normal gelişimi sırasında meydana gelen ölüm diye tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü kavramı da ilk kez 1965 yılında kullanılmışken apoptozis ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, normal fizyolojik şekilde ölen hücrelerin çekirdeklerinde, yoğunlaşmış kromatin ve organellerin iyi korunduğunu gözlemlemiştir. Olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Apoptozis tümörlerde sık görülen bir olaydır. Hücre kaybını azaltmak ve apoptozise direnç göstermek tümöre avantaj sağlar. Yeniden yapım ve yıkım (doku homeostazisi), apoptozis/proliferasyon olaylarının dengeli bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır [31].

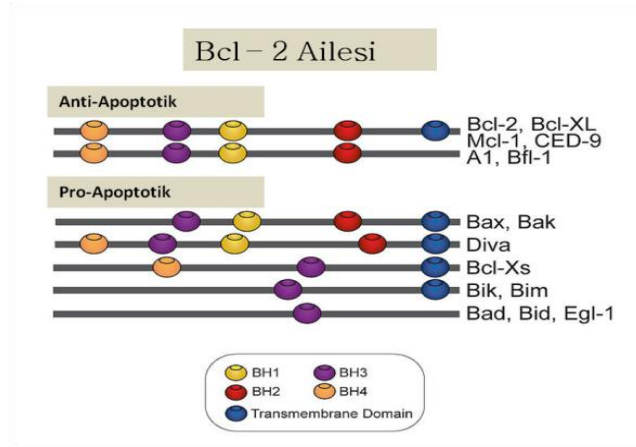
Çevreden gelen uyarılara yanıt olarak hücreler önce oluşan DNA hasarlarını onarmaya çalışır ve onarılamaması durumunda apoptozis sürecine girer. Böylece hasarlı hücrelerin çoğalması engellenerek tümör oluşumu gibi anormal gelişimlerin önüne geçilir [32].

Ökaryotik yapıda olan hücreler doğarlar, belirli bir süre yaşadıkdan sonra ölürlür. Yaşam süreleri hücre tipine bağlıdır. Örneğin derinin epidermal hücreleri 20–25 gün yaşadıkdan sonra ölür. Bağırsak hücrelerinin 3–5 günlük bir yaşam süreleri vardır. Daha uzun yaşayan hücreler de vardır: Örneğin nöronlar veya kalp kası hücreleri ömür boyu yaşarlar. Yaşam siklusunu tamamlayan hücreler önceden programlanmış bir şekilde ölür. Bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır [33].

Hücre ölümü tesadüf olarak gerçekleşirse bu süreç kontrolsüz hücre parçalanması ve ardından inflamatuvar yanıtla sonuçlanır. Bu şekildeki tesadüfi hücre ölümü “nekroz” olarak adlandırılır. Apoptotik hücre ölümü ise nekrozdan farklı bir ölüm modu olup, nükleer kondensasyon ve nükleer fragmentasyon ile karakterizedir. Bazı hücrelerde apoptozis sürecinde apoptotik cisimler de oluşur. Apoptozis sürecinde inflamatuvar yanıt oluşmaz çünkü apoptotik hücreler ya da cisimler, makrofajlar ya da dendritik hücreler gibi fagositik hücreler tarafından yok edilirler [34]. Bu hücre ölümünün kontrolündeki anormallikler, kanser, otoimmün hastalıklar ve dejeneratif hastalıkların oluşumuna neden olur [35].

2.6.2. Apoptozisin İndüklenmesi

Apoptozisin başlaması için hücre içi ya da dışından gelen bir uyarı ile ilgili genetik mekanizmanın aktif olması gerekmektedir. Hücre içi kalsiyum miktarında artış, sitokinler, DNA hasarı ile aktive olan tümör baskılayıcı gen p53, viral/bakteriyel infeksiyonlar, hücresel stres ve onkojenler hücre içi uyarılar arasında sıralanabilir. Hücre dışı uyarılar ise; tümör nekrosis faktör, hücre ölüm proteinleri, koloni uyarıcı faktörler, insülin benzeri büyüme faktörü, nöron büyüme faktörü, interlökinler, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, sfingolipidler, virüsler ve çeşitli antijenlerdir. Bu faktörlerle birlikte apoptozisi uyarıya ya da düzenleyen çok sayıda gen bulunmaktadır. Apoptozis sürecinde düzenleyici faktör görevini alan ve önemli olan Bcl-2 ailesi üyeleridir. Bcl-2 proteinleri ikiye ayrılır: anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) ve endoplazmik retikulum. Bunlar mitokondri veya çekirdek membranda bulunur. Diğer grup ise pro-apoptotiktir (Bax, Bcl-X, Bad, Bim, Bak, Bid) (Şekil.2.3).



Şekil 2.3: Bcl – 2 Ailesi (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bcl-2_Family.jpg).

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler kendi aralarında homo ya da heterodimerler oluştururlar. Hücrenin akıbetini belirleyen bu üyelerin rölatif oranıdır. Pro-apoptotik proteinler fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozise daha yatkın, anti-apoptotik proteinler daha fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozise daha dirençli olmaktadır.

Pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri hücrel hasar ya da stresin algılayıcıları olarak genellikle sitozolde bulunmakta ve hücrel stres sonucu, anti-apoptotik proteinlerin bulunduğu mitokondri yüzeyine doğru yer değiştirmektedirler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin normal işlevlerini bozar ve mitokondride porların oluşumuna, sitokrom c ve diğer pro-apoptotik moleküllerin zarlar arası bölgeden açığa çıkmasına neden olabilir. Bu da apoptozom oluşumu ve kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açmaktadır [36].

Kaspazlar hedef proteinleri spesifik aspartat kalıntılarında kıran sistein proteaz ailesidir [37]. Memeli hücrelerinde 14 adet kaspaz ailesi tanımlanmıştır. Bunlar zimojen (inaktif öncül) olarak bir pro-domain ve proteaz domaini içerirler [38].

Dışsal veya içsel uyarıcı faktörlerle aktif olan kaspazlar mitokondri membranında hasar oluşmasına neden olurken hücre iskeletinde ve çekirdekte hasarlar oluşur. Bazı kaspazlar (2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinir, bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinmektedir. Ölüm sinyalleri, başlatıcı kaspazlardan efektör kaspazlara iletir ve apoptotik hücre morfolojisi meydana gelir [39].

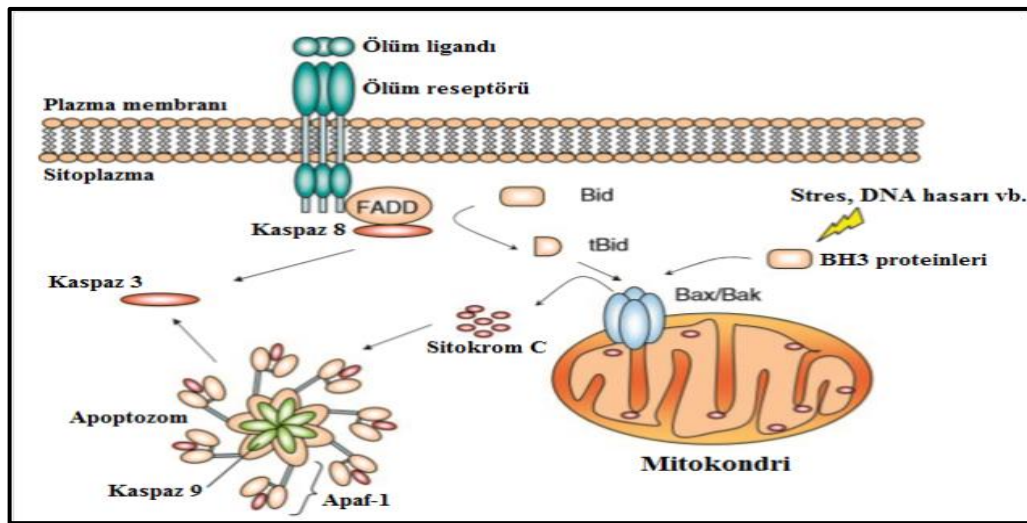
2.6.3. Apoptozisin Mekanizmaları

Apoptozisin indüklenmesinde üç sinyal yolak bilinmektedir:

1. Ekstrinsik (dışsal) yolak- Hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile başlatmak.
2. İntersik (içsel) yolak. -Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis.
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis.

2.6.3.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yolak

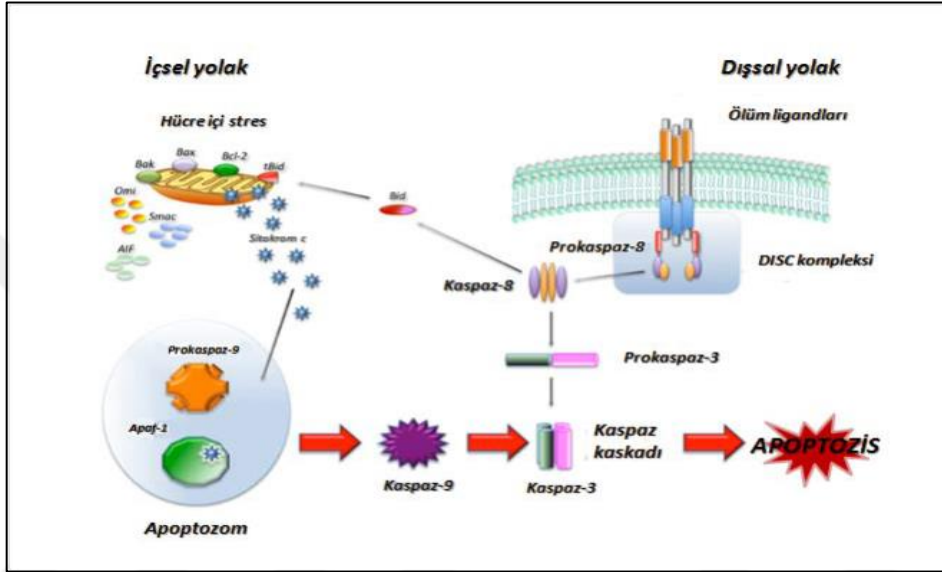
Hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar ekstrinsik yolağını aktifleştirir. Apoptotik sinyalin iletimi için ölüm reseptörlerinde gerekli olan 80 aminoasit uzunluğunda intraselüler ölüm domaini (Death Domain, DD) bulunur. Fas (CD95/Apo-1), TRAIL-R1 (DR4), TNFR1 ve TRAIL-R2 (DR5/Killer/TRICK2) en sık çalışan ölüm reseptörleridir. Reseptör ligand etkileşiminden sonra adaptör molekülü olan Fas ile ilişkili ölüm domain proteini (Fas Associated Death Domain, FADD) bağlanır. Bu etkileşim kaspaz-8'in bağlanmasına yol açar ve ölüm indükleyici sinyal kompleksini (Death Inducing Signaling Complex, DISC) oluşturur. Bu durum kaspaz-8'in dimerizasyonuna ve aktivasyonuna yol açar. Kaspaz-8, kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi kırar ve aktifleştirir [40]. Kaspaz-8 ayrıca Bid'i de kırabilir. Kırılmış Bid (tBid) sonrasında mitokondriye geçer ve kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olacak sitokrom c salınımını uyarır (Şekil 2.4.) [41].



Şekil 2.4: Kaspaz aktivasyon yolları (<https://www.nature.com/articles/>).

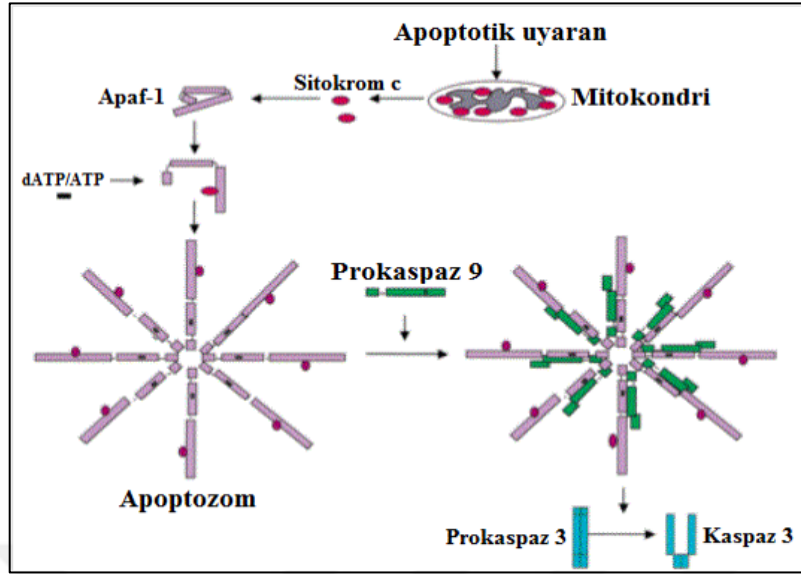
2.6.3.2. İntersik Yolak

İçsel (intrinsik)/mitokondriyal yolak ise; uyarıldığında mitokondriden sitokrom-c salınımına ve böylece ölüm sinyaline sebep olur. Her iki yolak da düzenleyici ve yapısal molekülleri kıran ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne sebep olan kaspaz denilen proteaz kaskadının aktivasyonunu içeren ortak bir yolda birleşir (Şekil 2.5.) [42].



Şekil 2.5: İçsel ve dışsal yol mekanizmaları kaspaz-bağımlı apoptozisin indüklenmesi [43].

Mitokondriyal yolun kilit olayı mitokondri dış membran permeabilizasyonudur (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP). Permeabilizasyon sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz D gibi mitokondri membran proteinleri sitozole salınır. Mitokondri iç membran yüzeyinden sitokrom c'nin sitozole salınması ile sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)'e bağlanır ve onu aktive eder. dATP/ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi heptamerik bir yapıya oligomerize olur. Bu yapının oluşması, prokaspaz-9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılar ve böylece apoptozom kompleksi oluşur (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6: Apoptotik uyarı sonucu apoptozom şikillenmesi
(<http://www3.uah.es/daviddiaz/Apoptosis/caspasas.htm>)

Başlatıcı kaspaz olarak bilinen kaspaz-9 apoptozom tarafından aktifleşir. Aktif duruma gelen kaspaz-9; kaspaz-3'ü veya diğer ilerletici kaspazları aktifleştirerek kaspaz kaskadını başlatır. Bir diğer durum ise kaspazlardan bağımsız olan ve apoptozise neden olan mekanizmaların olduğudur. Bu mekanizmada mitokondriden salınıp apoptoz indükleyici faktör (AIF) nükleusa geçer ve nükleazları aktifleştirerek DNA hasarına yol açar. Kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise neden olan AIF, granzim B, steroidler, ve endonükleaz G bulunmaktadır [43].

2.6.3.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması

ER membranında lokalize olan kaspaz-12 aracılı bir yolaktır. Son çalışmalara göre kalpainin ve Ca iyonlarındaki artış prokaspaz-12 aktifleştirir. Aktif olan kaspaz-12 kaspaz-9 ile etkileşir ve sitozolik kaspaz kaskadını aktifleştirir [44].

2.6.4. Apoptozisin Genetik Kontrolü

Hücrelerin normal büyümesini ve gelişmesini düzenleyen genler protoonkogenlerdir. Mutasyon geçiren protoonkogenler onkogenlere dönüşür. Onkogenler, hücrelerin aşırı proliferasyonuna uyarımı gerçekleştirir. Tümör baskılayıcı genler hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genlerdir. c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinen genler apoptozisi düzenleyen genlerdir ve kodladıkları proteinler de aynı adı almaktadır [45].

p-53 tümörü, baskılayıcı bir genidir. Serbest radikal ve hipoksi oluşumu p-53 genini aktifleştirir, p-53 protein aracılı DNA onarımı başlatır. DNA hasarı oluştuğunda, S fazını geçici olarak bloke eder. DNA tamiri için zaman kazanılır, eğer tamir mümkün değilse hasarlanmış hücreler apoptozise yönelir.

c-myc proteini bir transkripsiyon düzenleyici faktördür. Bazı faktörlerin ortamda bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ve apoptozise uğramasına neden olur. C-myc protoonkogeni hücrenin büyümesini programlar. Hücrede c-myc ve uygun büyüme faktörleri bulunmuyorsa büyüme durur, eğer her ikisi de yeterli ise hücre çoğalması olur ancak c-myc olduğu halde büyüme faktörleri yoksa apoptozis görülür.[46].

2.6.4.1. Antiapoptotik Proteinler

Bcl-2 ve Bcl-xl: Mitokondrinin membran geçirgenliğini koruyan apoptotik kaskadın kontrolündeki en önemli gruptur. Bunlardan bazıları hücre koruyucu (antiapoptotik) proteini, diğerleri de apoptotik aktivitenin öncüleridir (bax ve bad). Hücrenin akıbeti bu moleküllerin rölatif oranından belirlenir.

Güçlü bir ölüm inhibitörü olan Bcl-2 moleküllerin etki ettikleri lokalizasyon mitokondridir ve sitokrom-c salınımını engeller. Mitokondri membranı dışında çekirdek membranında ve endoplazmik retikulumda bulunur. Bcl-xl molekülü mitokondri membranının dışında bulunur. Bcl-2 ve Bcl-xl proteinleri, apoptozisi proapoptotik proteinler olan Bax ve Bid moleküllerini inhibe ederek engeller. Apaf-1 üzerinden Bcl-xl kaspaz aktivasyonunu önler [47,48].

2.6.4.2. Proapoptotik Proteinler

Bax, Bad ve Bid: Etkilerini sistein proteazlar olan kaspazlar üzerinde gerçekleştirir. Kaspazlar hücre ölüm yolunda aktiflenir. Bax, normal sağlıklı hücrede sitoplazmada yer alır. Apoptotik uyarı sonucu bax mitokondriye doğru yönelir ve sitokrom-c salınımına neden olur. Bad'ın normal lokalizasyonu mitokondri membranının dışıdır ve bcl-xl ile bağlıdır. Apoptozis uyarı sırasında iki molekül ayrılır. Bid, bax'ı aktiflemek için mitokondriye doğru yönelir, aynı zamanda bcl-2'yi inaktive eder [49,50].

2.6.5. Apoptozis ve Nekrozis Morfolojisi

Hücrenin çekirdeğinde oluşan kondensasyon, nükleer yoğunlaşma ve fragmentasyon apoptozisin özelliklerinden biridir. Hücrenin büzülmesi ve diğer hücrelerle etkileşimlerinin kesilmesi apoptozisin bir diğer özelliğidir. Na, K ve Cl iyonlarını taşıyan mekanizmaların çalışmaması hücrenin toplam hacminin 1/3'ünü kaybetmesine ve hücre büzülmesine neden olur. Apoptotik hücrenin mikrovillüları kaybolur ve çevre hücreleriyle bağlantısı kesilir [51]. Apoptotik uyarı alan hücrenin membranında transglutaminaz enzimi aktif olur, membran şekli bozulur ve bu hücrede tomurcuklar oluşur. Bu aşamada floresan boyalar ile DNA boncuk şeklinde gözlemlenir. Apoptoziste endonükleazlar DNA'yı internükleozomal bölgelerden 180-200 bazı çifti büyüklüğünde keser [52]. Bu agaroz, jel üzerine merdiven görüntüsü ("ladder pattern") olarak yansır [53]. Apoptozis aşaması ilerledikçe hücrenin etrafında beyaz dairemsi (halo) şeklinde bir sınır belirginleşir. Bu olay ışık mikroskopunda gözlemlenebilir.

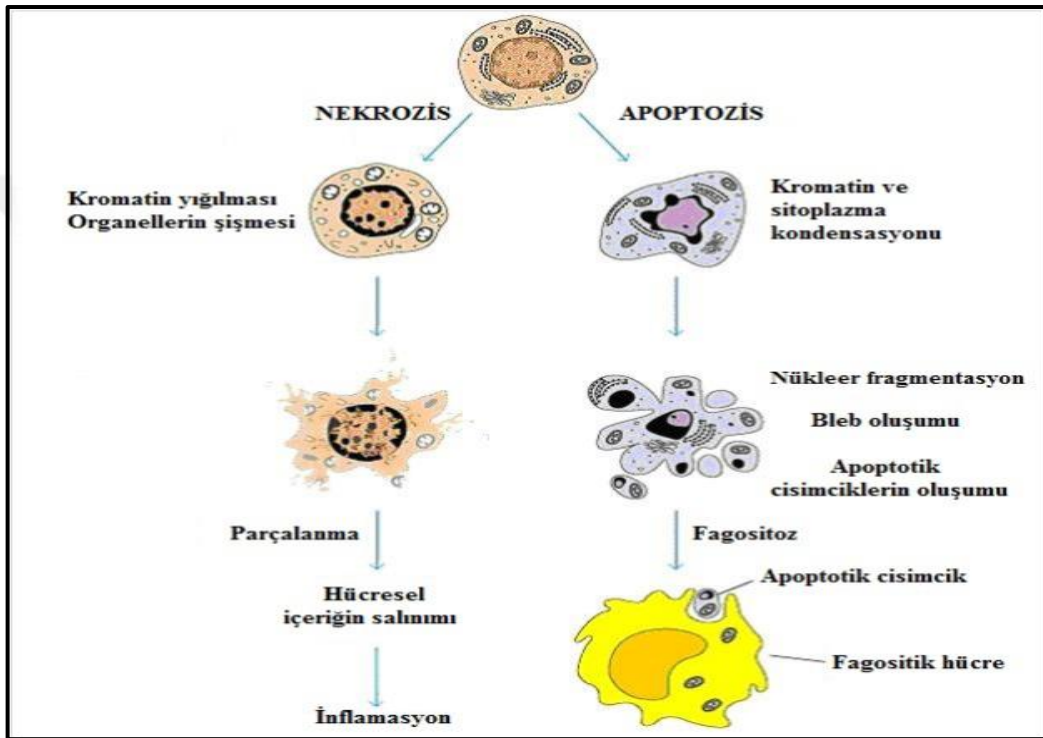
Sağlıklı hücrede yaklaşık yedi kırılma onarılırken apoptoziste 300 000 kırılma meydana gelir ve apoptozis onları onaramaz [54]. Kromatinin yoğunlaşmasından önce sitozolik Ca⁺⁺ artar ve plazma membranın iç yüzeyinde dışa doğru fosfatidilserin transloke olur [55]. Hücre parçalanmasıyla nükleer material taşıyan zarla çevrili 'apoptotik cisimcikler' oluşur ancak hücre yaşamaya devam eder. Fosfatidilserinin translokasyonu apoptotik cisimciklerin fagositozunu uyarır. Hücre iskeletine göre apoptozis yaklaşık 30 – 60 dakikada tamamlanır [56].

Piknozis, apoptozisin en karakteristik özelliğidir. Hematoksilen ve eozin boyamalarında apoptotik hücreler yuvarlak ya da oval görünümündedir, bu boyamalarda koyu eozinofilik sitoplazma ve yoğun mor nükleer kromatin fragmentleri (parçaları) gözlenir. Hücrede meydana gelen değişiklikler elektron mikroskopu ile daha iyi görüntülenir. Erken evrede, nükleer materyalin karakteristik olarak nükleer membranın altında çevresel şekilde kümelendiği görüntülenir. Hücre çekirdeğinin parçalanması (karyoreksis) süreci ve hücre parçalarının apoptotik cisimler içinde ayrılması süreçlerini takiben hücre membranında "bleb" adı verilen cepcikler oluşur.

Apoptotik cisimcikler sitoplazma ve sıkı paketlenmiş organelleri içerirken nükleer fragment içerebilir ya da içermeyebilir. Apoptotik cisimciklerde organel bütünlüğü korunur. Organeller sağlam bir plazma zarı ile çevrilidir. Daha sonra bu cisimcikler makrofajlar, parenkimal

hücreler ya da neoplastik hücreler tarafından fagosite edilir ve fagolizozomlar ile parçalanır. Apoptozis sürecinde inflamatuvar reaksiyon gerçekleşmez. Çünkü;

- apoptotik hücreler hücrel bileşenlerini hücreler arası kısma salmaz,
- kendilerini çevreleyen hücreler tarafından hızlıca fagosite edilir,
- yutulan hücreler de anti-inflamatuvar sitokin üretmez [57,58].



Şekil 2.7: Apoptozis ve nekrozisin şematik karşılaştırılması (<http://bilimvebilimadami.com/programli-hucre-olumleri-birbirlerinden-farkli-olabilir>).

2.6.6. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar

Yol açan etmenler: Nekrozis için: İskemi, hipertermi, hipoksi, şiddetli oksidatif sters, litik viral enfeksiyon; Apoptozis için: Büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, HIV, radyasyon, sitotoksik T lenfositler.

Fiziksel Farklılıklar:

1. Apoptoziste tek hücreyi etkilerken, nekrozis birden fazla grup şeklinde hücreleri etkiler.
2. Fizyolojik olmayan olaylar nekrozu başlatabilir, apoptozise fizyolojik uyarılar neden olabilir. Örneğin: hormonal dengenin bozulması.

3. Nekrotik hücreler çevreye kemotaktik maddeler salgılayarak makrofajları uyarır ve hücreler fagosite olur.
4. Apoptotik hücreler çevreye kemotaktik maddeler salgılamaz, yakınlarında bulunan epitelyum veya makrofajlar tarafından fagosite olur.
5. İnflamatuar cevap nekrozda oluşurken, apoptozda inflamatuvar cevap yoktur. [59,60].

Morfolojik Farklılıklar

1. Nekrozda zarın bütünlüğü bozulurken apoptoziste zarın tomurcuklanma oluşur ancak bütünlük bozulmaz.
2. Mitokondri ve sitoplazmada meydana gelen şişme nekrozu başlatır; apoptoziste sitoplazmada büzülme ve nukleusta kromatin yoğunlaşması olur.
3. Nekroz sonucu hücre tamamen parçalanırken vezikül formasyonu yoktur, apoptoziste apoptotik cisimler ve zara bağlı veziküller oluşur.
4. Nekroz pasif bir olaydır, yani enerjiye ihtiyaç duymaz ve +4°C'de bile gerçekleşebilir. Apoptozis, +4° C'de gerçekleşemez ve enerji gerektiren bir olaydır.
5. Nekroz sırasında DNA rastgele parçalanır, apoptoziste monooligonukleozomal parçalama gerçekleşir ve agaroz jel elektroforezide apoptozise özel “*ladder pattern*” görünür.
6. DNA fragmentasyonu nekrozda postlitik, apoptoziste de prelitiktir.
7. Apoptoziste zar asimetrisinin değişmesi sonucu, inflamatuvar reaksiyona gerek kalmadan apoptotik hücre, komşu hücreler tarafından fagosite olur. Nekrozda nonspesifik zar parçalanması olur ve orada inflamatuvar cevap oluşur [61].

2.6.7. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar

Apoptozis her türlü neoplastik oluşumda hem büyüme hem gerileme döneminde görülebilir [60]. Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apoptozis görülür. Örnek olarak hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir [62]. Bu anlamda apoptozis, spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır [59]. Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur. Apoptozisin görüldüğü başlıca olaylar şunlardır:

Fizyolojik Olaylar:

- 1 Metamorfoz ve embriyogeneze.
- 2 Hormona bağımlı değişiklikler (endometriyum yıkımı, laktasyon sonrası meme bezlerinin rejenerasyonu, menopozda folikül atrezisi).
- 3 Hücre bölünmesi sürekli olan hücre gruplarında, hücre sayısını dengelemek için hücrelerin azaltılması gerekir (barsak kripta epitelleri).
- 4 İmmun hücrelerinde – B ve T hücrelerinin sitokin azalmasından sonra; timus gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması [46].

Patolojik Olaylar:**Apoptozisin İnhibisyonu İle İlişkili Hastalıklar**

- 1 Kanser: Over kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, hormon bağımlı tümörler.
- 2 Viral infeksiyonlar: Poliovirus, Herpes virüs, Adenovirus.
- 3 Otoimmün bozukluklar

Apoptozisin Aktivasyonu İle İlişkili Hastalıklar

1. Nörodejeneratif hastalıklar: Parkinson hastalığı, Retinitis pigmentosa, Alzheimer hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz, Serebellar dejenerasyon.
2. AIDS.
3. Aplastik anemi.
4. Toksik nedenli olan karaciğer hasarı.
5. İskemik hasarlar: İnme, Myokard infarktüsü, Reperfüzyon hasarı

2.6.8. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler**2.6.8.1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri**

- Işık mikroskobu kullanımı.
- Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı.
- Elektron mikroskobu.
- Faz kontrast mikroskobu.

2.6.8.2. İmmunohistokimyasal yöntemler

- Anneksin V Yöntemi.
- TUNEL Yöntemi.
- M30 Yöntemi.
- Kaspaz-3 Yöntemi.

2.6.8.3. Biyokimyasal yöntemler

- Agaroz Jel Elektroforezi.
- Western Blotting.
- Akım Sitometri.

2.6.8.4. İmmunolojik yöntemler

- ELISA.
- Flourimetrik Yöntem.

2.6.8.5. Moleküler biyolojik yöntemler

- DNA Microarrays.

2.7. KANSER VE DOĞAL ÜRÜNLER

Hastalıklara karşı tıbbi bitkilerin kullanımı eski çağlardan bugüne süregelmektedir. Bitkilerin kullanım özellikleri ve yerel adları ilk çağlardan kalan antik Mısır papirüsleri ve Hitit yazıtlarında belirtilmiştir [63]. Kanserin tek bir nedenden kaynaklanan bir hastalık olmadığı, bu hastalığın ortaya çıkmasında birçok faktörün etkili olduğu belirtilmiş ve farklı dokularda gelişebilen bir hastalık grubu olduğu anlaşılmıştır. Kansere sebep olan nedenleri bulmak, daha başarılı ve önleyici yöntemler ile tedaviler geliştirmek adına araştırmalar devam etmektedir [64].

Çok yoğun ve maliyet gerektiren çalışmalar sonucu bilim dünyası, kanser ile ilgili önemli bilgiler edinmiştir. Günümüzde modern tıbbın yanına tamamlayıcı ve alternatif tıp dâhil edilerek kullanılabilir. Bu konuda çok çalışmalar yapılmakta ve bilim dünyasına her gün yeni bilgiler ilave edilmektedir. Özellikle bitkilerden elde edilen drogların kansere karşı farklı etki mekanizmaları olduğu gösterilmektedir.

Tıbbi bitkiler E vitamini, C vitamini ve karotenoidler, yüksek antioksidant aktivite gösteren polifenoller, quinonlar, flavonoidler, âminler, alkaloidler gibi serbest radikalleri temizleyen birçok antioksidantlara sahiptir [65,66].

Bilim insanlarının, doğal bileşiklerini hastalıklara karşı koruyucu veya tedavi edici olarak kullanabilecekleri konusunda ilgileri artmıştır. Dünya sağlık örgütü (WHO) kayıtlarına göre alternatif tıptan faydalanan insan sayısı dünya nüfusunun %70-80 dir. Yaklaşık 70. 000 tıbbi bitkinin bu amaçla kullanıldığı belirtilmiştir [67]. İlaç üretiminde Dünya Sağlık Örgütü tarafından uygun görülen bitki sayısı 21 000 dir. Modern tıba destek verebilmek amacıyla, Dünya Sağlık Meclisine üye olan ülkelerde geleneksel tedavi yöntemlerinin kullanımının yaygınlaşması ve belli bir standarda ulaştırılması için WHO tarafından “2014–2023 yılı Geleneksel Tıp Stratejileri” programı başlatılmıştır [68].

Vücutta serbest radikallerin yol açtığı hasarlardan korunmaya yönelik doğal bileşikler bilim dünyasının ilgisini çekmekte ve yeni doğal maddelerin keşfedilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir [69].

Antioksidant aktiviteye sahip kimyasallar bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmakta ve bu bileşiklerin çeşitli dejeneratif hastalıkları engellediği görülmektedir. [70]. Özellikle polifenolik fitokimyasalların (antitümör ve antioksidant) bağışıklığı düzenleyici kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir [71, 72].

İlaçlarla kıyaslandığında çoğu doğal bileşenlerin kanser inhibitör etkisi doğrudan DNA hasarına neden olmaz. Benzer şekilde doğal bileşiklerin hayatta kalan hücrelerde DNA mutasyonuna neden olma olasılığı daha düşüktür. Çoğu zaman kanser hücreleri normal hücreleri etkilemeksizin üzerinde seçici olarak hareket eder. Doğal bileşiklerin kanserle mücadelede özellikleri:

- Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi.
- Anjiyogenezin inhibisyonu ile kanser hücrelerinin yayılmasını veya kanser hücrelerini besleyen yeni kan damarlarının büyümesini önlemek.
- Kanserin büyümesini olumsuz etkileyen bir ortam yaratmak, vücutta yüksek oksijen seviyesi, yüksek metabolizma, yüksek sıcaklık, düşük şeker seviyesi ve yüksek alkali ortam oluşturmak.

- Detoksifikasyon ve vücutta daha fazla toksik maddelerin birikmesinin önlenmesi.
- Tüm hedef, organları özellikle kanserden etkilenenleri desteklemek.
- Kansere neden olan mutasyon değişikliklerin ortaya çıkmasını tetikleyen serbest radikallerle savaşmak [73].

2.8. SARIMSAK (*Allium sativum*)

2.8.1. Sistematik Sınıflandırılması

Sarımsak (*Allium sativum*) soğan türlerinin en önemlisidir. 1753 yılında İsviçreli botanikçi Carl Von Linné tarafından ilk defa bilim dünyasına tanıtılmıştır [74]. *Allium* cinsinde olan sarımsağın, *Liliaceae* familyasından olduğu tanımlanmıştır [75]. Bu konu ile ilgili son 50 yılda değişik yaklaşımlar ortaya çıkmıştır.

Önce *Allium* cinsi, *Amaryllidaceae* familyası incelenmiştir ancak son taksonomi çalışmalarına göre bu cinsin *Alliaceae* familyası altında yer alması gerektiği düşünülmüştür. [76]. Bu sınıflamaya göre sarımsak *Monocotyledones* sınıfı, *Liliiflorae* üst takımı, *Asparagales* takımı, *Alliaceae* familyası ve *Allium* cinsine bağlı bir tür olarak belirlenmiştir. Nükleer ribozomal DNA'ya göre yapılan son sınıflandırma Tablo 2.3'da gösterilmiştir [77].

Tablo 2.3: Nükleer ribozomal DNA'ya dayalı sarımsağın sınıflandırılması

1	Sınıf	<i>Liliopsida</i>
2	Altsınıf	<i>Liliidae</i>
3	Superorder	<i>Lilianae</i>
4	Order	<i>Amaryllidales</i>
5	Familya	<i>Alliaceae</i>
6	Alt Familya	<i>Allioideae</i>
7	Takım	<i>Allieae</i>
8	Cins	<i>Allium</i>

2.8.2. Taşköprü Sarımsağı

Ülkemizin florasındaki yabani soğan türlerinin zenginliği dikkate alındığında, Anadolu'da Taşköprü sarımsağı, sarımsağın anavatanı kabul edilir. Eski çağlardan beri farklı iklim, toprak ve çevre koşullarında tarımı yapılan sarımsak bitkisinin bugün çok fazla kültür çeşidi vardır. İşte bu kültür çeşitlerinden birisi de Taşköprü Sarımsağı'dır ve Taşköprü Bölgesi için tescil

edilmiş, yani markalaşmış bir sarımsak çeşididir. Taşköprü sarımsağının farkı şu açılardan ön plana çıkmaktadır:

- Taşköprü sarımsağında bulunan ve onun kokusunu veren kükürtlü uçucu yağlar ve türevleri (allipropildisülfid gibi) ülkemizde yetiştirilen bütün diğer sarımsaklara oranla daha fazladır.
- Diğer sarımsaklara göre baharat oranı, keskin kokusu ve aroması daha yüksek olduğu için konserve, turşu, baharat sanayi alanında en çok aranan çeşittir.
- Vitamin ve mineral maddeler yönünden besin değeri en zengin çeşittir.
- %33-37 oranında kuru maddeler içerdikleri için fazla ağırlık kaybına uğramaz.
- Raf ömrü uzundur. Soğuk depoya gerek kalmadan normal depoda da 10- 11 ay muhafaza edilebilir.
- Üretim zamanında iklim koşullarına toleranslıdır. Başlarının kaliteli ve iri olması onları ihracata uygun bir ürün yapmaktadır.
- Ülkemizde sarımsak çeşitlerinin arasında selenyum elementi bulunan tek çeşittir. [74].

2.8.3. *Allium sativum* özellikleri

Sarımsak çok eski yıllardan beri halk arasında tedavide kullanılmaktadır. Karakteristik lezzeti; kokusu ve biyolojik aktivitelerinin çoğu organosülfür bileşikleri içerdiğinden kaynaklanmaktadır [78]. İnsanlarda yüksek sarımsak tüketimi, çeşitli kanser türlerine karşı koruyucu bir etki ile ilişkilidir. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda tümörlerin ölüm oranındaki azalma, sarımsak ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Otsu kültür bir bitki olan sarımsak (*Allium sativum*), yaklaşık 5.000 yıldır Mısır, Yunan, Hint ve Çin uygarlıkları tarafından antibakterial, antitrombotik, antimitojenik ve antikanserogenik özellikleri nedeni ile pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır [79,80]. Ana yurdunun Orta Asya stepleri olduğu sanılmaktadır. Dünya üzerinde halen 300–400 çeşit sarımsağın yetiştiği bilinmektedir.

Sarımsakta fruktoz içeren karbonhidratlar (%26-30), bol miktarda su (% 65), kükürt bileşikleri (% 1,1-3,5), lif (% 1,5) protein (% 1,5-2,1) ve arginin gibi serbest amino asitler bulunur. Ayrıca yüksek oranda kükürt, fosfor, çinko, potasyum, orta miktarda A ve C vitaminleri, saponin ile az miktarda da kalsiyum, sodyum, magnezyum, demir ve B kompleksi vitaminler de bulunur [81]. Orta miktarda germanyum, selenyum, gibi elementler içermektedir. Organosülfür bileşiklerinin, sarımsağın aktif bileşikleri olabileceği ileri sürülmektedir. Bu bileşiklerin

biyolojik etkilerinde rol alan faktörlerin, allil grupları ve sülfür atomlarının sayısı olduğu düşünülmektedir [82]. *Allium sativum*, alliin, alliinaz, allisin, S-alil sistein (SAC), dallıdisülfid (DADS), dialiltrisülfid (DATS) ve metilaliltrisülfid gibi 100'den fazla, biyolojik olarak yararlı olan sekonder metabolit içerir [73]. Sarımsakta bulunan kimyasal bileşikler Tablo 2.4'de gösterilmiştir [83].

Tablo 2.4: Sarımsakta bulunan kimyasal bileşikleri (kCal 1,170 – 3,630/kg) [83].

Kimyasal bileşikler	Miktar(ppm)	Kimyasal bileşikler	Miktar(ppm)
1,2-dimercaptosiklopentan	2,4	Izolösin	2,170-5,208
1,2-epitiopropan	0,1 – 1,66	Lösin	3,050-7,392
1,3-ditian	0,08 - 3	Lizin	2,730-6,552
1-Heksanol	0,23	Magnezyum	240-1,210
2,5-dimetilt-tetrahidrotiofen	0,6	Manganez	5,4-15,3
2-metil-benzaldehid	0,1	Metil-allil-disülfid	6-104
2-propen-1-ol	0,1-21	Metil-allil-sülfid	0,5-4,6
2-vinil-4H-1,3-ditiin	2 - 29	Metil-allil-trisülfid	6-279
3,5-dietil-1,2,4, tritiolan	0,15 - 43	Metil-propil-disülfid	0,03-0,66
3- metil-2- siklopenten-1-tion	0,16 – 1,6	Niacin	4-17
2-vinil-4H-1,2-ditiin	0,34 – 10,65	Nikel	1,5-1,7
4-metil-5-viniltiazol	0,75	Nikotinik asid	4,8
Alanin	1,320-3,1168	P-kumarik asid	58
Allicin	1,500-27,800	Fenilalanin	1,830-4,392
Alliin	5,000-10,000	Fosfor	880-5,220
Allil-propil-disülfid	36-216	Potasyum	3,730-13,669
Aluminyum	52	Prolin	1,000-2,400
Anilin	10	Propen	0,01-6
Arginin	6,340-15,216	Propentiol	1-41
Askorbik asid	100-788	Protein	35,000-179,000
ASH	10,000-395,000	Protodegalaktotigonin	10
Aspartik asid	4,890-11,736	Protoerubosid-B	100
Beta-karoten	0,17	Quercetin	200
Biotin	22	Riboflavin	0,5-3
Boron	3-6	S-(2-karboksi-propil)glutation	92,5
Kafeik asid	20	S-allo-merkaptosistein	2
Kalsyum	180-4,947	S-allil-sistein	10
Karbohidrat	274,000-851,000	Sativosid-B-1	30
Krom	2,5-15	Skordin	250
Kobalt	0,5-100	Skordinin-A	39,000
Bakır	4,8-9,7	Skordinin-A-1	67-30,000

Tablo 2.4 (devam): Sarımsakta bulunan kimyasal bileşikleri (kCal 1,170 – 3,630/kg) [83].

Kimyasal bileşikler	Miktar(ppm)	Kimyasal bileşikler	Miktar(ppm)
Sistin	650-1,560	Skordinin-A-2	250-8,000
Diallil-disulfid	16-613	Skordinin-B	800
Diallil-sulfid	2-99	Skordinin-A-3	333
Diallil-trisulfid	10-1,061	Serin	1,900-4,560
Dimetil - Difuran	5-30	Sodyum	158-559
Dimetil -diulfid	0,6-2,5	Tiamin	2-8
Dimetil -trisulfid	0,8-19	Treonin	1,570-3,768
Yağ	2,000-12,000	Kalay	6
Ferulik asid	27	Trans-1-propenil-metil-disulfid	0,9
Lif	7,000-39,000	Trans-ajoene	268
Glutamik asid	8,050-19,320	Triptofan	660-1,584
Glisin	2,000-4,800	Tirozin	810-1,944
Histidin	1,130-2,712	Valin	2,910-6,984
Demir	15-219	Su	585,000-678,000
Izobutil-izotiosianat	0,14-25	Çinko	15,3

Alliumlarda bulunan ana organosülfürler ikiye ayrılır: suda ve yağda çözünen (Tablo 2.5).

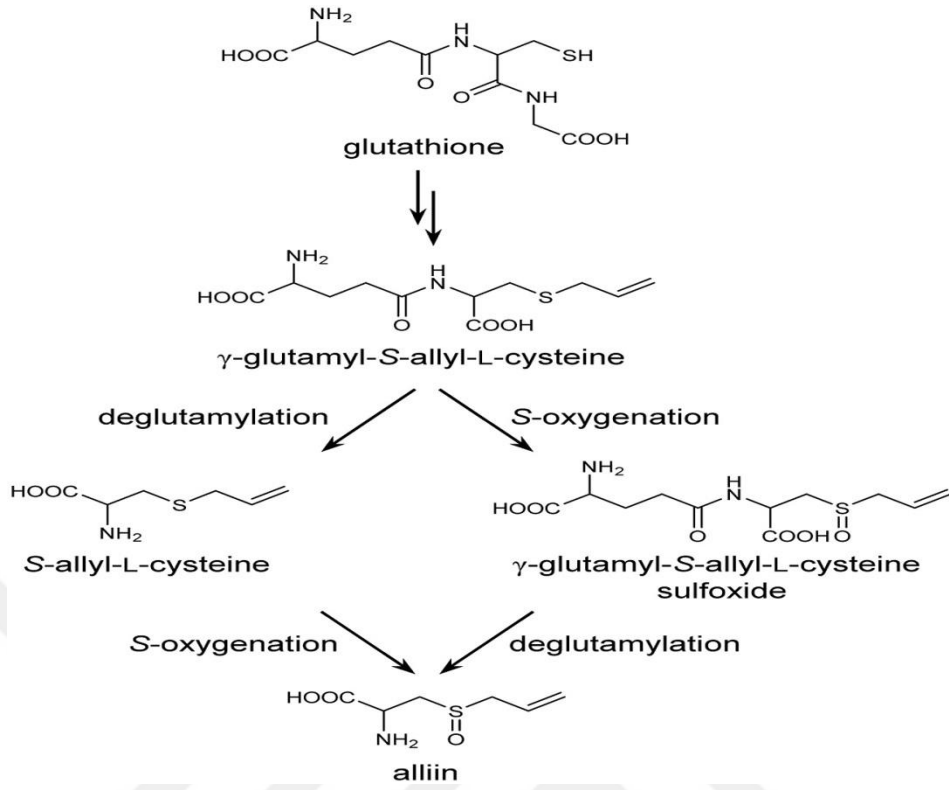
Lipofilik organosülfürlerin suda çözünenlere göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir [84].

Tablo 2.5: Sarımsakta bulunan yağda ve suda çözünen bileşikler [84].

Kimyasal yapı	Bileşik	Kısaltma
Yağda çözünen bileşikler		
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S}(\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	S - Allilsistein sulfoksid(Allin)	
$\text{CH}_3 - \text{CH} = \text{CH} - \text{S}(\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	S - Propenilsistein sulfoksid	
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S}(\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	S - Propilsistein sulfoksid	
$\text{CH}_3 - \text{S}(\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	S - Metilsistein sulfoksid	
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S}(\text{O}) - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$	Allicin	
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S}(\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$	Ajoene	
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{SO}$	Propanetial S - oksid	
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$	Diallil sulfid	DAS
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$	Diallil disulfid	DADS
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$	Diallil trisulfid	DATS
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_3$	Allilmetil sulfid	AMS
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_3$	Allilmetil disulfid	AMDS
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_3$	Allilmetil trisulfid	AMTS
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$	Dipropil sulfid	DPS
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$	Dipropil disulfid	DPDS
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$	Dipropil trisulfid	DPTS
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_3$	Propilmetil sulfid	PMS
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_3$	Propilmetil disulfid	PMDS
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_3$	Propilmetil trisulfid	PMTS
Suda çözünen bileşikler		
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	S - Allilsistein	SAC
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$	S - Allilmerkaptosistein	SAMC
$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{SH}$	Allilmerkaptan	AM

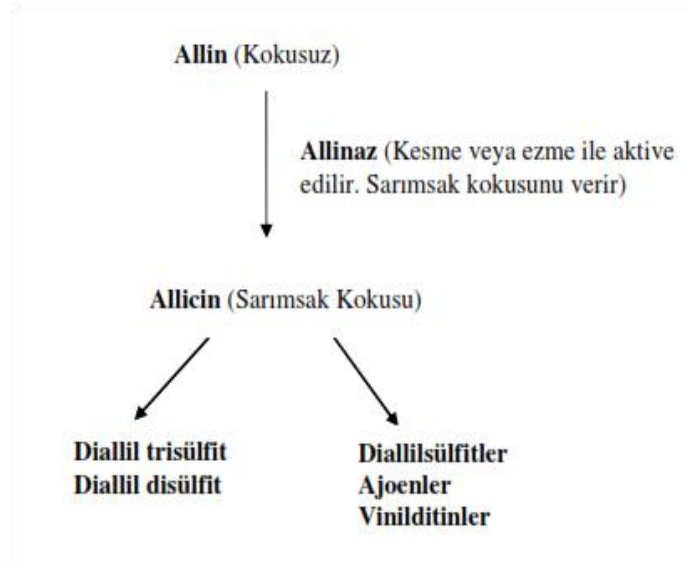
Diallil sulfid, diallil disulfid, diallil trisulfid ve diğer allil polisulfidler dâhil olmak üzere allil sulfid grubunu oluşturmaktadır ve sarımsak yağında toplam miktarları yaklaşık %94 oranında olan bileşiklerdir [85].

γ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-sisteinler intakt sarımsakta bulunan primer sülfür bileşikleridir. Hidroliz ve oksitlenme reaksiyonları sonucu S-alkil(en)yl-L-sisteine sulfokside (alliin) dönüşür (Şekil 2.8) [86].



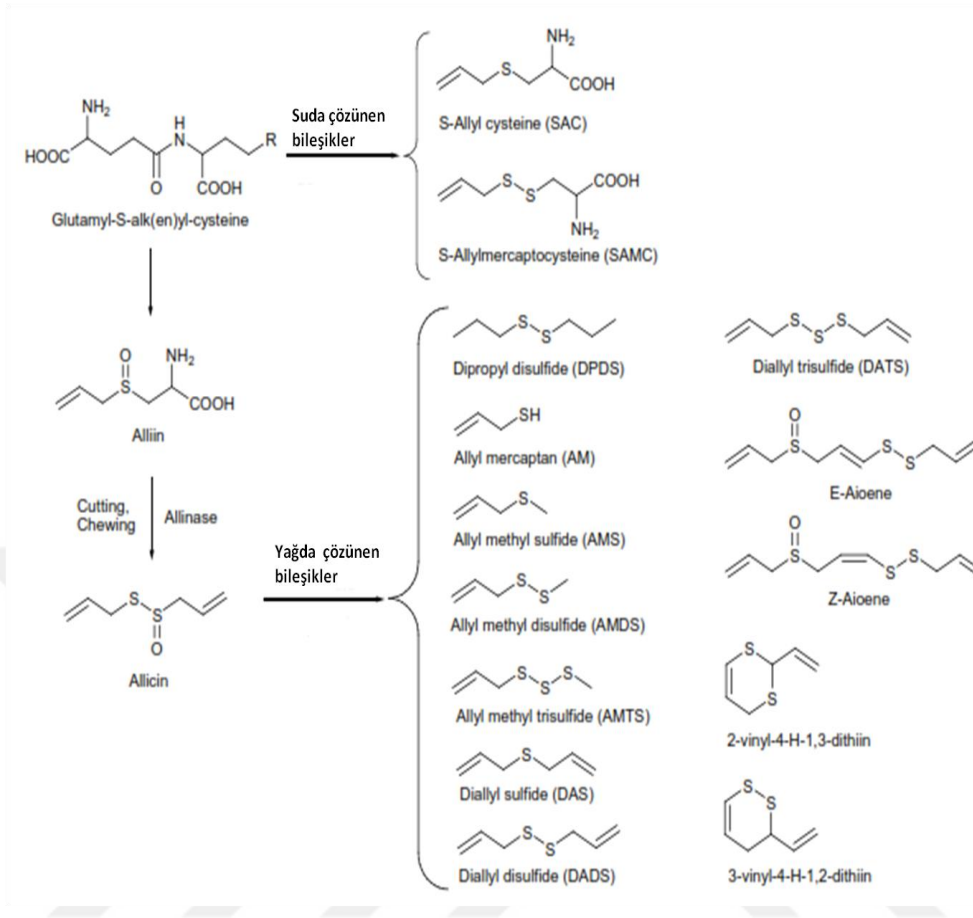
Şekil 2.8: Sarımsakta bulunan aliin için önerilen biyosentetik yol [86].

Sarımsak kesilir, parçalanır veya ezilirse, sarımsak dişlerinin etrafını saran zar parçalanır ve yapısında bulunan allinaz enzimi aktif hale gelir (Şekil 2.9) [88].



Şekil 2.9: Alliin metabolizması [88].

Bir amino asit olan alliin, enzimatik olarak sülfür bileşiklerin öncüsü olan allicine dönüştürülür. Sülfür bileşikler sarımsağın lezzeti, kendine has kokusu ve farmakolojik özelliklerinden sorumludur. Allicin oldukça kararsız bir bileşiktir ve koşullar uygunsa, dialil sülfür (DAS), dialil disülfid (DADS), dialil trisülfid (DATS), vinil ditin ve ajoeni içeren çeşitli yağda-çözünür bileşiklere dönüşür. Aynı zamanda, γ -glutamil -Salk(en)yl-L-sisteinler, S-allil sisteine (SAC) and S-allil merkaptosistein (SAMC) içeren, suda çözünür organosülfür bileşiklerine dönüştürülebilir. Suda çözünür organosülfür bileşikleri kokusuzdur ve yağda çözünür organosülfür bileşiklerine kıyasla daha az karakteristik bir lezzete sahiptir [87]. Organosülfür bileşiklerin transformasyonu Şekil 2.10' da gösterilmiştir [88].



Şekil 2.10: Sarımsakta yaygın olarak incelenen organosülfür bileşiklerinin kimyasal yapıları [88].

2.8.4. Sarımsağın Antikanserojen Aktivitesi

Sarımsağın, antikanserojenik, anti-aterosklerotik, kan lipidleri ve şeker modülasyonunda; antifungal, antimikrobiyal, antitrombotik, kardiyovasküler hastalıkların tedavi edilmesinde ve bağışıklık sisteminin uyarılmasında etkileri bulunmaktadır. Farmakolojik etkileri ve sağlığa teşvik edici faydaları Tablo 2.6'da özetlenmiştir [88].

Tablo 2.6: Sarımsağın farmakolojik etkileri ve sağlığa teşvik edici faydalarının özeti [88].

Etki mekanizması	Sağlığa etkisi
Antikarsinojenik/Antimutajenik	Hücre bölünmesini inhibe etmek, apoptozu indüklemek, DNA onarımını arttırmak, detoksifikasyon enzimlerini uyarmak
Antimikrobiyal (Antifungal, Antibakteriyal, Antiviral)	Antibiyotik
Antioksidant	Oksitleyici ajanlarını temizlemek, SOD, GPX, GST, katalaz enzimlerini indüklemek
İmmünomodülatör	Proinflamatuvar sitokin salımını arttırmak, NK hücrelerini uyarmak
Anti-hipolipidemik	Kolesterol ve yağ asidi sentez enzimleri inhibe etmek
Anti-hipokolesterolemik	Kolesterol turnoverini arttırmak
Anti-hipertansif	NO ve H ₂ S'yi indükleyen ve vazodilatasyona neden olan Anjiotenzin II' yi inhibe etmek
Anti-diabetik	İnsulin sentezini uyarmak
Anti-trombik	Tromboz oluşumunu azaltmak
Karaciğer koruyucusu	GST indüksiyonu ile GSH düzeylerini arttırmak

Epidemiyolojik çalışmalarda; sarımsak tüketimiyle kalp, damar ve kanser hastalıklarının gelişiminde ters bir orantı olduğu gözlenmiştir [89, 90, 91]. Sarımsağın bu hastalıklara karşı koruyucu mekanizması tam olarak henüz açıklanmamıştır. Sarımsak, antioksidant aynı zamanda oksidant özelliğe sahip çok sayıda kimyasal içermektedir. Bu nedenle, sarımsaktan antioksidant özelliğe sahip toksik ya da okside edici olmayan kimyasalların izolasyonu ve bu maddelerin tanımlanması önem taşımaktadır. Örneğin, gıda takviyesi olarak sarımsak yağının geniş bir doz aralığı kullanılmaktadır ve sarımsak yağının bazı dozları kesinlikle toksiktir. Dolayısıyla herhangi bir *in vivo* antioksidant ya da başka etkiyi ortaya koyan bir çalışma yapılmadan önce, sarımsağın kullanılacak bütün dozlarda güvenli olamayabileceğinin göz önüne alınması gerekmektedir [92].

Bazı organosülfür bileşikler sitokrom P450 (CYP) aktivitesini inhibe eder. Sarımsakta bulunan 22 organosülfür bileşikleri incelenerek CYP2A6 üzerine etkileri incelenmiştir. CYP2A6 nikotin bağılının, N-nitrozaminleri gibi promotagenlerin aktivasyonunda rolü olduğu tanımlanmıştır. Bu çalışmaya göre dialkil disulfidin inhibitör etkisi dialkil sülfide göre çok daha fazladır [93].

Sarımsakta bulunan ajoene glutasyonun, redüktaz enziminin substratını inhibe ederek hücrede oksidatif stresi arttırdığı bildirilmiştir [94]. Ajoene, lösemi hücrelerinde peroksit üretimini arttırarak ve NF-*kappa*B faktörünü aktive ederek apoptozise neden olmaktadır. Bu da ajoenenin antitümör etkisini kısmen açıklamaktadır [95].

Allisin, diallil disülfid ve diallil sülfid gibi etkin kükürt bileşikleri, sarımsağın anti-kanser ve antioksidant özellikleriyle yakından ilişkilidir [96]. Diallil disülfid, gastrik adenokarsinom hücre hatlarında (AGS) canlılığı azaltır ve doza bağlı olarak apoptoza yol açar. [97].

Cilt kanserinde sarımsak organosülfürlerin koruyucu rolleriyle ilgili bilgiler gittikçe artmaktadır [98]. Diallil trisülfidin, hücre içi reaktif oksijen türlerin düzeyini (ROS) ve DNA hasarını arttırarak, endoplazmik retikulum stresini ve G2/M fazında tutuklamayı uyararak, insan melanoma (A375) ve bazal karsinoma (BHK) hücrelerinde mitokondri aracılı apoptozis ile kaspaz bağımlı ve bağımsız yollar dâhil olmak üzere hücrelerin büyümelerini inhibe ettiği rapor edilmiştir [99].

Sarımsak bileşenleri, kanserojen aktivasyonunun inhibisyonu, detoksifikasyonun arttırılması, ekskresyon ve aktive edilmiş kanserojenlerden DNA'nın korunması gibi muhtemel antikanserojenik mekanizmaları içerebilir [100].

Sarımsak bileşenlerinin, karsinojenlerin DNA'ya kovalent bağlanmasını bloke ettiği, kanserojenlerin; degradasyonunu arttırdığı, apoptozu ve immün yanıtını düzenlediği görülmüştür [101].

Ayrıca DATS, tümörlerde mitozu azaltır, histon deasetilaz aktivitesini düşürür, H3 ve H4 asetilasyonunu arttırır, hücre siklusunu inhibe eder ve pro-tümör belirteçlerini (survivin, Bcl-2, c-Myc, mTOR, EGFR, VEGF) azaltır [102].

Sulu sarımsak ekstraktlarının, *E.coli* WP trp- ve *E.coli* WP2trp-vrA'de 4nitroquinoline-1oxide (4NQO) ile oluşturulan mutagenезisi baskıladığı ancak UV'nin bu etkiyi göstermediği [103], hidrojen peroksit ve γ -radyasyonunun mutagenik etkisini azalttığı [104] rapor edilmiştir. T24 insan mesane kanseri hücre serisinde sarımsağın etkin bileşenlerinden olan DADS (Diallyl disülfid)'in apoptozisi arttırdığı rapor edilmiştir [105].

Güçlü bir mutagen olan Cyclophosphamide (CP)'in mutagenik etkinliğine karşı sarımsak ekstraktının antimutagenik etkisi, İsviçre albino farelerinin kemik iliğinde *in vivo* kromozomal hasar testi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada, farelere ağız yoluyla beş gün boyunca %1, %2,5 ve %5 oranında sarımsak ekstraktı verilmiştir. Daha sonra intraperitoneal olarak 25 mg/kg dozda CP uygulanmıştır. 24 saat ve 48 saat sonra kemik iliği hücrelerinde kromozomal hasarlar incelenmiştir. Sarımsak ekstraktı uygulanan gruplarda kromozomal hasarların, pozitif kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı, ayrıca mitotik indeksin de önemli derecede artış gösterdiği ortaya konmuştur. Araştırmacılar mitotik indeksteki artışa bağlı olarak sarımsak ekstraktlarının antisitotoksik etkileri olduğunu da öne sürmüşlerdir [106].

Mevcut çalışmaların sonuçlarına göre, sarımsağın ekstrakt bileşenleri (tek başına veya kombinasyon halinde) potansiyel antianjiyogenik ve antimetastatik ajanlar olarak sunulmaktadır. [88].

2.9. MANTARLAR

Yaklaşık 100 bin mantar türü vardır. Bunlardan 700 tür yenilebilir, 50 tür zehirlidir. Diğer 50 tür de tıbbi etkilere sahiptir. Bazıları çok hoş görünümde olsa da neredeyse tüm tıbbi mantarlar sert ve odunsu görünümündedir. Kanser tedavisinde mantar kullanımı araştırmaları 1970'lerde başlamıştır. Bugün, bilim adamları bağışıklık fonksiyonunu ve T hücrelerinin çalışmalarını geliştirdiklerini bildirerek mantarların benzersiz şifa özelliklerini doğrulamıştır [73]. Mantarlar; en iyi radikal süpürücü özellikleri taşıyan, biyoaktif maddeleri içeren adaylar olarak gösterilebilir. Yabani mantarların antioksidant özellikleri kapsamlı olarak incelenmiş ve tokoferoller, askorbik asit, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi elde edilen birçok antioksidan bileşikler tespit edilmiştir [107].

Uzun yıllar boyunca çeşitli mantarlar, geleneksel tıp alanında farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Birçok yenilebilir mantarın antimikrobiyal, antikanser ve antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda mantarlardan izole edilen birçok biyoaktif bileşiklerin çeşitli tedavi edici etkilere sahip oldukları rapor edilmiştir.

Mantarlar antik çağlardan beri insanlar tarafından tüketilmektedir. Mantarların besleyici ve tıbbi özellikleri uzun süredir bilinmektedir. Nispeten büyük miktarda karbonhidrat, lif ve protein (% 19 -% 35), tüm esansiyel aminoasitler de dâhil olmak üzere içerirler ve yağ oranları düşüktür. Mantarlarda bulunan lektinler, araştırma çalışmalarının konusunu oluşturmuştur. Şu

ana kadar pek çok mantar lektini bildirilmiştir. Tümör hücrelerine karşı anti-proliferatif ve antitümör aktivite, immünmodüle edici aktivite, HIV-1 reverse transkriptaza karşı inhibe edici aktivite gibi geniş biyolojik aktiviteleri kapsayan özellikleri nedeniyle son yıllarda dikkat çekmektedir. Lektin aktiviteleri büyük oranda hücre adezyonu, büyüme ve morfogenezis, moleküler tanıma ve patogenezis gibi hücresel fizyolojinin birçok yönünde ortaya çıkan lektin-karbonhidrat etkileşimlerine bağlıdır. Lektinler genellikle glikoproteinler, glikolipidler ve hücre yüzeylerinde bulunan polisakkaritlerle etkileşir [108].

Mantarlarda bulunan antioksidant bileşikler, sağlığın korunması ve oksidatif hasarın azalmasında katkıda bulunabilir. Besin değerleri ve önemli ölçüde biyolojik aktiviteye sahip olan bileşikleri içermeleri, mantarları günümüzde çok daha değerli bir besin türü haline getirir. Bazı çalışmalar, mantar ekstraktlarının normal (kanser olmayan) hücre soylarının çoğalmasını değil, meme kanseri hücre soylarının çoğalmasını baskıladığını göstermiştir.

Yapılan *in vitro* çalışmasında *Agaricus bisporus*'un sulu ekstraktı kullanılarak aromataz aktivitesi ve östrojen üretimi baskılandığı görülmüştür. Çalışma, hayvan modeli ile desteklenerek *Agaricus bisporus*'ta bulunan linoleik asit, linolenik asit ve konjuge linoleik asit (CLA) gibi doymamış yağlı asitlerin aromataz aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir. Aromataz, androjenleri östrojenlere dönüştürür ve aromataz ekspresyonu meme tümörlerinde ortaya çıkar. Beta-glukanlar içeren mantar ekstraktlarının aromataz aktivitesini inhibe ettiği öne sürülmüştür [109].

2.9.1. Kükürt mantarı (*Laetiporus sulphureus*)

Uzun bir geçmişi olan *Laetiporus sulphureus*, bir diğer adı ile kükürt mantarı, *Polyporaceae* familyasından yenilebilen, tadı tavuğu andıran bir mantardır. İki alt türü vardır: *L. Sulphureus minatus* ve *L. sulphureus* (NCBI Taxonomy). Pek çok kişinin bu mantara karşı alerjisi olduğundan, genç mantarlar tercih edilmektedir.

Mantar büyük yığınlar halinde yetişir ve kilolarca ağırlıkta olabilir. Özellikle okaliptüs, karaağaç ve ceviz ağaçlarının gövdelerinde, ölü ağaç kütükleri üzerinde saprofit yaşam sürebilirler. Sarımsı ve turuncu renginde olan meyve gövdeleri ile kolayca ayırt edilebilirler [110]. Genç mantarlar; nemli, etli, gövdesi sarı ve uçları turuncu renkte olurken yaşlı örnekler daha solgundur. Türkiye'de bulunduğu yerler: söğüt ağaçları üzerinde Konya, Isparta, Muğla ve Elâzığ; Eskişehir'de Ulmus sp. üzerinde; İstanbul kestane ağaçları üzerinde, Bursa ve

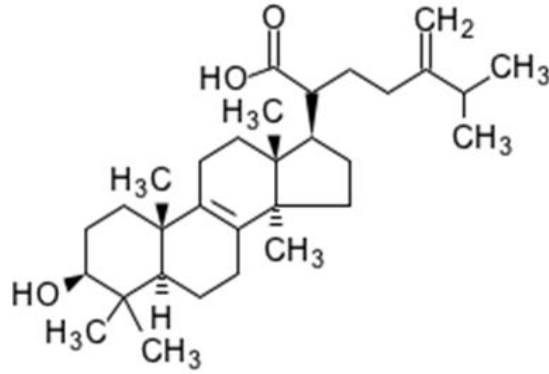
Samsun'da karışık yaprak dökken ormanlarda; Giresun'da ladin ağaçlarında, Bursa'da meşe ağaçlarında ve Edirne'de *Robinia pseudoacacia* üzerinde. [111]. İçerdiği lakkaz enzimi şarap üretiminde kullanılmaktadır [112]. Bu mantarlar ayrıca giberilik asid ve sitokinin kaynağıdır [113].

Kükürt mantarı sterol ve triterpenoik asitleri içerir. Bu mantarda temel sterol ergosterol ve fungisterol az miktarda bulunmuştur. Triterpenoik asitlerin (eburikoik ve sulfurenik) bu mantara özel olduğu tespit edilmiştir. Steroidler önemli biyolojik aktiviteye sahiptir. Antibakteriyel, antiviral, proteaz-inhibitör, antioksidan, anti-inflamatuar ve immunomodulator özelliklerine sahiptir. Araştırmalar, kükürt mantarında bulunan sekonder metabolitlerin; antitrombin [114], antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin olduğunu ortaya koymuştur. Mantar ekstraktlarındaki toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktiviteleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur [115]. Mantarda bulunan ekzopolisakkaritler sitotoksik etki yaratmadan NF-kB yolağını bloke ederek, lipopolisakkarid sonucu indüklenmiş NO, prostaglandin E₂ ve TNF- α üretimini inhibe eder [116].

L.sulphureus glukozca zengin ekstarselular polisakkaridlerin, steptozotocin indüklenmiş diabetik sıçanlarda, hipoglikemik etki gösterdikleri saptanmış [117], hücre proliferasyonunun artmasına ve sıçan insulinoa RINm5F hücrelerinde insulintropik özelliklere sahip oldukları rapor edilmiştir. Ekstraktların; antitümör, antiviral, immunomodulator tedavileri gibi çeşitli terapilerde [118] etkileri olduğu bulunmuştur. İçerdiği non- karotenoid polieneletiporik asid bazı sentetik gıda boyalarının yerine kullanılabilir [110].

Bir grup araştırmacı, kükürt mantarının meyve gövdeleriyle çalışarak altı lanostanoidi izole etmişlerdir: 3-okso-sulfurenik, sulfurenik asit, asetil eburikoik asit, asetil trametenolik asit, 15 α -hydroxytrametenolic asit ve semisentetik bir türev olan asetil-3-okso-sulfurenik asit. Daha sonra bileşiklerin HL-60 hücrelerinde olası apoptotik etkileri araştırılmış ve IC₅₀ değerleri 14, 15 ve 12 μ M sırası ile sulfurenic asit, asetil eburikoik asit ve 15 α -hydroxytrametenolik asit bulunarak, güçlü ölüm ajanları olarak belirlenmiştir [119].

Eburikoik asit 1950 yılında doğal triterpenoid asit olarak tanımlanmıştır [120]. Steroid ilaçların önemli bir ham maddesi olarak bilinmektedir. *Poria cocos*, *Leatiporus sulphureus* ve *Fomes pinicola* gibi mantar türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır [121].



Şekil 2.11: Eburikoik asid

Moleküler mekanizmaların araştırılması sonucu eburikoik asid, ROS üretimin artmasına, ATP tükenmesine, sitozolik kalsiyum iyon konsantrasyonu ve bağlayıcı immüoglobulin protein (BİP) artışına bağlı endoplazmik retikulum stresine yol açtığı, ölümle ilişkili protein kinazın (DAPK) downregüle fosforilasyonu ve beclin-1, JNK ve Bcl-2'in upregüle fosforilasyonu ile Hep 3B hücrelerinde otofajiyi indüklediği anlaşılmıştır [122].

Akasya (*Robinia pseudoacacia*) üzerinde parazitik olarak büyüyen *Laetiporus sulphureus*'tan laetirobin metabolitin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. *In- vitro* çalışmaları sonucu laetirobinin hızlıca tümör hücrelerine girdiği, mitozun geç evrelerinde hücre bölünmesini engellediği ve hücreyi apoptozise tetiklediği tespit edilmiştir. Fare nöroblastom hücre hatları üzerinde yapılan bir ön çalışmada laetirobin bileşiğin sitostatik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir [123].

Buna göre antioksidanca zengin, bağışıklık güçlendirici ve antikanserojen maddeleri içeren diyet takviyeleri ile kanser sıklığını ve gelişmesini azaltmak mümkündür. Yoğun çalışmalar yapılmasına rağmen henüz meme kanseri riskini azaltmak için özel bir yaklaşım tespit edilememiştir.

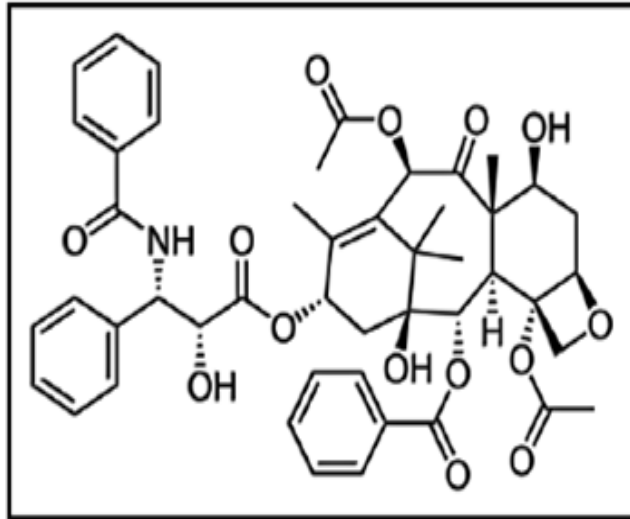
Bu çalışmada sarımsak ve kükürt mantarın ekstratlarının meme kanseri hücreleri üzerine etkileri araştırılması hedeflenmiştir.

2.10. KEMOTERAPİ İLAÇLARI

2.10.1. Paklitaksel

Pasifik porsuk ağacı *Taxus brevifolia*'nın ağaç kabuğundan elde edilmiştir [124]. Kimyasal yapısı şekil 2.12'de gösterilen paklitaksel, tübülünleri hedefleyen bir hücre iskeleti ilacıdır. Paklitaksel uygulanan hücrelerde mitotik iğ ipliği birleşmesinde, kromozom ayrılmasında ve hücre bölünmesinde defektler gerçekleşir. Paklitaksel, mikrotübül polimerlerini stabilize eder ve ayrılmalarını önler, böylelikle metafazda iğ ipliği yapılanması mümkün olmaz. Bu durumda mitoz bölünme devam edemez, mitotik kontrol noktalarının uzun süreli aktivasyonu sonucu ya apoptozis tetiklenir ya da hücre bölünmesi gerçekleşmeden G-fazına geri dönüş gerçekleşir [125].

Paklitaksel'in anahtar öncüllerinden biri olan baccatinler çeşitli *Taxus* türlerinin yapraklarında bulunur ve yarı sentetik dönüşümle Doseetaksel gibi Paklitaksel'in aktif analogları elde edilebilir. Paklitaksel; meme, yumurtalık, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde kullanılırken doseetaksel, primer olarak meme veya küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde kullanılmaktadır [126].



Şekil 2.12: Paklitakselin kimyasal yapısı

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KİMYASAL MADDELER

- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid), Sigma, Almanya
- Fetal Sığır Serum (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000 u/MI Penisilin, 10 mg/ml Streptomisin), Gibco, USA
- Fosfat Tuz Tamponu (PBS), Hyclone, Thermo Scientific, USA
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Hyclone, Thermo Scientific, USA
- SDS Molecular Biology Grade, Biochemica Applicham, Almanya
- Ham's F12, Medium, PAA, USA
- 0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-Edta), Gibco, USA
- Dimetil Sülfoksit (Dmsö), Sigma, Almanya
- Triton X-100, Sigma, Almanya
- Cell Viability Imaging Kit, Roche, İsviçre
- Tripan Mavisi (%0,5), Biological Industries, İsrail
- Paklitaksel (Taksen), Koçak Farma, Türkiye

3.2. SARF MALZEMELER

- 25cm² ve 75cm²'lik flask, Orange Scientific
- 6 kuyulu plate, Orange Scientific
- 96 kuyulu flat plate, Orange Scientific
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10µl'lik pipet uçları, Biohit
- 100µl'lik pipet uçları, Expell
- 1000µl'lik pipet uçları, Ayset
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, Corning Incorporated Corning

3.3. CİHAZLAR

- Spektrofotometre (FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya)
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- 800 Mikroplate (Floresans Okuyucu)
- CO2inkübatörü, Sanyo, Japonya
- Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Steril kabin, ESCO, Singapur
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- Inverted mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420, Türkiye
- Santrifüj, Rotina 35R, Almanya
- 10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-50µl Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- 20-200µl Transferpipet, Brand, Almanya

3.4. YÖNTEM

3.4.1. *Allium sativum* 'un Toplanması ve Tanımlanması

Allium sativum: Kastamonu, Taşköprü ilçesinde 2015 yılında Taşköprü İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü tarafından yetiştirilen sarımsak kullanıldı.

3.4.2. *Laetiporus sulphureus* 'un Toplanması ve Tanımlanması

Mantar örneği Türkiye'nin iki farklı bölgesinden toplanmıştır:

Laetiporus sulphureus: Muğla Üniversitesinden alınan kurutulmuş mantar örneği, 9 Aralık 2009 Uşak, Esmek ilçesi, Güllü kasabası, söğüt ağacının üzerinden toplanmıştır. Herbarium numarası: AT-1056.

Laetiporus sulphureus: Bolu ili, Yeniçağa ilçesinden 23 Ekim 2014'te söğüt ağacının üzerinden toplanmıştır.

Her iki örneğin identifikasyonu Dr. Ilgaz Akata tarafından yapılmıştır (Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi).

3.4.3. *Allium sativum* ve *Laetiporus sulphureus*'un Ekstraksiyon İşlemleri

3.4.3.1. Maserasyon ekstarksiyonu

Kurutulmuş mantar blendır ile öğütüldü. Toz haline getirilen mantar örneğinden 50 gr., küçük parçalara kesilen sarımsaktan 300 gr. tartılarak karanlık bir ortamda, 500 ml metanol'ün içerisinde, oda ısısında bekletildi. Üstte kalan metanol alındı ve taze metanol ilave edilerek örnekler bir hafta daha bekletildi. Birleştirilen metanol ekstrakt çözeltileri Whatman No.4 kâğıt üzerinden filtre edilerek yoğunlaştırma işlemi evaporatörde (rotary evaporator Büchi R-210) 50°C'deki su banyosunda, vakum altında yapıldı. Çözücünün tamamen uzaklaştırılması için örnekler laminar akış altında bırakıldı ve geri kalan metanolün buharlaştırılmasına izin verildi.

3.4.3.2. Soxhlet ekstraksiyonu

Kurutulmuş mantar blendır ile öğütüldü ve toz haline getirildi. Öğütme işleminin amacı numunenin uygulanacak çözelti içinde maksimum miktarda çözünmesi ve çözelti ortamına geçecek olan madde miktarının maksimize edilmesidir. Sarımsak (10 g) ve mantar (10 g) ekstraksiyonu için, kaynama noktası 200°C olan 50 ml metanol (Merck Darmstadt, Almanya) ilave edilerek Soxhlet ekstraktöründe (Soxhlet SER 148/3), iki saat süre ile ekstraksiyon işlemi yapıldı. Elde edilen ekstarkt çözeltileri Whatman No.4 kâğıt üzerinden filtre edildi. Yoğunlaştırma işlemi evaporatörde (rotary evaporator Büchi R-210), 50°C'deki su banyosunda, vakum altında yapıldı. Çözücünün tamamen uzaklaştırılması için örnekler laminar akış altında bırakıldı ve geri kalan metanolün buharlaştırılmasına izin verildi.

3.4.4. *Allium sativum* ve *Laetiporus sulphureus*'un Ekstraktının Hazırlanması

Allium sativum ve *Laetiporus sulphureus*'un stok çözeltisi 50 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde, DMSO ile çözülmesi sağlandı. Bu çözünmüş stoktan 20'şer µl olacak şekilde alikot yapılarak stok,- 80°C' de saklandı. Çalışmalar için gerekli seyreltmeler ise besiyeri ile yapıldı.

3.4.5. Kemoterapötiklerin Hazırlanması

Paklitaksel 5 ml RPMI 1640 besiyeri içinde 200 TDC (Test Drug Concentration) dozunda hazırlandı, seri dilüsyon yapılarak hücelere son konsantrasyonları 50, 25, 12, 6, 3, 1.5, ve 0.75 TDC olacak şekilde uygulandı. Kemoterapötik ile *Laetiporus sulphureus*'un Muğla'dan toplanan mantar örneğinin ekstarktı ile kombinasyon çalışmasında, dozlar şu şekilde hazırlandı: 5'er ml besiyeri içine paklitaksel ve mantar ekstresi sırasıyla şu şekilde hazırlandı: 50 TDC ve 100 µg/ml; 25 TDC ve 50 µg/ml; 12 TDC ve 25 µg/ml; 6 TDC ve 12 µg/ml; 3 TDC ve 6 µg/ml; 1.5 TDC ve 3 µg/ml; 0.75 TDC ve 1.5µg/ml.

3.4.6. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Ticari olarak Amerika Hücre Kültür Koleksiyonundan satın alınan MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soyları, kriyovial denen kaplar içerisinde, -80 C° dolaplarda saklandı. Kullanılan hücre soylarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir:

MCF-7 Hücre Soyu:

- İnsan meme kanseri hücre soyu
- Östrojen reseptörü (+)
- E-kaderin (+)
- Kaspaz 2: (+/-), Kaspaz 3: (-)
- Daha az oranda yayılabilir.

MDA-MB-231 Hücre Soyu:

- İnsan meme kanseri hücre soyu
- Östrojen reseptörü (-)
- Epidermal growth factor (EGF) (+)
- Transforming growth factor alpha (TGF alpha) (+)
- E-kaderin (-)
- Kaspaz 2: (+), Kaspaz 3: (+)
- Yüksek oranda yayılabilir.

3.4.6.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler, -80 C° den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürüldü. Hücre süspansiyonu; %5 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 Lglutamin (Gibco) içeren 5 ml RPMI (Roswell ParkMemorial Institute medium) besiyeri içerisine alındı. Falkon tüp 800rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Falkon tüp üzerine 4 ml besiyeri ilave edildi ve 5 ml'lik hücre süspansiyonu 25 cm²'lik flasklar (Thermo Scientific) içerisine alınarak 37 C° 'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

3.4.6.2. Hücre Soylarının Pasajlanması

Deneylerde kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini tamamen kapladığında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25 cm²'lik flask içerisine 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdaki aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37 C°'de, %5 CO₂'li ortamda 5 dk. inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'e 5 dk. santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra 9 ml besiyeri ilave edildi. 10 ml'lik hücre süspansiyonu 75 cm²'lik flasklara alınarak 37 C°'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı.

3.4.6.3. Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu eklendi. Hücreler 37 C°'de, %5 CO₂'li ortamda 5 dk. inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe

edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp (Orange Scientific) içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk. santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5 ml dondurucu medium (5ml DMSO + 5ml FBS + 40ml DMEM), karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak -80 C°'ye kaldırıldı.

3.4.6.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soyları için kullanılan besiyeri ortamı için %5 Fetal Bovine Serum (Hyclone USA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, Gibco), %1 L-glutamin (Gibco) içeren RPMI 1640 (Hyclone USA) solüsyonu kullanıldı.

3.4.6.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20µl 0,5 ml'lik tüpe alındı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi (Biological Industries) konarak iyice karışması sağlandı. Hematositometre, distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 12µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı, sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

3.4.7. Morfolojik Değerlendirme

MCF- 7 hücrelerine 48 saat süreyle sarımsak ve mantar ekstratları uygulandı (100 µg/ml). Ekstratların sitotoksik etkisi morfolojik olarak faz-kontrast mikroskopunda (Olympus CKX41, Japan) değerlendirildi.

3.4.8. SRB (Sulforhodamine B) Metodu

SRB metodu; hücre kültüründe sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılan, hücrelerdeki total protein ölçümüne dayanan kolorimetrik bir metottur. Bu metot, Amerika'da bu konularda referans merkez olarak kabul edilen NCI (National Cancer Institute)'ün de çalıştığı bir yöntem olduğundan, anti-kanser ilaç araştırmalarına elverişli bir yöntemdir. Ayrıca büyük ölçekli ilaç tarama uygulamaları için, ilaç kaynaklı sitotoksiste ve hücre çoğalmasını ölçmek için uygun bir analiz yöntemidir. Sülforhodamin B (SRB) protein bağlayabilen anyonik bir boyadır.

Trikloroasetik asit ile sabitlenen pH altında bazik aminoasitler ile elektrostatik bir kompleks oluşturur ve bu maddede hızla renk değişimi gözlenir. Bu renk değişimi 560 ve 580 nm absorbanlar da kolayca ölçülür. Pasajlama işleminden sonra 75 cm²'lik flask içerisinde konfluent olan hücreler, hücre pasaj protokolündeki gibi tripsin ile kaldırıldı. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'e 5 dk. santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre pelleti 1ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra 9ml besiyeri ilave edildi ve bundan 10ml'lik hücre süspansiyonu elde edildi. Hücreler, 96 kuyulu plate içerisine son hacim 200 µl medium (1:1 DMEM/ Hams F-12), içinde 5000 h/kuyu olacak şekilde ekildi. Kör (Negatif Kontrol) için kullanılacak kuyulara ise 200 µl medium (1:1 DMEM/ Hams F-12) eklendi.

Liyofilize edilip saklanan sarımsak ve mantar örneklerinin (*Allium sativum*, *Laetiporus sulphureus* Muğla bölgesinden toplanan ve *Laetiporus sulphureus* Bolu bölgesinden toplanan) stok çözeltisi 50 mg/ml olacak şekilde DMSO ile çözünerek hazırlandı. SRB testi için, örneklerin farklı konsantrasyonları (0,001-100µg/ml) hücre besiyerinde hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. MCF -7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 100µl besiyeri içerisinde 5×10^4 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi.

Laetiporus sulphureus'dan izole edilen saf madde Laetirobin, DMSO ile hazırlanan ve derişimi 1.3 mM olan stok çözeltisinden farklı konsantrasyonları (0,0375-2.6 µM), hücre besiyerinde hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı.

Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık, MO) olarak sadece, besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200µl besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 48 saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

SRB (Sulforhadamine B) Metodu İçin Kimyasalların Hazırlanması:

- %10 (w/v) TCA: 10 gram TCA, 100ml deiyonize su ile 100ml ye tamamlandı ve
- %10 (w/v) Trikloroasetik asit (TCA) elde edilir.
- %1 Asetik asit çözeltisi: 1ml asetik asit 99ml su ile hazırlanarak %1'lik asetik asit çözeltisi elde edilir.
- %0,4 w/v SRB: %1'lik asetik asit içinde hazırlandı.

- 10mM Tris baz: 121 mg tris bazı ise 100ml deiyonize su ile tamamlanarak, 10mM pH:10.0 tris bazı elde edilir.

48 saatlik uygulama süresi sonunda hücresel proteinleri fikse etmek için, her kuyuya 50 µl TCA (Trikloroasetik asit) eklendi. Hücresel proteinler +4 °C' de 1 saat fikse edildi. Fiksasyon süresi sonunda plate ters çevrilerek TCA döküldü. TCA'yı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez deiyonize su ile yıkandı. Her yıkamanın sonunda plate ters çevrilerek döküldü. Yıkama sonunda SRB solüsyonundan her kuyuya 50 µl eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda SRB plateden dökülerek uzaklaştırıldı. Bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez %1'lik asetik asit ile yıkandı. Her yıkamanın sonunda plate ters çevrilerek döküldü. Yıkama sonunda plate, kuyular içerisinde hiç damla kalmayacak şekilde havada kurutulduktan sonra proteinlere bağlanan boyanın çözünbilmesi için, 10 mM tris bazı (150 µl/kuyu) eklendi. Boya solüsyonunu homojenize hale getirmek için plate, en az 10 dk. 150rpm'de shakerda inkübe edildi. Optik dansite ELISA okuyucuda 564 nm'de okundu.

% Canlılık hesabı:

Mantar ve sarımsak örnekleri uygulanmamış kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül ile hesaplandı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon, birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı.

% Canlılık = $[100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbanısı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbanısı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$ olarak hesaplandı.

3.4.9. Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi

3.4.9.1. Hoechst 33342, Propidyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini, dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, hücre membranından nüfuz edebilen dolayısıyla DNA'ya bağlanabilen bir boyadır. Canlı ve ölü (apoptotik/ nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır.

Propidyum iyodür (PI), sadece hasarlı hücre membranlarından geçebilen, geç apoptotik/sekonder nekrotik veya primer nekrotik olan, tüm ölü hücreleri boyayabilen, floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi) toksik

koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi, vb.) altında gerçekleşen klasik ölüm şeklidir. Sekonder nekroz ise, piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup apoptozisin geç safhasıdır.

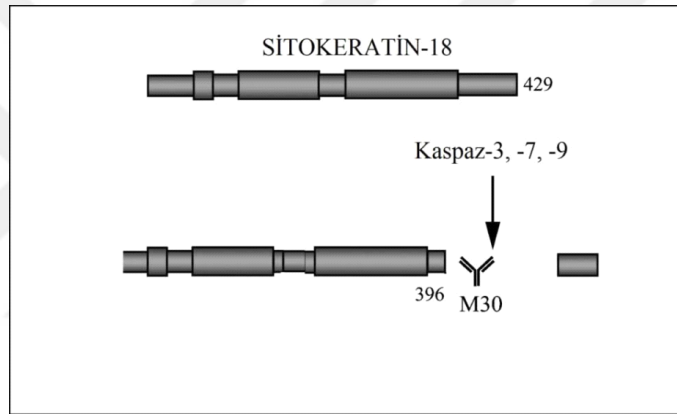
Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptoz/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler, non-vital boyalar ile (PI) boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intakt olmasından dolayı bu boya ile boyanamaz. Yani PI negatif ve Hoechst boyası pozitif boyanmaktadır. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadır [127].

İkili boyama yöntemi kullanılarak bileşiklere maruz kalmış hücrelerin ölüm şekilleri, nükleus morfolojisine bakılarak yapılabilir. Apoptotik hücrelerde; çekirdeğin normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde ise çekirdeğin normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği aranmaktadır. Bu amaçla, bileşiklerin hücre soyları üzerindeki etkilerinin morfolojik olarak floresan mikroskopta görüntülenebilmesi için ikili boyama yöntemi kullanıldı.

İkili boyama için, MCF-7 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 2 ml içerisinde 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben hücreleri zedelemeyen şekilde 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve LSMM örneğinden 100 $\mu\text{g/ml}$, 1ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularından 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1ml taze besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler 12, 24 ve 48 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 12, 24 ve 48 saat örneklerinin uygulamasını takiben, hücrelerin süpernatantları 15 ml'lik falkonlara toplandı ve bir kez 1ml PBS ile yıkama yapıp tekrar aynı falkonlara konuldu. Hücreleri toplamak amacıyla kuyulara 200 μl tripsin pipetlendi ve 4 dakika 37°C 'de bekletildi. Süre sonunda hücreler, ilgili falkonlara toplandı ve bu süspansiyondan, 800 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine, PBS içerisinde konsantrasyonları 1 $\mu\text{g/ml}$ PI, 1mg/ml RNaz, ve 10 $\mu\text{g/ml}$ olan ikili boyama çözeltisinden 100 μl pipetlendi ve karanlıkta 20 dakika 37°C 'de inkübe edildi. Süre sonunda bu süspansiyondan 20 μl temiz bir lam üzerine alındı ve lamel ile kapatılarak bileşiklerin hücrelerde sebep olduğu ölüm şekli, floresan mikroskop altında değerlendirildi.

3.4.10. M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) Metodu

Sitokeratinler (CK), kanser tanısında kullanılan intermediyat filament protein ailesine ait proteinlerdir. Apoptozis esnasında sitoskeletin önemli bir proteini olan CK18, sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak kırılmış CK18'i (CK18-Asp396) oluşturmaktadır [128]. M30 monoklonal antikor, özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (Şekil 3.1.) [129]. Böylece apoptozise özgü bir belirteç olan kırılmış CK18, ELISA yöntemiyle saptanmaktadır. Bu özel CK18'i tanıyan M30 antikor, hücrelerin bulunduğu ortamla temas ettirilirse ve eğer ortamda apoptotik hücreler de var ise, apoptozisin varlığı gösterilmiş olur.



Şekil 3.1: Sitokeratin 18'in kaspazlar aracılığıyla kesimi ve bu bölgenin M30 antikoruna tanınmasının şematik gösterimi [130].

ELISA metoduyla M30 antijen fragmentini belirlemek için, MCF-7 hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 200 µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben, hücreleri zedelemekten uzaklaşırarak 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı. Sonrasında LSMM örneğinden 100µg/ml, 100 µl içerisinde olacak şekilde hücrelerin üzerlerine uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 100 µl taze besiyeri ilave edildi. İlaç uygulamalarını takiben hücreler 48 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

48 saatlik inkübasyon sonunda tüm kuyulara 10 µl %10'luk Triton-X100 ilave edildi. 15 dakika oda sıcaklığında 600 rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyulardaki supernatant toplandı ve 2000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilip M30 Apoptosense ELISA (M30-Apoptosense ELISA kit, Peviva, Bromma, Sweden) kit içeriğine uygun olarak çalışıldı.

Supernatantlar, kitin içerisinde yer alan, CK18'i tanıyan fare monoklonal M30 antikoru kaplı striplere 25 µl pipetlendi. Tüm örnekler üzerine 75 µl horseradish peroksidaz konjugatı eklendi. 4 saat boyunca 600 rpm çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda örneklere 250 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 200 µl TMB substratı ilave edilerek 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 1N H₂SO₄ içeren 100 µl stop çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk şiddeti, spektrofotometrik olarak 450nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

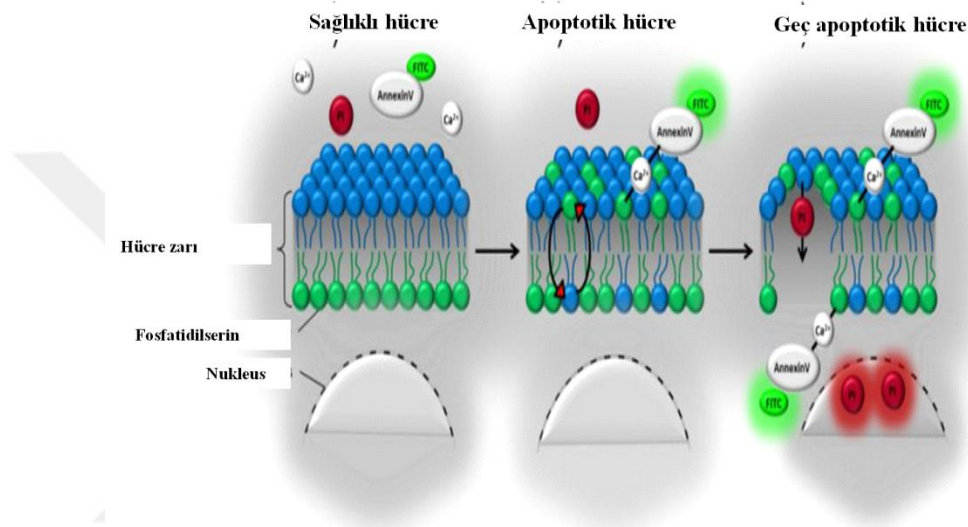
3.4.11. Akım Sitometri Analizleri- Annexin/Kaspaz 3/7

Akım sitometri ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Ölçüm sırasında hücreler sıvı içerisinde tek tek askıda olmalı ve hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Akım sitometri cihazında bir saniyede binlerce hücre, lazer ışını ile karşılaştıkları flow cell adı verilen bölümden geçer ve hücreler lazer ışığı ile uyarılır. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer ışığı tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar (floresan özellikte boyalar) da olabilir. Hücreler, yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikolarla inkübe edilerek hücrelerin antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor FITC, PE, PerCP, 7-AAD gibi floresan boylarla işaretlenmiştir. Böylece belirli antijene sahip hücrelerin laser ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirilerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir [131]. Akım sitometri ile floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen herhangi bir yüzey proteini saptanabilmektedir. Kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve kantitatif sonuçlar vermesi açısından bu yöntem, klinikte apoptozisin saptanmasında oldukça kullanışlıdır [132].

3.4.11.1. Annexin V ve Dead Cell Boyama

Apoptozis veya programlı hücre ölümü; hücre büyümesi ve proliferasyon yollarının düzenlenmesinde aktif ve önemlidir. Hücrelerde apoptoz sürecinde karakteristik fizyolojik

değişiklikler gözlemlenir. Bu değişimler arasında, normalde hücre membranının iç yüzünde bulunan ve bir membran fosfolipidi olan fosfatidilserinin, membranın dış yüzüne transloke olması, spesifik hücre proteinlerinin degradasyonu veya kırılması, kromatin kondensasyonu ve apoptozun geç evresinde membran bütünlüğünde bozulma sayılabilir. Fosfatidilserinin translokasyonu hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir (Şekil.3.2).

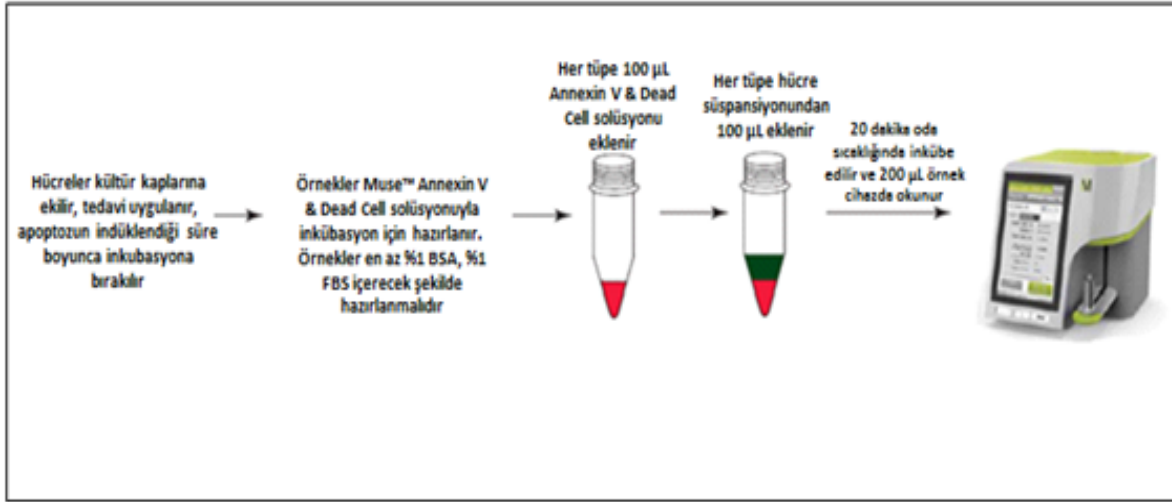


Şekil 3.2: Fosfatidilserinin translokasyonu ve Anneksin V'yi bağlaması [133].

Anneksin-V, fosfatidilserin için yüksek affinite ile Ca^{+2} bağlayıcı bir proteindir. Apoptotik hücre, FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenerek görünür hale getirilebilir. Fosfatidilserin moleküllerinin Ca^{+2} iyonu varlığında, Anneksin-V-FITC kompleksi ile bağlanması sonucu apoptotik hücre ölüm yüzdesi belirlenmektedir.

Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit oda sıcaklığına getirildi. MCF-7 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1ml içerisinde 2.5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 12, 24 ve 48 saat 37^0C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben LSMM örneğinden 100 $\mu g/ml$, 1ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 1ml taze besiyeri ilave edildi. 12, 24 ve 48 saat 37^0C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara toplandı. 1000 g 5

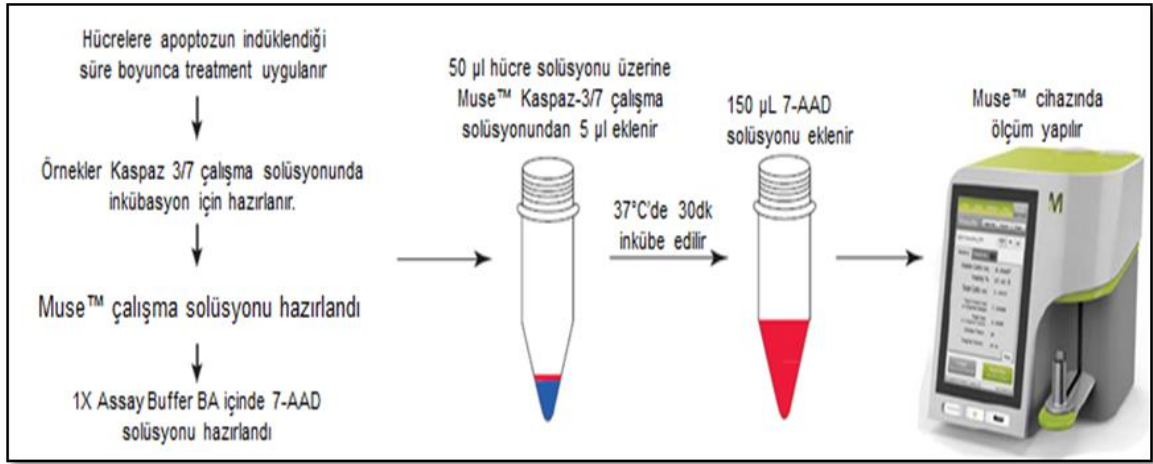
1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve 100 µl %1 FBS içeren besiyeri eklendi, 1.5 ml tüpe 100 µl hücre süspansiyonu alındı. Bu ependorflara 100 µl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi. Orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı. Karanlık ortamda, 20 dk. oda ısısında inkübasyon sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı (Şekil.3.3).



Şekil 3.3: Annexin V & Dead Cell Boyama Protokolü [134].

3.4.11.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesi

Kaspazlar, programlı hücre ölümü olan apoptosis sürecinde önemli bir rol oynayan sistein proteazlardır [135]. Bazı kaspazlar öncelikli olarak intraselüler kaskadın başlamasında rol oynarken, efektör kaspaz olarak adlandırılan kaspazlar ise apoptotik sürecin ileri aşamalarında rol alırlar. Efektör kaspazlar olan kaspaz 3/7 aktivasyonu apoptozun ayırt edici özelliklerinden biridir. Bu efektör kaspazlar, kaspaz -3 ve kaspaz -7 gibi yapısal proteinlerin kırılması yoluyla heresel yıkımda rol oynar (Şekil.3.4) [136].



Şekil 3.4: Kaspaz 3/7 Testi Protokolü [134].

7-Aminoaktinomisin D (7-AAD), DNA için güçlü affiniteye sahip floresans özellikte bir kimyasal bileşiktir. İntakt hücre zarından kolayca geçemez, bu nedenle zar bütünlüğü bozulmuş hücrelerde çift zincirli DNA'nın GC bakımından zengin bölgelerine bağlanır [137]. Deneyde dört hücre popülasyonu ayırt edilebilir:

- Non-apoptotik hücreler: Anneksin V (-) ve 7- AAD (-)
- Erken apoptotik hücreler: Anneksin V (+) ve 7- AAD (-)
- Geç apoptotik hücreler ve ölü hücreler: Anneksin V (+) ve 7- AAD (+)
- Çok fazla nükleer debris: Anneksin V (-) ve 7- AAD (+) [134].

Muse™ Kaspaz 3/7 testi için MCF- 7 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1ml içerisinde 2.5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 12, 24 ve 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben *Laetiporus sulphureus*'un Muğla örneğinden 100 µg/ml, 1ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 1ml taze besiyeri ilave edildi. 12, 24 ve 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonunda öncelikle kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyulara 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden tripsin ile ayrılması sağlandı ve yüzeyden ayrılan hücreler; ilgili falkonlara toplandı. 1000 g 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve elde pelet sulandırılarak tedavi gruplarını içeren etiketli endodorflara hücre süspansiyonundan 50 µl eklendi. Daha sonra kaspaz 3/7 çalışma

solüsyonundan her bir tedavi grubunu içeren ependorflara 5 µl konuldu. Kısa bir pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şekilde 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda, 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ependorf içerisinde hücre süspansiyonlarına 150 µl DNA’ya bağlanabilen 7-AAD eklenerek kısa bir pipetaj gerçekleştirildi. Daha sonra oda sıcaklığından karanlıkta 5dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra muse cihazındaki kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirildi.

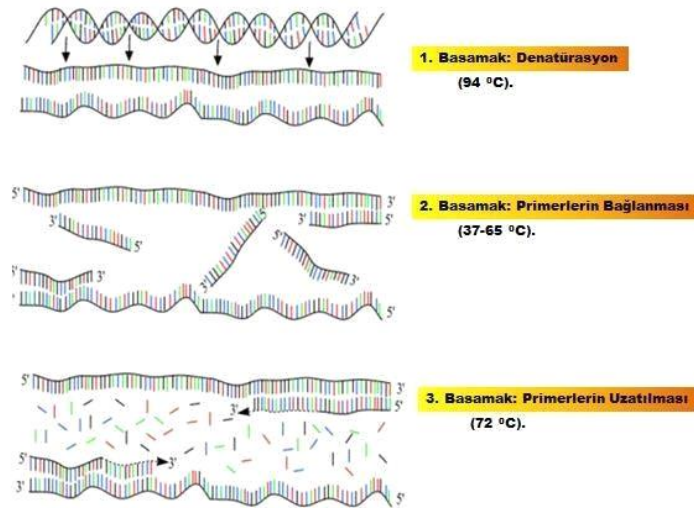
3.4.12. Apoptotik Gen Ekspresyonlarının İncelenmesi

3.4.12.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Uygun *in vitro* koşullarda, nükleik asitlerin çoğaltılmasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem Randall K., Henry A. Erlich ve Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir.

- PZR Uygulama Aşamaları ve Prensipleri

PZR reaksiyonun aşamaları: Denatürasyon- yüksek sıcaklıkta DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması; hibridizasyon- sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA’ya bağlanması; polimerizasyon - zincirin uzamasını; siklusların belirli sayıda tekrar edilmesi (Şekil 3.5). PCR aşamaları “thermocycler”denilen PCR cihazlarıyla yapılmaktadır. Her siklusun ısıtma ve soğutma aşamaları yazılım programlarının kontrolünde yapılır. “Thermocycler” da +4°C ile 100°C’ sıcaklıkarasında programlanabilir [138].



Şekil 3.5: Polimeraz Zincir Reaksiyonu Siklusunun Basamakları [139].

- DNA'nın Denatürasyonu Aşaması.

Hidrojen bağların kopmasıyla DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması hedeflenir. G+C nukleotidce zengin olan hedef zincirlere yüksek sıcaklık daha uygundur ve genelde denatürasyon 95°C'de, 30 saniye veya 97°C'de 15 saniyede gerçekleştirilir. Denatürasyonda çok yüksek sıcaklık veya süresinin uzun olması enzim aktivitesini olumsuz etkiler [138].

- Primerlerin Bağlanma Aşaması (Hibridizasyon, Annealing).

DNA'nın spesifik bölgelerine dizayn edilmiş ve prime adı verilen sentetik oligonükleotidler komplementar diziyeye bağlanır. Bu aşamada sıcaklık 37-65 C'ye iner. Primerlerden birisi; DNA'nın 5' ucu, diğeri anti paralel olan 3' ucuna, DNA polimerazın çalışma yönüne (5'→3') bağlanır. İşlem 0.5-1 dakika sürmektedir. Primerlerin nükleotid yapısı, uzunluğu ve PCR solüsyonun konsantrasyonu, primerlerin bağlanması için gerekli olan sıcaklığı ve süreyi belirler. Genellikle sıcaklık (primerlerin erime sıcaklığı) 5°C altında olmalıdır. 55-65°C iyi sonuçlar verir. Optimal sıcaklık baz sayılarına göre hesaplanır: G-C arasında üç hidrojen bağı, A-T arasında iki hidrojen bağı; G-C bazları için 4°C, A-T bazları için 2°C'dir. Örneğin; 17 bazdan primer yapısında, 11 G-C, 6 A-T bulunduğu kabul edilirse optimal bağlanma sıcaklığı şu şekilde hesaplanır [138].

$$11 \times 4 + 6 \times 2 = 56^{\circ}\text{C}$$

- Primerlerin Uzatılma Aşaması (Polimerizasyon, Extention, Elongation).

Bu aşama genelde 72°C'de gerçekleştirilir. Primerler bağlandıktan sonra onların hibritleştiği tek zincir DNA polimeraz tarafından sentezlenir. Her bir siklus için 2 dakika yeterlidir. Amplifiye olacak DNA bölgesinin uzun olması halinde bu süre arttırılabilmektedir. Ortalama her kb için bir dakika eklenmesi önerilir. Bu aşamada Taq polimeraz 5'→3' yönünde çalışarak, primerlerin 3' uçlarından başlayarak, ortamdaki nükleotidleri bağlayarak hedef DNA dizisinin kopyasını oluşturur. Üç aşama yaklaşık 10-15 dakika kadar devam ederek birinci amplifikasyon aşamasından sonra sıcaklığın tekrar 95°C'ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25-30 kez tekrarlanması ile işlem sonlanır. Hedef DNA segmentinin, 2ⁿ formülüne göre yaklaşık 33,6 milyon kopyası oluşur [138].

3.4.12.2. Eş Zamanlı PZR

Kısa sürede kantitatif sonuç verebilen, nükleik asit zincirin amplifiye olmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans, sinyalin ölçülmesine dayanan bir PZR yöntemidir. Çift sarmal DNA'ya bağlanabilen Syber green 1 miktarındaki artış, yayılan floresans miktarında da artışa neden olacaktır. [138, 140].

Hedefe özgül problemlerin kullanılması LightCycler'in diğer bir uygulama şeklidir. Problemlerden biri donör boya- 3' ucundan floresans boyayla işaretlidir, diğer alıcı ise boya -5' ucundan işaretlenmiştir (acceptor dye). Birbirine 1-5 nükleotid uzaklıkta bağlanan problemlerin işaretli uçları yaklaşarak açığa çıkan enerji floresan oluşturur [141, 142]. Eş zamanlı PZR'da tüpler açılmadığı için kontaminasyon riski düşüktür. Ayrıca floresan problemler kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir [143].

RealTime ready Human Apoptosis Custom Panel (Roche) ve Light Cycler480 Probes Master (Roche) kitleri kullanılarak alınan eş zamanlı PZR sonuçlarının analizleri Light Cycler 480 yazılımı kullanılarak yapıldı.

Apoptotik gen ekspresyonlarının (BCL2L10, BIK, BAX, BCL-2, FASLG, HRK, TNFRSF10B, TNFRSF10A) incelenmesi için, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu plakelere 2 ml içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyonu takiben hücreleri zedelemekten üzerlerinden 1ml besiyeri uzaklaştırıldı ve LSMM örneğinden $100 \mu\text{g/ml}$, 1 ml içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularından 1 ml besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 1ml taze besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 16 saat 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 16 saat ilaç uygulamasını takiben, total RNA izolasyonu yapıldı.

3.4.12.3. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu High Pure RNA Isolation Kit (Roche) kullanılarak yapıldı. Bu aşamada ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15 ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Kuyulara 2 ml soğuk PBS ilave edilip hücreler scraper (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 800 rpm'de, 5 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine $200 \mu\text{l}$ PBS eklenerek al-ver yapıldı. Kitin

içerisinde yer alan filtre tüpler, koleksiyon tüpler ile birleştirildi, lysis-binding tamponundan falkonlara 400 µl eklenerek tüm hacim, birleştirilmiş tüplere (üst kısımda yer alan filtre tüp içerisine) aktarıldı ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi(Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi. Ortamdaki total DNA'yı uzaklaştırmak amacıyla kitin içerisinde yer alan DNaz inkübasyon tamponundan 100 µl pipetlenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, DNaz inkübasyon tamponunu uzaklaştırmak amacıyla yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Bu amaçla kitin içerisinde yer alan 1 numaralı yıkama solüsyonundan 500 µl eklenerek 8.000g'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi. İkinci bir yıkama için kitin içerisinde yer alan 2 numaralı yıkama solüsyonundan 500 µl eklenerek 8.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi. Son olarak 2 numaralı yıkama solüsyonundan 200 µl eklenerek 13000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, koleksiyon tüpü uzaklaştırıldı ve filtre tüpler, steril 1,5ml'lik tüpler ile birleştirilerek filtrede tutulan total RNA'nın tüp içerisinde eldesi için 70 µl elusyon tamponu, filtre tüpe pipetlendi ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte bulunan RNA çözeltilerinin konsantrasyonları ölçüldü.

3.4.12.4. İzole Edilen RNA'ların Kontrolü

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'ların kalitesi ve miktarları Nanodrop™ (ThermoScientific) cihazı ile ölçüldü. RNA örneklerinden 2 µl alındı ve suya karşı kör olan cihaz ile ölçümler yapıldı. RNA miktarları 50 ng/µl ile 600 ng/µl arasında bulundu.

3.4.12.5. cDNA Sentezinin Yapılması

Elde edilen total RNA örnekleri, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kiti (Roche) ile cDNA'ya çevrildi. cDNA Sentez kiti içeriği:

- Reverse Transkriptaz Enzimi
- Reaksiyon tamponu
- RNaz inhibitör koruyucusu
- Deoksinukleotit karışımı

- Rastlantısal hegzamer

DTTSu (PZR derecesi) 1 µg RNA hacmi ile 2 µl rastlantısal hegzamer, son hacim 11,4 µl olacak şekilde buz üzerinde ve steril PZR tüpleri içerisinde hazırlandı. RNA sekonder yapılarının denatüre edilmesi için tüp, 65C°'de 10 dakika sıcaklık döngü cihazı ile denatüre edildi. Bir başka tüp içerisine; 4 µl reaksiyon tamponu, 0,5 µl RNaz inhibitör koruyucusu, 2 µl deoksinnukleotit karışımı, 1µl DTT, 1,1µl reverse transkriptaz enzimi (toplam hacim 8,6µl) pipetlendi ve dikkatlice karıştırıldı. Hazırlanan bu karışım, bir önceki aşamada sekonder yapıları denatüre edilen RNA'yı içeren tüpe aktarılır ve son hacim böylece 20 µl olur. Reaksiyonun gerçekleşmesi için tüp, 45°C'de, 30 dakika sıcaklık döngü cihazında inkübe edildi. Reverse transkriptaz enzimini inaktive etmek için tüp, 85C°'de, 5 dakika sıcaklık döngü cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, reaksiyonu durdurmak için tüpler hızlı bir şekilde buz üzerine alındı ve eş zamanlı PZR analizi için kullanılmak üzere -20C°'de saklandı.

3.4.12.6. Hücre Ölümü (Apoptozis, Nekroz, Otofaji) ile İlişkili Genlerin Real Time PCR ile Ekspresyon Analizleri

Literatür araştırmaları sonucunda apoptozis (FAS, TNFRSF10B), nekrozis (PARP1, RIPK1) ve otofaji (ATG3, ATG5, BECN) ile ilişkili sinyal yollarında etkili olan önemli genler belirlendi. Bu genlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek için yukarıda açıklandığı gibi öncelikle tedaviler uygulanan hücrelerden total RNA'lar elde edildi. Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezinin ardından, tabloda gösterilen genlerin ekspresyon seviyeleri Real Time PCR kullanılarak araştırıldı. Real Time PCR aşamasını gerçekleştirebilmek için öncelikle her bir gene ait primerler dizayn edildi. Primerlerin dizileri Tablo 3.1'de verilmektedir.

Tablo 3.1: Hücre Ölümü (Apoptozis, Nekroz, Otofaji) ile İlişkili Genlerin Primer Dizileri.

	Gen adı	Forward	Reverse
APOPTOZİS	FAS	5' GACCCAGAATACCAAGTGCAG 3'	5' GTTCTGCTGTGTCTTGGACATTGTC 3'
	TNFRSF10A	5' ACACCCAGCAAAGTGTGG 3'	5' CCGACGACGACAAACTTG 3'
	TNFRSF10B	5' GACTATAGCACTCACTGGAATGACC 3'	5' GTCATCGAAGCACTGTCTCAGAG 3'
	HRK	5' CCTACTGGCCTTGGCTGTG 3'	5' TACAAGTTCCGCCTGCCG 3'
NEKROZİS	PARP1	5' CTCAGGGGAGGGTCTGATGA 3'	5' CTTTGACACTGTGCTTGCCC 3'
	RIPK1	5' GCACCGCTAAGAAGAATGG 3'	5' GCCACACAATCAAGTTGAAGAG 3'
	MLKL	5' GCTGAGTGATGTCTGGAAGG 3'	5' CTTTGAATCGTCCTCTGGG 3'
OTOFAJI	ATG3	5' GCCGTTAAAGAGATCACACTGG3'	5' CATAGCCAAACAACCATAATCGTGG 3'
	ATG5	5' CAGCTCTTCCTTGGAACATC 3'	5' GGCTGTGGGATGATACTAATATG 3'
	BECN	5'GAAGACGTGGAAAAGAACCGC 3'	5'CAGCCTGAAGTTATTGATTGTGC 3'

Real Time PCR aşaması için yukarıda belirtilen genlerin primerleri kullanılarak qPCR Master Mix hazırlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: qPCR Master Mix'in Hazırlanışı.

Bileşen	20 µl mix için	180 µl mix için (8 gen için +1 fazla örnek; 9 örnek)	Final konsantrasyon
qPCR Green-Master UNG ile	10 µl	90 µl	1x
Primer (Forward)	0,6 µl	5,4 µl	300 nM
Primer (Reverse)	0,6 µl	5,4 µl	300 nM
PCR-Grade Su	7,3 µl	65,7 µl	-
Toplam Mix	18,5 µl	166,5 µl	-

Hazırlanan bu Master Mix'den 18,5 µl alınarak PCR platelerinin örnek kuyucuklarına dağıtıldı. Üzerlerine ilişkili cDNA'lardan 1,5 µl pipetlendi. Plate PCR cihazına yerleştirildi. Aşağıda verilen program ayarlanarak PCR tamamlandı. Sonuçlar $2^{\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak değerlendirildi:

1 siklus;	50°C'de 2 dakika
45 siklus;	95°C'de 15 saniye 52°C'de 20 saniye 72°C'de 30 saniye
1 siklus (Melting Curve);	95°C'de 1 dakika 55°C'de 30 saniye 95°C'de 30 saniye
1 siklus (Cooling);	40°C'de 2 dakika

Belirlenen genlerinin ekspresyon seviyeleri Real Time PCR ile belirlendi. Bu genlerin metabolizmadaki özellikleri şunlardır:

FAS: TNF reseptör süper ailesi üyesi olup TNFSF6/FASLG'nin reseptörüdür ve apoptozis sinyalinin hücre içerisine aktarılmasında görev almaktadır.

TNFRSF10A: TNF reseptör süper ailesi üyesi olup sitotoksik ligand TNFSF10/TRAIL'ın reseptörüdür ve apoptozis sinyalinin hücre içerisine aktarılmasında görev almaktadır.

TNFRSF10B: TNF reseptör süper ailesi üyesi olup sitotoksik ligand TNFSF10/TRAIL'ın reseptörüdür ve apoptozis sinyalinin hücre içerisine aktarılmasında görev almaktadır.

HRK: Apoptozis sürecinde rol alan Bcl-2 v Bcl-X(L) ölüm reseptör proteinleri ile interaksiyona girerek apoptozisin aktivasyonunda rol alır.

PARP1: En bol bulunan ve en yüksek miktarlarda eksprese edilen enzimlerden bir tanesidir. Tek zincir kırıklarını tespit ederek bunların tamirinde rol almaktadır. DNA onarım sinyalinin

başlamasında merkezi öneme sahiptir ve aktivitesinde gözlenen yüksekliğin, artmış apoptozisle ilişkili olduğu düşünölmektedir.

RIPK1: Ölüm reseptörlerinin ligasyonu neticesinde inflamatuvar ve hücre-ölümü sinyallerini (programlı nekroz) ileten bir serin-treonin kinazdır.

MLKL: RIPK3 fosforilasyonu ile aktive olan TNF-indüklenmiş, programlanmış ölüm yolağı olan nekroptozisde rol almaktadır.

ATG3: Otofaji sürecinde, ubikitinasyon-benzeri sistemlerin bileşenidir. Otofajik hücre ölümünde düzenleyici rolü bulunmaktadır.

ATG5: Otofajik hücre ölümünde düzenleyici rolü bulunmaktadır. Otofajik veziküllerin oluşumunda rol almaktadır.

BECN: Otofajik hücre ölümünün düzenlenmesinde merkezi öneme sahiptir [144, 145,146,147].

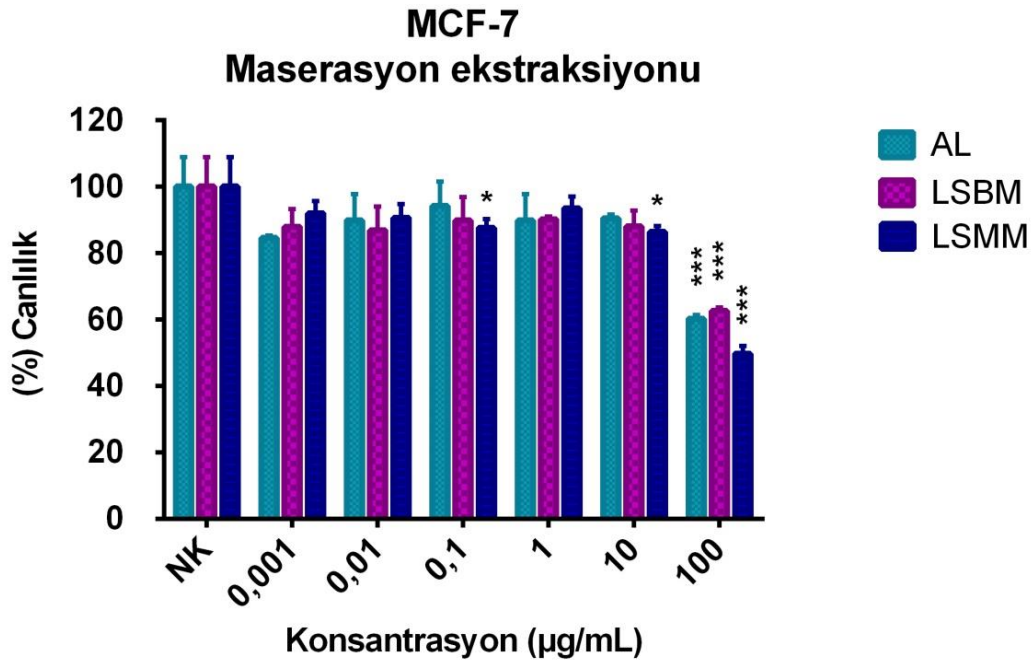
3.4.14. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 20.0 bilgisayar paket programı kullanılarak yapıldı. Yüzde canlılık değerleri, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak hesaplandı. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$ değerine göre belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. SRB (SULFORHADAMİNE B) CANLILIK TESTİ BULGULARI

Laetiporus sulphureus (kükürt mantarı) ve *Allium sativum* (sarımsak) türlerinin maserasyon ve soxhlet yöntemleriyle elde edilen ekstraktları, farklı konsantrasyonların (0,001- 100µg/ml) 48 saat süreyle MCF -7 insan meme kanseri hücrelerine uygulandı. Mantar örnekleri iki farklı bölgeden: Bolu ve Muğla'dan toplanmıştır. Mantar ve sarımsak örneklerinin MCF -7 hücre soyları üzerine olan etkisi SRB canlılık testiyle belirlendi. Hücre soylarına 48 saat süre ile örneklerin uygulamasını takiben elde edilen sonuçlar Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterildi. Mantar ve sarımsak ekstraktlarının konsantrasyonu arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde sadece Muğla'dan toplanan ve maserasyon yöntemiyle elde edilen mantar örneğiyle (LSMM) anlamlı azalma gözlemlendi ($p \leq 0.001$).



Şekil 4.1: Sarımsak ve mantar ekstraktlarının MCF- 7 insan meme kanseri hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkilerinin SRB canlılık testi ile alınan sonuçları.

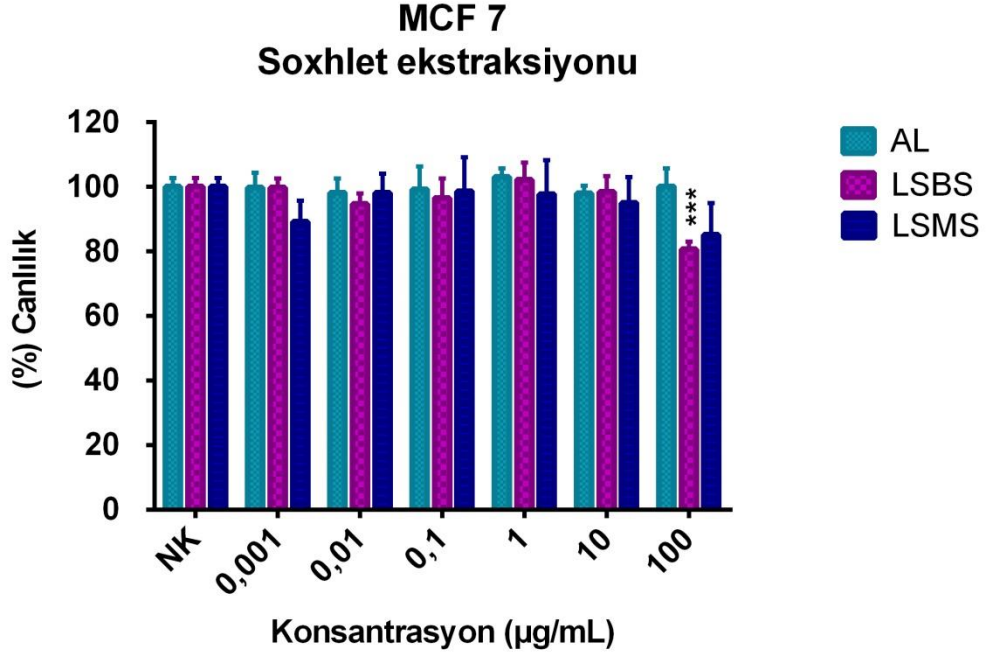
*Negatif kontrol (NK) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli farklar gösterir.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; ve *** $p \leq 0.001$.

*AL- *Allium sativum* (Sarımsak)

*LSBM – *L. sulphureus*, Bolu'dan toplanan, Maserasyon yöntemi

*LSMM – *L. sulphureus*, Muğla'dan toplanan, Maserasyon yöntemi



Şekil 4.2: Sarımsak ve mantar ekstraktlarının MCF- 7 insan meme kanseri hücreleri üzerine 48 saatlik sitotoksik etkilerinin SRB canlılık testi ile alınan sonuçları.

*Negatif kontrol (NK) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli farkları gösterir.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; ve *** $p \leq 0.001$.

*AL- *Allium sativum* (Sarımsak)

*LSBS – *L. sulphureus*, Bolu'dan toplanan, Soxhlet yöntemi

*LSMS – *L. sulphureus*, Muğla'dan toplanan, Soxhlet yöntemi

MCF- 7 hücrelerin 100 µg/ml konsantrasyonunda uygulanan farklı ekstraktların etkilerinin sonucu yüzde olarak canlılık değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla ekstraktla muamele sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) değeri LSMM' nin 100 µg/ml konsantrasyonunda 98,14 µg/ml bulunmuştur Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: MCF -7 hücre soylarının 100µg/ml konsantrasyonunda, 48 saatlik uygulama sonrasındaki canlılık yüzde değerleri.

	<i>Allium sativum</i> 100µg/mL	<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bolu) 100µg/mL	<i>Laetiporus sulphureus</i> (Muğla) 100µg/mL	Yöntem
% Canlılık	60,3	62,6	49,8	Maserasyon
	103,88	81,16	83,83	Soxhlet

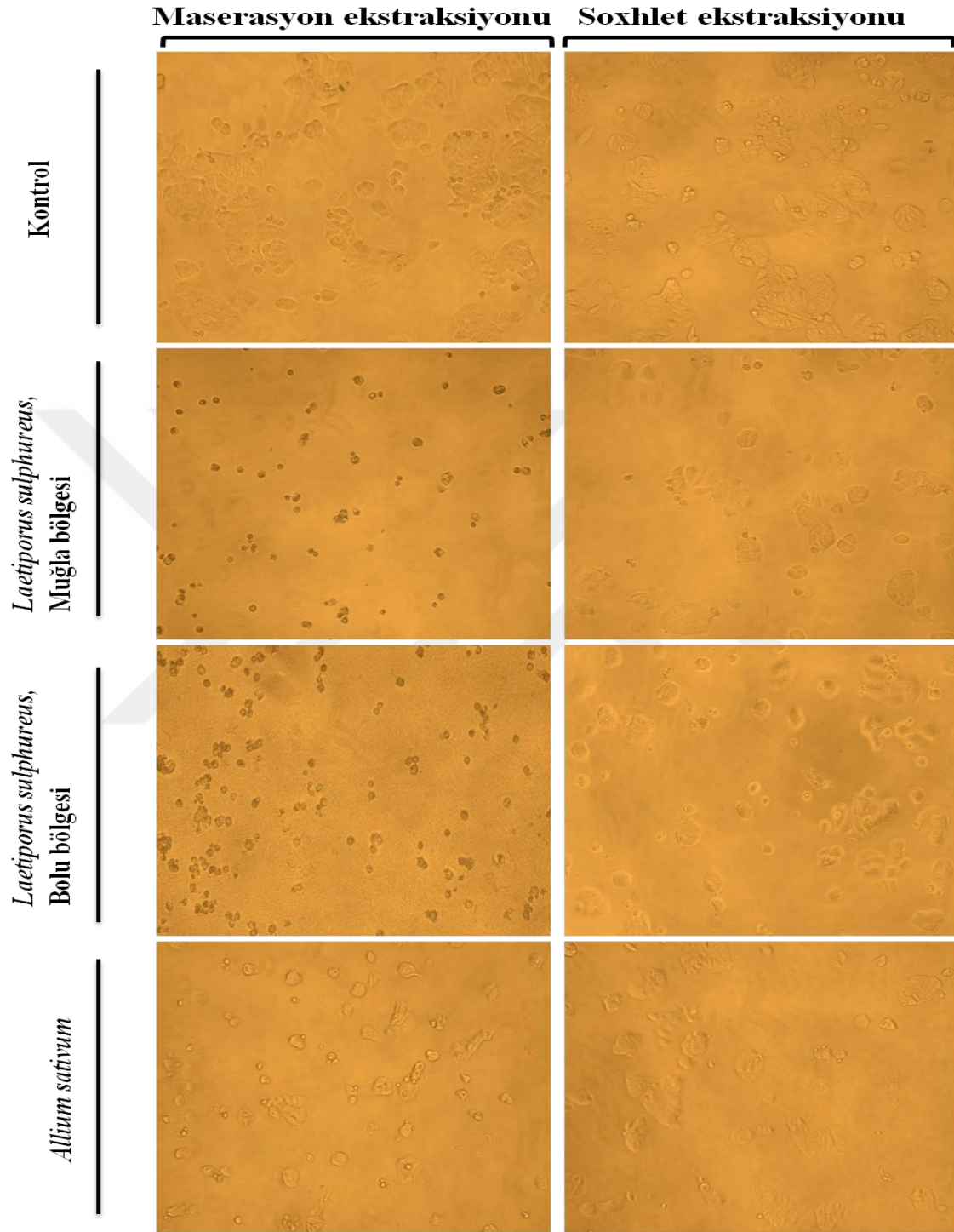
Tablo 4.2: LSMM uygulanan MCF -7 hücre soylarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre IC₅₀ değeri.

Hücre hattı	IC ₅₀ (µg/mL)
MCF -7	98,14

4.1.1. *Laetiporus sulphureus* ve *Allium sativum* Türlerinin Morfolojik Değerlendirme Sonuçları

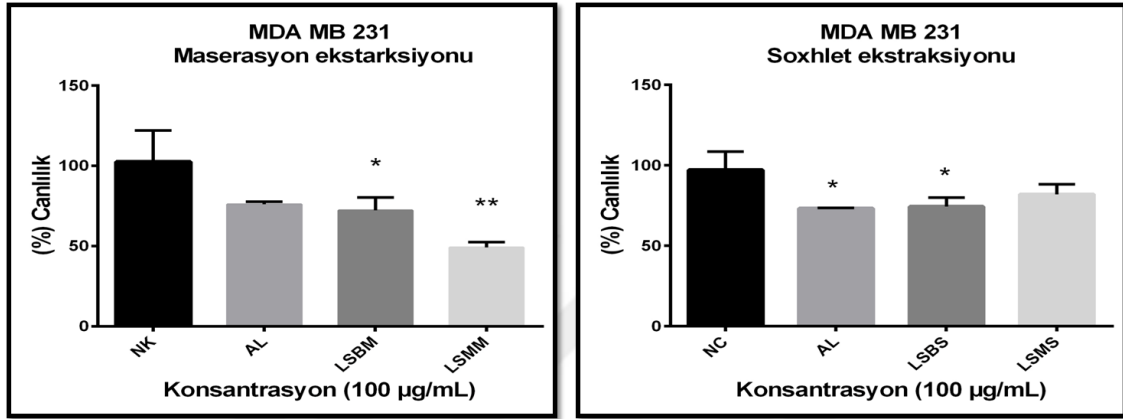
Laetiporus sulphureus ve *Allium sativum* türlerin ekstraktlarının, 100 µg/ml konsantrasyonunun MCF-7 hücre soyları üzerine 48 saatlik etkilerinin, faz-kontrast mikroskopik görüntüleri incelendiğinde, LSMM örneğinin hücre canlılığını azalttığı ve sitotoksik etki gösterdiği belirlendi (Şekil 4.3).

MCF - 7



Şekil 4.3: 100 µg/ml konsantrasyonunda uygulanan farklı ekstratlarının 48 saat sonra MCF- 7 hücrelerinin faz – kontrast morfolojik görüntüleri.

MDA-MB-231 hücre soylarına uygulanan, 48 saat süre ile mantar ve sarımsak ekstratlarının 100 µg/ml'lik konsantrasyonunda, MCF -7 hücre soylarında bulunan sonuca benzer sonuç elde edildi. Muğla'dan toplanan ve maserasyon yöntemiyle elde edilen mantar örneğiyle (LSMM), hücrelerin canlılık yüzdesinde (49,18) anlamlı azalma gözlemlendi ($p \leq 0.01$). Örneklerinin uygulamasını takiben elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'de gösterilmektedir.



Şekil 4.4: Sarımsak (*Allium sativum*) ve farklı mantar ekstraktlarının (*Laetiporus sulphureus*) MDA MB- 231 insan meme kanseri hücreleri üzerine 100 µg/ml konsantrasyonunda, 48 saatlik sitotoksik etkilerinin, SRB canlılık testi ile alınan sonuçları.

*Negatif kontrol (NK) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli farkları gösterir.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; ve *** $p \leq 0.001$.

*AL - *Allium sativum* (Sarımsak)

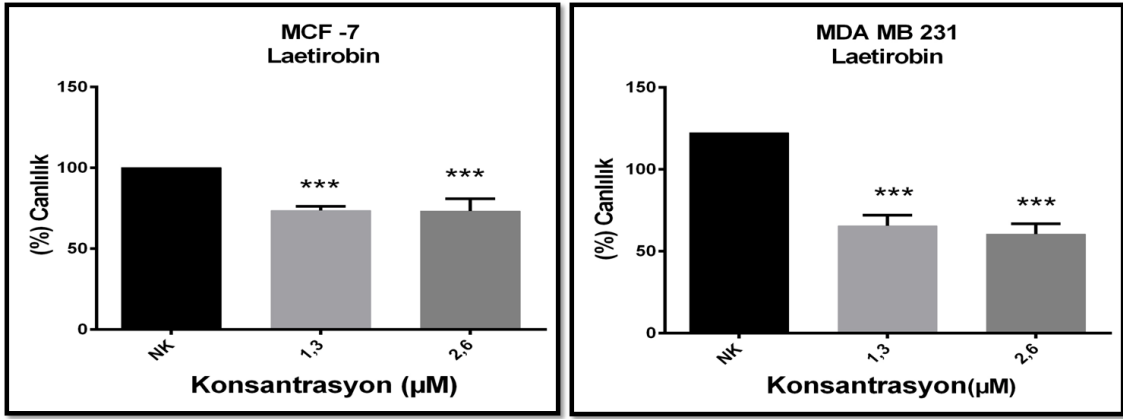
*LSBM – *L. sulphureus*, Bolu'dan toplanan, Maserasyon yöntemi

*LSMM – *L. sulphureus*, Muğla'dan toplanan, Maserasyon yöntemi

*LSBS – *L. sulphureus*, Bolu'dan toplanan, Soxhlet yöntemi

*LSMS – *L. sulphureus*, Muğla'dan toplanan, Soxhlet yöntemi

Laetiporus sulphureus'dan elde edilen Laetirobin bileşiğinin iki farklı konsantrasyonu (1,3 – 2,6 µM) 48 saat süre ile MCF -7 ve MDA-MB-231 hücre soylarına uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'de gösterildi. Bileşiğinin uygulandığı 2,6 µM konsantrasyonda MDA-MB-231 hücre soylarında önemli artışlar bulunamadı.

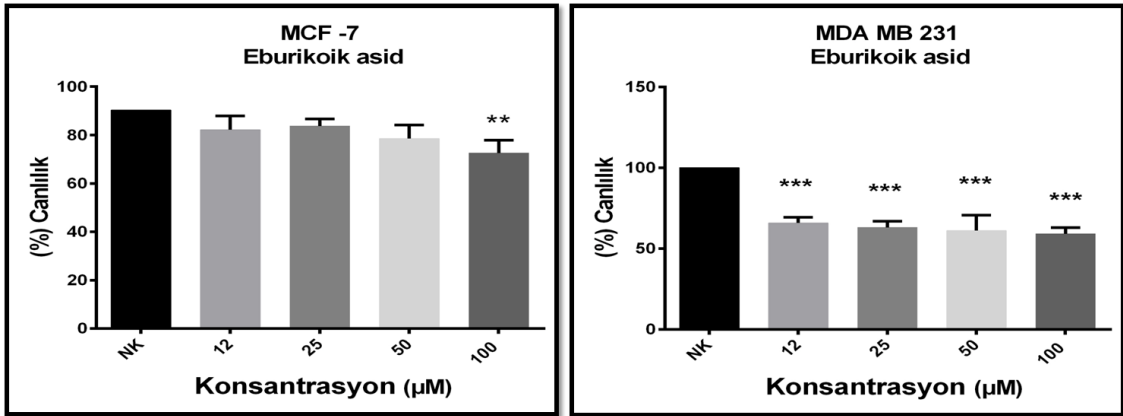


Şekil 4.5: MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücreleri üzerine Laetirobinin 48 saatlik uygulamanın SRB canlılık testi ile alınan sonuçları.

*Negatif kontrol (NK) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli farkları gösterir.

* p<0.05; ** p<0.01; ve *** p<0.001

Eburikoik asit bileşiğın farklı konsantrasyonlarda (12-100 μM) MCF -7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için SRB canlılık testi yapıldı. Hücre soylarına 48 saat süre ile eburikoik asit uygulamasını takiben elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'de gösterildi. Bileşiğın uygulandığı 100 μM konsantrasyonda MDA-MB-231 hücre soylarında önemli artışlar bulunamadı.



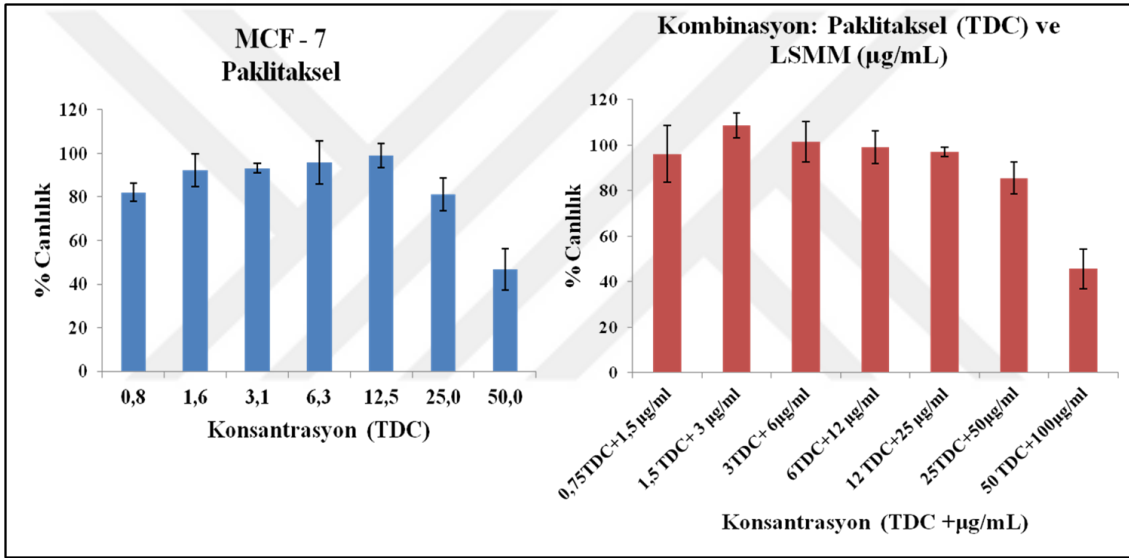
Şekil 4.6: MCF-7 ve MDA MB-231 insan meme kanser hücreleri üzerine Eburikoik asit 48 saatlik sitotoksik etkilerinin SRB canlılık testi ile alınan sonuçları:

*Negatif kontrol (NK) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli farkları gösterir.

* p<0.05; ** p<0.01; ve *** p<0.001

4.2. PAKLİTAKSEL VE LSMM EKSTRAKTININ KOMBİNASYONU

48 saat süre ile kemoterapide kullanılan paklitaksel MCF – 7 hücrelerine yedi farklı TDC (Test Drug Concentration) konsantrasyon uygulandı. Muğla bölgesinden toplanan ve maserasyon yöntemiyle elde edilen *Laetiporus sulphureus* ekstraktı (LSMM) yedi farklı konsantrasyonda paklitaksel ile kombine edilerek uygulandı. MCF – 7 hücre soylarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için SRB testi yapıldı. Ortaya çıkan sonuçlar Şekil 4.7’da gösterilmiştir.



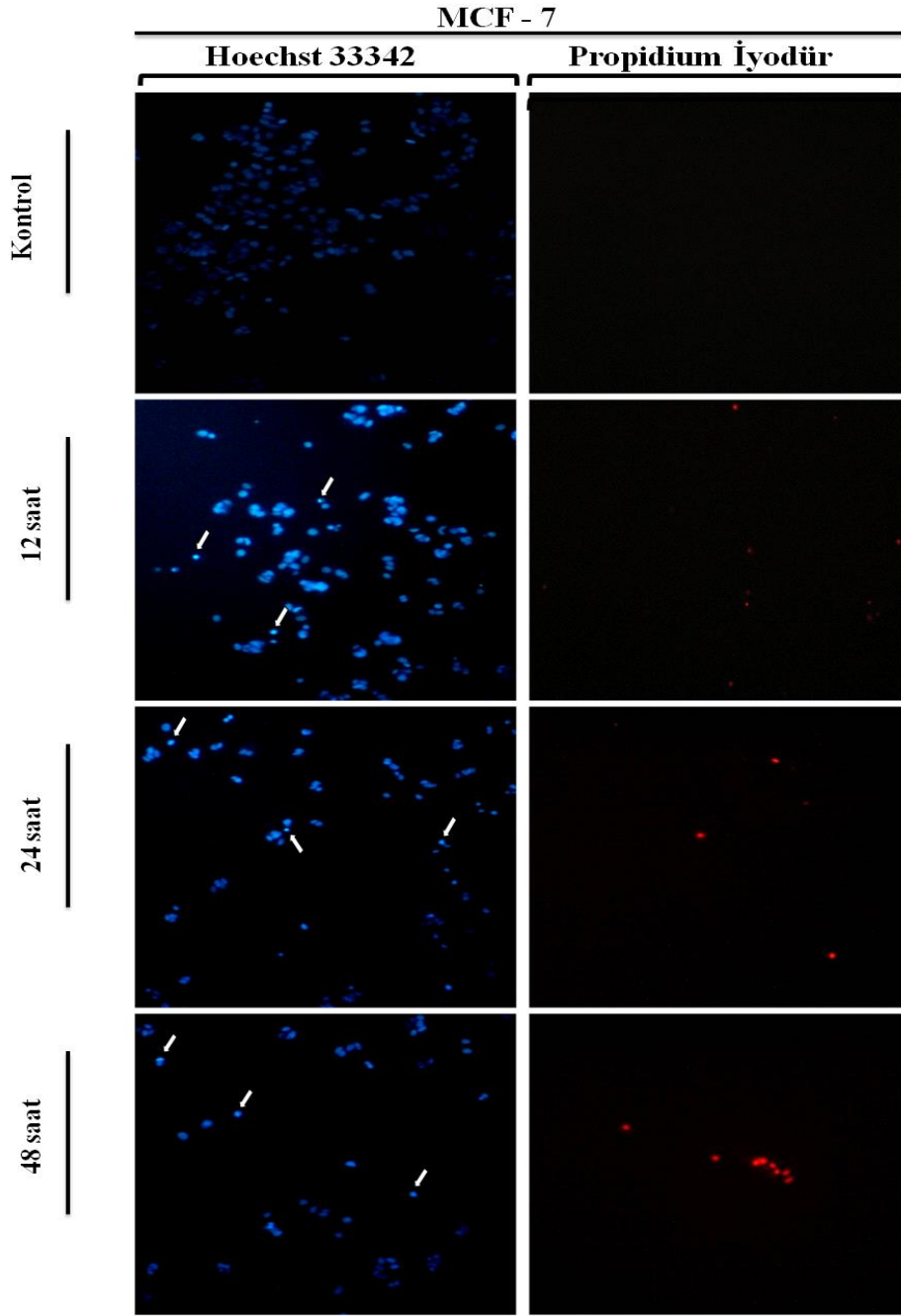
Şekil 4.7: Paklitaksel ve LSMM kombinasyonları ile 48 saat süreyle muamele edilen MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin grafiği.

Paklitaksel'in IC_{50} değeri SRB testi sonuçlarına göre 43,86 olarak bulundu. MCF -7 hücrelerinde uygulanan kombinasyon muamelesinin sonucunda LSMM ekstraktının aditif etki göstermediği bulunmuştur.

4.3. FLORESAN MİKROSKOBU İLE YAPILAN DEĞERLENDİRMELER

4.3.1. Hoechst 33342, Propidyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları

LSMM 100 µg/ml konsantrasyonunun 12, 24 ve 48 saatte MCF -7 hücrelerinin nukleus morfolojisi üzerine olan etkisi boyama yöntemi uygulanarak floresan mikroskopta değerlendirildi. Apoptotik hücrelerde; nukleusun normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken nekrotik hücrelerde nukleusun normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği arandı. Hoechst boyası (mavi), hücrelerin her türlü (canlı veya ölü) çekirdeklerini, PI boyama (kırmızı) geç evre apoptozu (ikincil nekroz, ölü hücreler) gösterir. Hoechst 33342 boyası ile gözlenen nukleer fragmentasyonun varlığı ve/veya piknozis, aynı bölgeler için propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile boyama pozitif görüldü (PI pozitifliği hücrelerin ölüm şeklinin geç apoptoz=sekonder nekroz olduğunu gösterir) (Şekil 4.8). Nukleer değişiklikler morfolojisi ve erken piknozisle birlikte hücre membranının bütünlüğünün kaybı (propidyum iyodür pozitifliği) yani sekonder nekroz, hücrelerin ölüm nedeninin tipik apoptozis olmadığını gösterir.

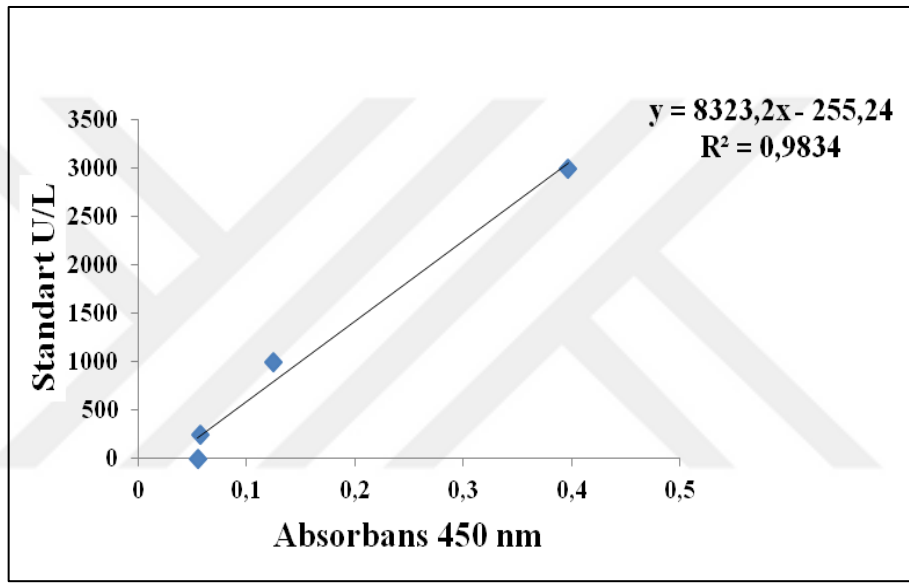


Şekil 4.8: MCF- 7 hücrelerinin 12, 24 ve 48 saatlik 100 µg/ml LSMM ekstartkı ile muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. Kontrol hücreleri üst kısımda gösterilmiştir.

Beyaz oklar: Hücre ölüm şekli olarak apoptozisi temsil eden piknotik nukleus ve /veya kondase kromatin varlığını göstermektedir.

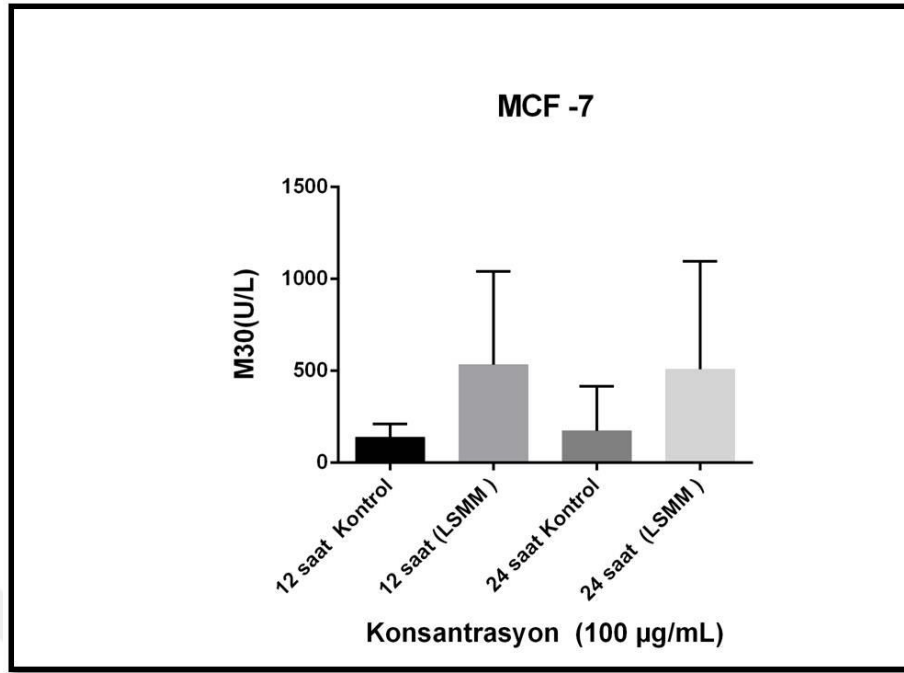
4.4. M30 ANTİJEN (KASPAZLA KIRILMIŞ SİTOKERATİN 18) BULGULARI.

LSMM'nin 100 µg/ml konsantrasyonunun hücreler üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği belirlendikten sonra hücre ölüm modunu, araştırmak amacıyla apoptozise özgü bir belirteç olan kaspazla-kırılmış CK18 düzeylerine bakıldı. M30-Antijen ölçümlerinin değerlendirilmesi için standart eğri grafiği hazırlandı. MCF 7 hücre soyları ile yapılan çalışmanın standart eğri grafiği şekil 4.9'de gösterilmiştir. Ölçülen absorbanslar standart eğri grafiği yardımıyla belirlenen formüller üzerinden değerlendirilerek M30 miktarları U/L cinsinden hesaplandı.



Şekil 4.9: MCF -7 hücre soyu ile yapılan çalışmanın M30-Antijen standart eğri grafiği.

MCF-7 hücrelerinde 100 µg/ml LSMM ekstraktının kontrole göre 12 saatlik muameleden sonra M-30 antijen seviyesinde 3,8 - katlık ve 24 saat ve 2,9 - katlık bir artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 4.10).

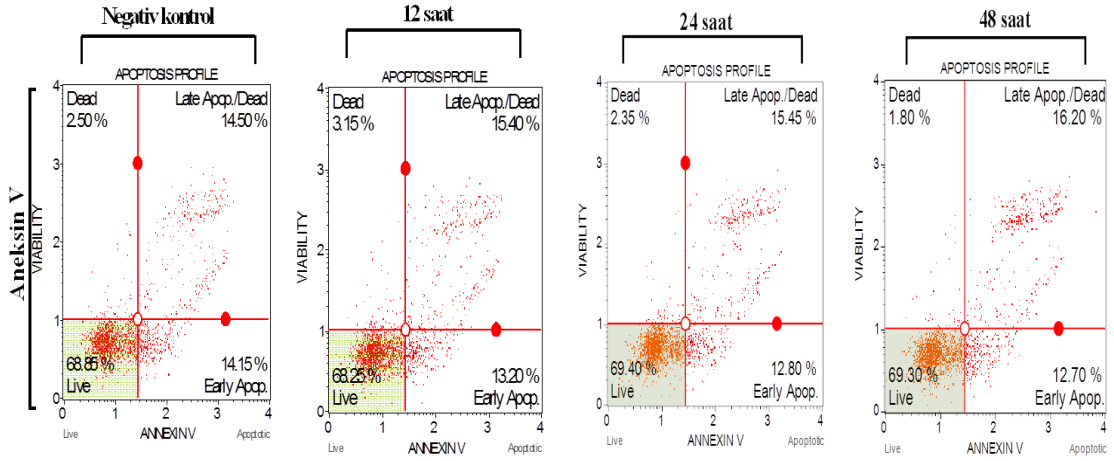


Şekil 4.10: 100µg/ ml LSMM ekstraktı 12 ve 24 saatlik uygulamadan sonra MCF-7 hücrelerinde M30-Antijen üzerine etkisi.

4.5. ANNEXİN/KASPAZ 3/7 BULGULARI

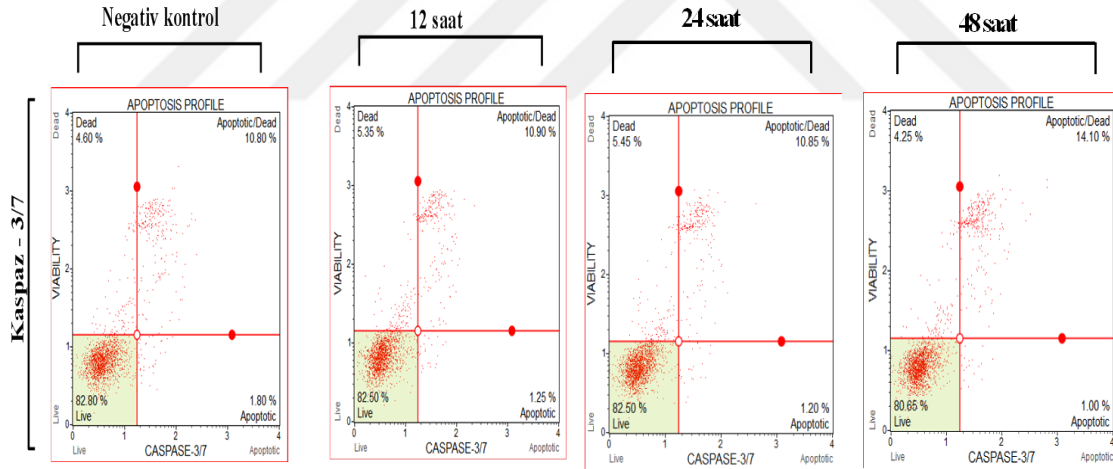
Canlı, erken/geç apoptotik ve ölü hücrelerin kantitatif analizi için akım sitometre ile Anneksin-V-FITC Boyama ve Kaspaz 3/7 aktivitesi belirlenerek sitofluorometrik analizi yapıldı. Akım sitometrisi ile hücre ölüm kinetiği parametrelerinin belirlenmesi için MCF-7 meme kanseri hücreleri 2×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekildikten 24 saat sonra, LSMM ekstraktı uygulandı. Hücreler 12, 24 ve 48 saat uygulama sonrasında, Anneksin-V-FITC boyama (Şekil.4.11.) ve Kaspaz 3/7 aktiviteleri (Şekil.4.12.) belirlendi.

Annexin-V(+) ve kaspaz 3/7 aktivitesinin yüzdeleri çok belirgin değildir. Nükleer değişiklikler morfolojisi ve erken piknozisle birlikte hücre membranının bütünlüğünün kaybı (propidium iyodür pozitifliği) yani sekonder nekroz, tipik apoptozis olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.11: Annexin-V boyanmasında Akım sitometri analizleri: MCF-7 hücrelerine 12, 24 ve 48 saat boyunca 100 µg/ml LSMM ile muamele edilmiştir.

Apoptotik hücrelerde transloke olan fosfatidilserin (Annexin V pozitifliği için) ve ölü hücrelerin eşzamanlı tespiti (7-AAD boya pozitifliği için), fluorimetric ayrımı ile dört hücre popülasyonu tespit edilir: apoptotik olmayan canlı (sol alt), apoptotik olmayan ölü (sol üst), erken apoptotik (sağ alt) ve geç apoptotik (sağ üst).

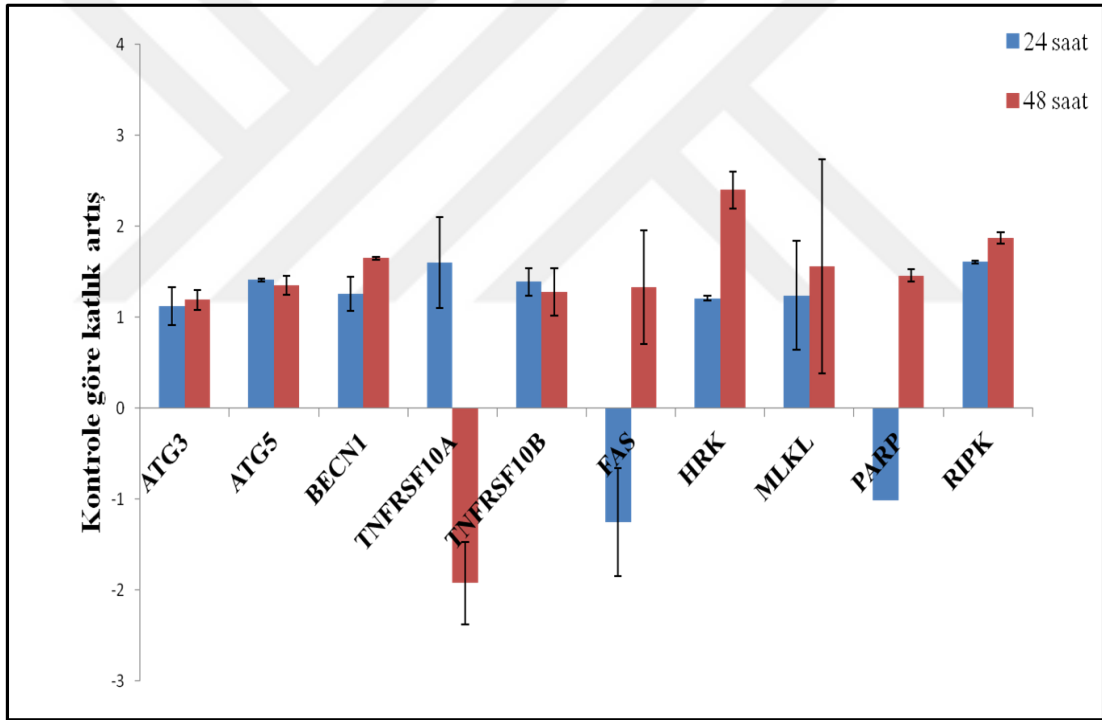


Şekil 4.12: Kaspaz -7 aktivitesi için Akım sitometri analizleri: MCF-7 hücrelerine 12, 24 ve 48 saat boyunca 100 µg/ml LSMM ile muamele edilmiştir.

Apoptotik hücrelerde pozitif Kaspaz aktivitesi ve ölü hücrelerin eşzamanlı tespiti (7-AAD boya pozitifliği için), fluorimetric ayrımı ile dört hücre popülasyonu tespit edilir: apoptotik olmayan canlı (sol alt), apoptotik olmayan ölü (sol üst), erken apoptotik (sağ alt) ve geç apoptotik (sağ üst).

4.6. APOPTOTİK GENLERİN EKSPRESYON PROFİLLERİ

Gen ekspresyon profillerini belirlemek amacıyla, MCF-7 hücre soylarına LSMM ekstraktı (100µg/ml) ile muamele edildi. 24 ve 48 saat sonra bazı apoptozis (FAS, HRK, TNFRSF10B, TNFRSF10A), nekrozis (PARPI, RIPKI, MLKL) ve otofaji (ATG3, ATG5 ve BECN1) genlerinin ekspresyonları üzerine olan etkisine bakıldı. PCR analizlerinde, gen ekspresyonlarında 1,5 ve üstü değerler anlamlı kabul edilerek yorumlanmıştır. Şekil 4.13'te gösterildiği üzere, MCF-7 hücre soylarında otofaji gen ekspresyon analizleri değerlendirildiğinde, LSMM ekstraktının 100 µg/ml konsantrasyonda genel olarak belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Buna rağmen aynı konsantrasyonda 24 ve 48 saat sonra RIPK (nekroptosis) genin ekspresyonunda sırasıyla 1,6 ve 1,8 kat artış görüldü.



Şekil 4.13: MCF-7 hücre soylarında, 24 ve 48 saatlik 100 µg/ml LSMM muamelesinin; otofaji, apoptozis ve nekroptosis ile ilgili genlerin ekspresyonları üzerine olan etkisinin gösterimi.

Gen ekspresyon analizi sonuçlarına göre, hazırlanan kontrollerde katlık artış grafiğinde 1,5 ve üzerindeki değerler anlamlı olarak kabul edilen artışlara göre aynı dozda 48 saat muameleden sonra HRK (pro-apoptotik) geninin 2,4 kat arttığı bulundu. Bu da iç yolak yani mitokondri üzerinden giden bir apoptozisi göstermektedir. TNFRSF10B ve FAS (iki gen de apoptozis

sinyalinin hücre içerisine aktarılmasında görev almaktadır) gen ekspresyonlarının azaldığı, “downregüle” olduğu görüldü. Bu da reseptörün bağımsız olabileceğini gösterir.

Erken piknozisle birlikte hücre membranının bütünlüğünün kaybı (propidyum iyodür pozitifliği) yani sekonder nekroz, tipik bir apoptozis olmadığını gösterir. Piknozis ve propidyum iyodür pozitifliğinin aynı anda görülmesi apoptozis benzeri, ölümü gösterir. Anxin V-FITC ve kaspaz sonuçlarının önemli değişiklikler göstermemiş olması buna bağlı olabilir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kadınlarda meme kanseri önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Dünya genelinde kadınlarda en sık rastlanan ve dünyada ikinci sırada yer alan kanser tipidir [148]. Uluslararası çalışmalara göre, bu kanser riski artmaktadır [149]. Tümör büyümesi ile ilişkili faktörler ve kanseri tedavi etmek için kullanılan konvansiyonel tedaviler sıklıkla meme kanseri hastalarında malnütrisyona neden olmaktadır. Geleneksel tedavilerden kaynaklanan yan etkiler, kalori alımının ve besinlerin emiliminin azalması gibi nedenler kanser tedavisini karmaşık hale getirebilir ve kanser hastalarının yaşam kalitesini düşürebilir [150].

Meme kanseri için birçok risk faktörü kolayca değiştirilemediğinden, değişime uğrayan faktörlere karşı önleyici tedbirler alınır. Bunların arasında diyet faktörleri belirtilebilir. Bitki ürünlerinin sınırlı miktarda tüketilmesi ve aşırı et alınması kanser insidansının yüksek olmasına katkıda bulunabilir. Beslenme; sağlığın korunmasında ve hastalığı önlemede önemli bir rol oynamaktadır. Sağlıklı bir diyet kronik hastalıkları, özellikle meme kanseri gibi ilerleyici hastalık riskini azaltır [151]. Buna göre, diyet takviyeleriyle özellikle de antioksidan, bağışıklık güçlendiriciler ve antikanser gibi maddelerle, kanser insidansını ve gelişimini azaltmak mümkün olabilir [152]. Epidemiyolojik çalışmalar, meyveler, bitkiler ve baharatlar açısından zengin diyetlerin kanser riski düşüklüğü ile ilişkili olduğunu göstermiştir [153].

Sarımsak kültive edilen en eski bitkiler arasındadır ve Asya, Avrupa ve Orta Doğu'da diyabet için kullanılan geleneksel bir diyet takviyesidir. Anti-viral, anti-bakteriyel, anti-fungal, antioksidan, anti-aterosklerotik ve anti-kanser özellikleriyle sarımsak, sağlıklı bir gıda olarak tanınmıştır [154]. Sarımsakta bulunan bileşikler, mutajenez inhibisyonu, enzim aktivitelerinin modülasyonu, DNA adukt inhibisyonu, apoptotik hücre ölümünün intrinsik yolağını etkilediği ve bunların tümünün anti kanser aktivitelerine katkıda bulunan hücre döngüsü mekanizmalarını da içeren çoklu yolakları hedef aldığı görülmektedir [155].

Tıbbi özelliklerinden dolayı, mantarlar geleneksel olarak bazı hastalıkların tedavisinde yüksek oranda terapötik uygulamalar için kullanılabilir. Mantarlar içerdikleri antioksidanlarla (polifenoller, vitaminler, doymamış yağ asitleri ve şekerler) doğal biyoaktif bileşenlerin mükemmel bir kaynağı olarak nutrasötik formülasyonlarda sağlıklı içerik olarak faydalı olabilir [156].

Son yıllarda kanser hücresi oluşumuna karşı koruyuculuk açısından bazı doğal kaynaklardan bahsedilmiştir. Dolayısıyla ekstrakte edilebilecek doğal terapötik bileşiklerin alternatif kaynağı olarak sarımsak ve mantar türleri, bilim insanlarının dikkatini çekmiştir.

Bu çalışmada iki farklı ekstraksiyon yöntemiyle (maserasyon ve soxhlet) elde edilen ekstraktlarının sitotoksik ve apoptotik etkileri, insan meme kanseri hücre soylarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) araştırılmıştır. Çalışmalar neticesinde, LSMM ekstraktla muamelenin sitotoksik aktivite ile sonuçlandığı gösterilmiştir ve literatürde bu ekstraktın kullanılması ile ilişkili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan bakılacak olursa, bu çalışma, söz konusu ekstraktın meme kanseri hücre soyları üzerinde sitotoksik aktiviteye yol açtığını gösterecek ilk çalışmadır.

Allium sativum L.(AL) ve *Laetiporus sulphureus*'un (LS) kanser hücreleri üzerine olası etkilerini belirleyebilmek amacıyla ham metanol ekstraktları hazırlanarak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerine olası büyümeyi baskılayıcı, sitostatik, sitotoksik, apoptotik etkilerini belirleyebilmek için SRB canlılık testi kullanılmıştır. *Laetiporus sulphureus* ekstraktı, kemoterapide kullanılan paklitaksel ile kombine edilerek MCF-7 hücrelerinin yanıtında değişiklik olup olmadığı incelenmiştir. Kükürt mantarında bulunan Laetirobin ve Eburikoik asid bileşiklerinin, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerine, SRB yöntemiyle sitotoksik etkileri araştırılmıştır. SRB canlılık testinin sonuçlarına göre, MCF-7 hücre soylarında, LSMM ekstraktının kontrasyon artışına bağlı olarak canlılık yüzdelerinde anlamlı azalmalar bulunmuştur ($p \leq 0.001$). SRB yöntemi esas alınarak 48 saatlik uygulama sonucu, IC₅₀ değeri MCF-7 hücre soyu için 98,14 µg/ml olarak hesaplanmıştır. İki hücre hattına 100 µg/ml LSMM ekstraktı uygulandığında canlılık oranları sırasıyla %49,8 ve %49,18 bulunmuştur.

LSMM 'nın 100 µg/ml konsantrasyonunun hücrelerde büyümeyi baskılayıcı etkiye neden olduğu belirlendi ve çalışmalara bu konsantrasyonla devam edildi.

Soxhlet yöntemiyle elde edilen bütün ekstraktlarının hücre canlılığı üzerinde etkili olmadığı görüldü. LSMM ve LSMS için hücre canlılığı üzerine bulunan farklı sonuçlar, biyoaktif bileşiklerinin aktivitesini maserasyon yönteminde korunduğunu göstermektedir.

Sarımsak ekstraktı uygulandığında, SRB canlılık testi sonuçlarına göre, söz konusu hücre soylarında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık yüzdesinde anlamlı azalmalar bulunmamıştır. Bu doğrultuda kullandığımız ekstraktın içerdiği büyümeyi; baskılayıcı,

sitostatik ve apoptotik etkiye sahip olan biyoaktif maddelerin konsantrasyonu muhtemelen düşük olduğu için kullanılan kanser hücrelerinin canlılık oranlarında azalma görülmemiştir.

Laetirobin ve eburikoik asit, *Laetiporus sulphureus*'da bulunan biyoaktif bileşiklerdir. Bu çalışmada, laetirobin (1.3 ve 2.6 μM) ve eburikoik asid (12 -100 μM) farklı konsantrasyonlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine uygulandı.

Laetiporus sulphureus'un ana biyoaktif bileşeni olan eburikoik asidin anti-inflamatuar ve tümör önleyici etkileri mide ülseri üzerinde araştırılarak değerlendirilmiştir. Eburikoik asidin oral yoldan verilmesi gastrik mukozayı lezyonlardan koruduğu ve özellikle H^+/K^+ -ATPaz aktivitesini azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, eburikoik asidin gastrik koruyucu etkisinin mide asidini inhibe edebileceğini göstermektedir [157].

Hücrel çalışmalarda laetirobinin hızla Neuro-2a tümör hücrelerine girdiği, geç mitoz fazında hücre bölünmesini engellediği ve apoptozu başlattığı gösterilmiştir [123].

Bu çalışmada laetirobin ve eburikoik asit bileşiklerinin uygulandığı MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine, büyümeyi önleyici belirgin etkisi olmadığı gösterildi. Hücrelerin arasındaki genetik ve fenotipik farklılıklar, sonucun olası sebeplerinden biri olabilir [158].

Bu çalışmada, yalnız başlarına kullanımlarına kıyasla daha güçlü bir etki yaratmak amacıyla LSM ve paklitaksel kombinasyonunun sitotoksik aktivitesi çalışılmıştır. Çalışmalar neticesinde, kombinasyon muamelesinin artmış bir sitotoksik aktivite ile sonuçlanmadığı gösterilmiştir.

Hücrelerin ölüm modunu belirleyebilmek amacıyla çalışmanın bir sonraki adımında, floresans boyalar kullanıldı. Hoechst 33342 ve propidyum iyodür kullanılarak ikili boyama yapıldı ve floresans mikroskopla görüntülendi. Hücre morfolojisini görüntüleyebilmek için faz/kontrast mikroskopuyla hücrelerin fotoğrafları çekildi. PI sadece hasarlı hücre membranından, hücre içine girebilen bir boya olduğu için tüm ölü hücreleri boyamaktadır. Hoechst 33342 ise canlı ve ölü tüm hücrelerin dsDNA'sına bağlanarak nükleus morfolojisini incelemeye olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte faz/kontrast mikroskopu görüntülerinde kontrol hücreleriyle kıyaslandığında apoptotik hücre morfolojisinin daha küçük ve büzölmüş; nekrotik hücre morfolojisinin de daha büyük ve şişmiş olarak gözlemlenmesi gerekmektedir.

MCF-7 hücre soyunda da 12, 24 ve 48 saatlik uygulama için 100 µg/ml LSMM kullanıldı. Buna göre, 48 saatlik 100 µg/ml LSMM uygulama sonucunda faz/kontrast mikroskobu görüntülerine göre morfolojik olarak küçülme gözlemlendi. Uygulama sonucu elde edilen ikili boyama görüntülerine göre her üç zaman aralığında da erken piknozisle birlikte hücre membranının bütünlüğünün kaybı (propidyum iyodür pozitifliği) yani geç apoptoz/sekonder nekrozis, tipik apoptozis olmadığını gösterir.

Piknozis ve propidyum iyodür pozitifliği aynı anda görülmesi, apoptozis benzeri ölüm olduğunu düşündürmektedir. Çalışmanın bir sonraki kısmında, hücrelerin ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptozis belirteci olan kaspaz ile kırılmış sitokeratin 18 (M30-Antijen) düzeylerine bakılmıştır. LSMM'nin 100 µg/ml uygulama sonrası, 12 ve 24 saatlik hücrelerin kaspaz ile kırılmış sitokeratin 18 düzeylerinde kontrole göre herhangi bir artışa neden olmadığı gözlemlendi. M30 seviyelerinin önemli oranda değişmemesinin altında farklı sebepler olabilir. Bunlardan biri hücrelerde CK18 eksikliği, diğeri ise CK18'in fragmantasyona uğramamış olmasıdır. MCF-7 hücrelerine uygulanan liken türlerinden olan *Hypogymnia physodes*'in metanol ekstraktı ile CK18 yüksek seviyeleri sergilendiği gösterilmiştir [158]. Bu sonuç, apoptotik sürecinde CK18'in parçalanmamasını ifade etmektedir. Diğer yandan, bunun sebebi LSMM ile birlikte MCF-7 hücre hattındaki apoptotik programın farklı zamanlamasının yanı sıra, ekstraktın farklı mekanizmaları tetiklemesi veya apoptozun farklı yoldan ilerlemesi düşünülmektedir [159]. Yapılan literatür taraması sonucunda LSMM ile yapılmış olan M30 çalışması bulunmamaktadır.

Bu çalışma, erken piknozis ile PI pozitifliğini aynı anda gözlemlemek, ortaya çıkan hücre ölümünün eksik apoptozis veya apoptoz benzeri hücre ölümü olarak tanımlandığını gösterdi. Çok sayıda değişik hücre ölümü son zamanlarda ortaya çıkmıştır [160]. Bununla birlikte, literatürde bu çalışmanın sonuçları ile karşılaştırma için kullanılacak herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Hücrelerin apoptoza uğramış olup olmadığını incelemek için MCF-7 hücrelerine uygulanan LSMM ekstraktın etkileri flow sitometri analizi ile anneksin V-bağlanması ve kaspaz 3/7 aktivitesi incelenmiştir.

Şekil 4.12.A ve 4.12.B' de gösterildiği gibi, farklı zaman sürelerinde (12, 24 ve 48 saat) uygulanan 100 µg/ml LSMM ekstraktının, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, MCF-7

hücrelerinin erken apoptotik popülasyonunda bir artışa neden olmadığı bulundu. Aynı şekilde geç apoptotik popülasyon seviyelerinin de 100 µg/ml LSMM ekstraktının uygulama sonrasında belirgin bir şekilde değişmediği tespit edildi. Mevcut çalışmanın sonuçları, erken piknotik nukleusların varlığı ve LSMM (100 µg/ml) ekstraktının apoptotik hücre ölümünü indükleyebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, Annexin V-bağlanması ve kaspaz 3/7 aktivasyonunun gözlemlenmemesi, hücre ölümünün tipik apoptotik hücre ölümü olmadığını işaret etmektedir.

Apoptozisi indükleyen bileşiklerin, bu süreçte hangi mekanizmaları etkinleştirdiklerinin bilinmesi, elde edilen bilgilerin kliniğe aktarılması/uyarlanması açısından oldukça önemlidir [161]. Bu düşünceden yola çıkılarak MCF-7 hücre soylarına uygulanan LSMM ekstraktın apoptozu indüklediği düşüncesini desteklemek için hücrelerin gen ekspresyon profilleri eş zamanlı PCR yöntemiyle incelenmiştir. Gen ekspresyon analizi sonuçlarında, hazırlanan kontrole göre 1,5 katlık artışlar ve üzerindeki değerler anlamlı olarak kabul edilmektedir [162].

MCF-7 hücrelere 24 ve 48 saatlik süreliğine 100 µg/ml LSMM ekstraktı uygulandı. Buna göre, 24 saatlik uygulama sonrasında, apoptotik geni olan TNFRSF10A (TNFRSF10A, TNF ailesine ait önemli bir TRAIL reseptörüdür ve ölüm reseptörü olarak antikanser ilaçlar tarafından indüklenen apoptosise katkıda bulunur [163] ve sonuçta RIPK'nin (RIPK1, TNF kaynaklı sinyal komplekslerinin temel bileşenidir; bu sinyal bileşenler apoptozise, nekroptozise ve NFκB ve MAP kinaz aktivasyonuna aracılık ederler [164]) gen ekspresyonları düzeyinde 1,6 kat artışa neden olduğu bulunmuştur. Bu durumda, TNFRSF10 A genindeki artış TNF reseptörlerinin sentezinde bir artış meydana getirir. Bu nedenle de MCF-7 hücre soyunun dışsal apoptotik yolak üzerinden ölüme gittiği söylenebilir.[165].

48 saatlik tedavi sonrasında ise BECN1(otofagik gen), RIPK1 ve HRK (apoptotik gen) düzeylerinde artış görülmektedir. Özellikle HRK genin 2,4 kat arttığı sonucu bulunmuştur. 24 ve 48 saatlik uygulamadan sonra RIPK1 geninin ekspresiyon seviyesindeki artış, hücrenin apoptoz yolağından ilerlediğini düşündürmektedir.

TNF reseptörü üzerinden RIP1 poliubikitinlenerek NF-κB'nin düzenleyici alt-birimi olan NEMO'ya bağlanır ve NF-κB aktivasyonunu hızlandırarak hayatta kalmayı önleyici genlerin uyarılmasına yol açar. Hücrenin sağkalımı bu yolağın bir sonucudur. Poliubikitinlenmiş RIP1, sitoplazmaya da göç edebilir. Burada RIP1ve RIP3 pro-nekrotik bir kompleks oluşturarak,

nekroptozu indükleyebilirler. Kaspaz-8'in etkinleştirildiği koşullarda, RIP1 ve RIP3, Kaspaz-8 tarafından parçalanır. Pro-nekrotik kompleks susturulur ve hücre apoptozise teşvik edilir [165, 166].

Otofaji hücre sel şartlara bağlı olarak bazen yaşam bazen de ölüm yolağı olarak görev yapabilmektedir [167,168]. MCF-7 hücrelerinde ekspresyon artışı görülen bir otofajik gen olan BECN1, vezikül trafiğini kontrol eden PI3K (fosfotidilinositol-3-kinaz) kompleksinin bir bileşeni olan Beklin1 proteininin sentezinden sorumludur. Bu durumda 48 saatte görülen BECN1 artışının yaşam yolağı olabileceği ancak uygulama saati uzatıldığında hücrenin toksisiteyle başa çıkamayıp otofaji yolağından da gittiği düşünülmüştür [169].

HRK geni kendisiyle aynı ismi taşıyan HRK proteini kodlamaktadır. Bu protein, hücre membranının sitoplazmaya bakan kısmında lokalize olur ve anti apoptotik Bcl-2, BclXL gibi proteinlere bağlanarak bunları inhibe eder. Böylece apoptozu indüklemiş olur [170,171]. Bu açıdan bakıldığında MCF-7 hücreleri için, hücre membranındaki ölüm reseptörleri yoluyla başlayan apoptotik sinyaller, pro-kaspaz-8'in aktifleşmesinden sonra mitokondriyal/içsel apoptotik sinyalizasyon yolağı üzerinden ilerlediği düşünülmektedir.

TNFRSF10B ve FAS (iki gen de apoptozis sinyalinin hücre içerisine aktarılmasında görev almaktadır) gen ekspresyonlarının azaldığı görüldü. 10q24 ve 8p22 kromozomlarında bulunan FAS ve TNFRSF10B genlerinde oluşabilecek nokta mutasyonlar sonucu, meme kanseri hücrelerinde apoptozun baskılandığı gösterilmiştir [172]. TNFRSF10B ve FAS gen ekspresyon seviyelerinin azalması mutasyona bağlı olabilir.

Erken piknozis ile birlikte hücre membranının bütünlüğünün kaybı (propidyum iyodür pozitifliği) yani sekonder nekroz, tipik apoptozis olmadığını gösterir. Piknozis ve propidyum iyodür pozitifliğinin aynı anda görülmesi apoptozis benzeri ölümü gösterir. Annexin V-FITC ve kaspaz3/7 sonuçlarında önemli değişiklikler görülmemiş olması buna bağlı olabilir.

Yapılan literatür taramalarında, LSMM ekstraktı ile yapılan çalışmalarda apoptotik, otofajik ve nekrotik etkilerin gen düzeyinde incelenmediği görülmüştür. Çalışma bu yönüyle literatüre katkı sağlamaktadır. *In vitro* çalışmasında, *Laetiporus sulphureus*'dan maserasyon yöntemiyle elde edilen metanol ekstraktının, (LSMM) MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre soylarında sitotoksik (sitostatik, büyümeyi baskılayıcı) etkileri belirlenerek bu konuda çok az olan literatür bilgisine katkıda bulunulmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarından yola çıkılarak

kullanılan LSMM ekstraktının kanser tedavisindeki büyüme baskılayıcı etkisinin bir sonraki inceleme basamağının, etken metabolitlerin izolasyonu ve bu metabolitlerin etki ettiği mekanizma ve hücre ölüm yollarının araştırılması olduğu sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

- [1]. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/>, [Ziyaret tarihi 10.02.2016].
- [2]. Lyon/Geneva, 12 December 2013, *Latest world cancer statistics*, The International Agency for Research on Cancer (IARC).
- [3]. Ankara, 2017, *Türkiye Kanser İstatistikleri*, T.C Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.
- [4]. American Cancer Society, Atlanta, Georgia, *Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016*.
- [5]. World Cancer Research Fund ,2007, American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*, Washington DC: AICR.
- [6]. Yılmaz M. Soner, 2014, Meme kanseri riskinin beslenme ile ilişkili faktörler açısından değerlendirilmesi, *Turk J Public Health* 2014;12(1).
- [7]. Ledesma N., 2015, *Nutrition & Breast Cancer*, University of California, San Francisco.
- [8]. World Cancer Research Fund International, 2014, *Breast Cancer Survivors Report 2014*.
- [9]. Colín-González AL, Santana RA, Silva-Islas CA, Chánez-Cárdenas ME, Santamaría A, Maldonado PD. *The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract-and S-allylcysteine-induced protection*. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012:907162. Doi: 10.1155/2012/907162. Epub 2012 May 17
- [10]. Preeti A., Pushpa S., 2012, Antioxidant Mushrooms: A Review, *International Research Journal of Pharmacy*, ISSN 2230 – 8407.
- [11]. Olennikov DN, Tankhaeva LM, Agafonova SV., 2011, Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. fruit bodies, *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2011 Jul-Aug;47(4):462-8. Russian. PubMed PMID: 21950122.
- [12]. Aliustaoğlu M.2014, *Temel Kanser Fizyopatolojisi*, Haydarpaşa Numune Hastanesi Onkoloji Ünitesi, İstanbul.
- [13]. Oğur G., *Kanser ve Genetik.*, Ondokuz Mayıs Üniversitesi.
- [14]. Ayhan A.2007, *Temel Patoloji, Bolum: 7. Neoplazi*, Seirei Mikatahara Hospital, Hamamatsu University School of Medicine.
- [15]. Çefle K., *Kanser Genetiği*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, İstanbul.

- [16]. Murray R.,1996, *Harper'in Biyokimyası*. Yirmidördüncü baskı. İstanbul.
- [17]. Yılmaz E., Altunok V., 2011, Kanser ve p53 Geni, Derlemeler, *Avkae Dergisi* (2011)1:19-23.
- [18]. Hanahan D., Weinberg R., 2011., Hallmarks of Cancer, The Next Generation, Review, *Cell* March 2011, pp. 57-70.
- [19]. http://vet.uga.edu/ivcvm/courses/VPAT5200/04_growth/05_carcinogenesis/index.htm, [Ziyaret tarihi 11.11.2015].
- [20]. http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/educacion/01102014_CARCINOGENESIS_II.pdf, [Ziyaret tarihi 05.12.2015].
- [21]. Kerbel RS, Ellis LM. Angiogenesis. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA; eds. *Cancer. 8 th ed.* Philadelphia: Lippicott-Williams&Wilkins; 2008:103-116.
- [22]. Song Y., Samulski TD., Van DykeTA., Cancer. İn: De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA; ads. *Cancer 8 th. ed.* Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins; 2008: 3-12.
- [23]. Ahmet Aydın, *Kanser ve Beslenme*, Türkiye Bilimler Akademisi, 23.05.2015
- [24]. Ardekani AM, Jabbari S.,2009, Nutrigenomics and cancer. *Avicenna J Med Biotechnol.* Apr;1(1):9-17. PubMed PMID: 23407612; PubMed Central PMCID: PMC3558114.
- [25]. S. Koçak1, L. Çelik, S. Özbaş, S. Dizbay Sak, A. Tükün, B. Yalçın, 2011, Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Riskin Değerlendirilmesi Ve Prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu, *Meme Sağlığı Dergisi* Cilt: 7, Sayı: 2.
- [26]. Ozmen V, Ozcinar B, Karanlık H and all., 2009, Breast cancer risk factors in Turkish women--a University Hospital based nested case control study. *World J Surg Oncol.* Apr 8; 7:37. doi: 10.1186/1477-7819-7-37. PubMed PMID: 19356229.
- [27]. Öztürk M.,2006, Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri, Ü. Cerrahpafla, Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Meme Kanseri, Sempozyum Dizisi* No: 54, Aralık 2006; s. 15 – 26.
- [28]. Haydaroğlu A., 2012., Meme Kanserinde Yerel Kontrole Etki Eden Prediktif Moleküler ve Genetik Faktörler, Derleme, *Meme Sağlığı Dergisi* 2012 Cilt: 8 Sayı: 4.
- [29]. Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS.,1995, Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology.* Jun;136(6):2770-5. PubMed PMID:7750502.
- [30]. Öztürk F (2002) Apopitoz, *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (2): 143-148.

- [31]. Hasan A. 2007, Deneysel olarak oluşturulan fibrosarkomalarda programlanmış hücre ölümünün çekirdekdeki dna parçalanması tayini ve immunohistokimyasal olarak gösterilmesi, Yüksek Lisans, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya AD, Adnan Menderes Üniversitesi.
- [32]. Altunkaynak BZ, Özbek E, 2008, Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir? *Tıp Araştırmaları dergisi*:2008: 6(2):93-104.
- [33]. Ulukaya E, 2003, *Hücre Ölümünün Tıp ve Biyolojik Bilimlerdeki Önemi ve İlgili Serum Belirteçleri*, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.
- [34]. Messmer UK, Pfeilschifter J., 2000, New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays*. 2000 Oct;22(10):878-81. Review. PubMed PMID: 10984713.
- [35]. Dayan YB, Kaveri SV, Kazatchkine MD, Shoenfeld Y, 2000, Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies? *Medical Hypotheses*, 55(2): 103–108.
- [36]. Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719–727.
- [37]. Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 87: 171.
- [38]. Cryns, V., Yuan, J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev.*, 12: 1551-1570
- [39]. Gewis, A., 2003, Introduction to Apoptosis, *ApoReview*, 1-26.
- [40]. Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo P. 2000. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat.Cell Biol.* 2: 241-243.
- [41]. Tait, S.W., Green, D.R. 2010., Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11: 621-632.
- [42]. Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005., Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy., *Cancer J Clin.* 55: 178 –194.
- [43]. Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V., 2012., Role of Apoptosis in disease, *AGING*, 4: 330-349.
- [44]. Rao, R.D., Cobleigh, M.A., Gray, R., Graham, M.L., Norton, L., Martino, S., Budd, G.T., Ingle, J.N., Wood, W.C. 2011., Phase III double-blind, placebo controlled, prospective randomized trial of adjuvant tamoxifen vs. tamoxifen and fenretinide in postmenopausal women with positive receptors (EB193): an intergroup trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group., *Med Oncol.* 1: S39-47.

- [45]. Yılmaz İ., 2005, *Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikozektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi*, Uzmanlık tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği.
- [46]. http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/, [Ziyaret tarihi 30.07.2016].
- [47]. Ding WX, Yin XM, 2009, The Bcl-2 Family Proteins, Essentials of Apoptosis, *Humana Press, a part of Springer Science+Business Media*, DOI 10.1007/978-1-60327-381-7_2.
- [48]. Youle RJ, Strasser A.,2008, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jan; 9(1):47-59. Review. PubMed PMID: 18097445.
- [49]. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM.,2010, Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Apr;1813(4):521-31.
- [50]. Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW.,2008, Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene.*2008 Dec;27 Suppl 1: S93-104.
- [51]. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Velde CJH, Cornelisse CJ, Dierendonck JHV, 1993, A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ end-labeling of fragmented DNA, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41 (1): 7-12.
- [52]. Narula J, Kharbanda S, Khaw BA.,1997, Apoptosis and the Heart. *Chest* 112:135862.
- [53]. Walker NI, Harnon BW, Gobe GC, Kerr JF.,1998, Patterns of cell death. *Methods AchievExp Pathol.*, 13: 18-54.
- [54]. Öktem S, Özhan MH, Özol D, 2001, Apoptozisin önemi, *Toraks Dergisi*, 2 (1): 9195.
- [55]. Tomatır AG, 2003, Apoptoz; programlı hücre ölümü, *T. Klin. J. Med. Sci.*, 23: 499-508.
- [56]. Saraste A, Pulkki K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovascular Research*, 45: 528–537.
- [57]. Savill, J., Fadok, V. 2000, Corpse clearance defines the meaning of cell death, *Nature*, 407: 784–788.
- [58]. Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., and Kobayashi, Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J. Immunol.*, 171: 4672–4679.
- [59]. Cummings M C, Winterford C M, Walker N I.,1997, Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 21: 88-101.

- [60]. Majno G, Torisl A.,1995, Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 146: 3-15.
- [61]. Roche Applied Science, 2010, *Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation*, 3rd edition.
- [62]. Bellamy C O, Malcomson R D, Harrison D J, Wyllie A H.,1995, Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis.,*Cancer Biology* 6: 3-16, 1995.
- [63]. Kendir, G., ve Güvenç, A., 2010, Etnobotanik ve Türkiye’de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 30: 49-80.
- [64]. American Cancer Society, 2009, *American Cancer Society complete guide to complementary & alternative cancer therapies*. 2nd ed. Atlanta, Ga.: American Cancer Society; 2009. p.890
- [65]. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H.,2004, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 2004 Mar 12;74(17):2157-84.
- [66]. Kadifkova Panovska T, Kulevanova S, Stefova M.,2005, In vitro antioxidant activity of some Teucrium species (Lamiaceae), *Acta Pharm*,2005 Jun;55(2):207-14.
- [67]. Leaman, D. J., 2004, Sustainable wild collection of medicinal and aromatic plants: practice standards and performance criteria, *Medicinal Plant Conservation*, 9(10), 7-8.
- [68]. http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/, [Ziyaret tarihi 30.07.2016].
- [69]. Couladis, Maria, et al.,2003, Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity, *Phytotherapy research* 17.2, 2003: 194-195.
- [70]. Capecka, Ewa, Anna Mareczek, and Maria Leja.,2005, Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species, *Food chemistry* 93.2, 2005: 223-226.
- [71]. Gali-Muhtasib HU, Younes IH, Karchesy JJ, el-Sabban ME, 2001, Plant tannins inhibit the induction of aberrant crypt foci and colonic tumors by 1,2-dimethylhydrazine in mice, *Nutr Cancer*,2001;39(1):108-16.
- [72]. Nakagawa, T., and T. Yokozawa. "Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea." *Food and Chemical Toxicology* 40.12 (2002): 1745-1750.
- [73]. Lam M.,2003, *Beating cancer with natural medicine*, ISBN: 1-4107-3244-4 (e-book).
- [74]. Taşköprü sarımsak paneli, 6 Şubat 2012, Kastamonu.
- [75]. Jones, H.A and Mann, L.K. 1963. Onions and their *Allies*, *Leonard Hill*, 285 p., London.
- [76]. Brewster, James L., and Haim D. Rabinowitch, 1990, *Onions and Allied Crops 3 Vols.* CRC Press, 1990.

- [77]. Friesen N, Fritsch RM., R. Blattner FR., 2006, Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (*Alliaceae*) based on nuclear ribosomal DNA its sequences, *Rancho Santa Ana Botanic Garden*, pp. 372–395
- [78]. Block E.,1992., The Organosulfur Chemistry of the Genus *Allium*- Implications for the Organic Chemistry of Sulfur, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992, 3f, 1135-1178.
- [79]. Oommen S, Anto RJ, Srinivas G, Karunagaran D.,2004, Allicin (from garlic) inducescaspase-mediated apoptosis in cancer cells, *Eur J Pharmacol*, 2004 Feb6;485(1-3):97-103.
- [80]. Rivlin RS., 2001, Historical perspective on the use of garlic, *J Nutr.*,2001, Mar;131(3s):951S-4S.
- [81]. Tyagi S., Chiragp P., Poonam D. et Al., Importance of garlic (*Allium Sativum*): An exhaustive review, *Journal Of Drug Discovery And Therapeutics* 1 (4) 2013, 23-27, Issn: 2320 – 4230.
- [82]. Kathi J. Kemper, 2000, Garlic (*Allium sativum*), *Longwood Herbal Task Force*: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>, March 8, 2000.
- [83]. S. Ejaz, L.C. Woong, A. Ejaz, 2003, Extract of garlic (*allium sativum*) in cancer chemoprevention, *Experimental Oncology* 25, 93 -97, June 2003.
- [84]. Bianchini F, Vainio H.,2001, *Allium* vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer? *Environ Health Perspect.* 2001 Sep;109(9):893-902.
- [85]. Fisher CD, Augustine LM, Maher JM at al., 2007, Induction of drug-metabolizing enzymes by garlic and allyl sulfide compounds via activation of constitutive androstane receptor and nuclear factor E2-related factor 2, *Drug Metab Dispos*, 2007 Jun;35(6):995-1000.
- [86]. Yoshimoto N, Yabe A, Sugino Y, at al., 2015, Garlic γ -glutamyl transpeptidases that catalyze deglutamylation of biosynthetic intermediate of alliin, *Front Plant Sci*, 2015 Jan 8;5:758.
- [87]. Gao C, Jiang X, Wang H, Zhao Z, Wang W.,2013, Drug Metabolism and Pharmacokinetics of Organosulfur Compounds from Garlic, *J Drug Metab Toxicol* 4:159.
- [88]. Pandrangi A.,2015, Cancer Chemoprevention by Garlic- A Review, *Hereditary Genet* 4:147.
- [89]. Willett WC., 1995, Diet, nutrition, and avoidable cancer, *Environ Health Perspect.*1995 Nov;103 Suppl 8:165-70.
- [90]. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergkvist L, Hansen H, Holmberg L, Wolk A., 2001, Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer, *J Natl Cancer Inst.* 2001 Apr 4;93(7):525-33.

- [91]. Kleijnen J, Knipschild P, Ter Riet, 1989, G. Garlic, onions and cardiovascular risk factors. A review of the evidence from human experiments with emphasis on commercially available preparations., *Br J Clin Pharmacol*, 1989 Nov;28(5):535-44.
- [92]. Banerjee SK, Mukherjee PK, Maulik SK.,2013, Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly, *Phytother Res.*, 2003 Feb;17(2):97-106.
- [93]. Fujita K, Kamataki T.,2001, Screening of organosulfur compounds as inhibitors of human CYP2A6. *Drug Metab Dispos.* 2001 Jul;29(7):983-9.
- [94]. Gallwitz H, Bonse S, Martinez-Cruz A, Schlichting I, Schumacher K, Krauth-Siegel RL.,1999, Ajoene is an inhibitor and subversive substrate of human glutathione reductase and Trypanosoma cruzi trypanothione reductase: crystallographic, kinetic, and spectroscopic studies., *J Med Chem.*, 1999 Feb 11;42(3):364-72.
- [95]. Dirsch VM, Gerbes AL, Vollmar AM.,1998, Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor kappaB., *Mol Pharmacol.*, 1998 Mar;53(3):402-7.
- [96]. Durak I, Kavutcu M, Aytaç B, Avci A, Devrim E, Ozbek H, Oztürk HS.,2004, Effects of garlic extract consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in humans with high blood cholesterol. *J Nutr Biochem.* 2004 Jun;15(6):373-7.
- [97]. Lee JE, Lee RA, Kim KH, Lee JH.,2011, Induction of apoptosis with diallyl disulfide in AGS gastric cancer cell line., *J Korean Surg Soc.* 2011 Aug;81(2):85-95.
- [98]. Wang HC, Yang JH, Hsieh SC, Sheen LY.,2010, Allyl sulfides inhibit cell growth of skin cancer cells through induction of DNA damage mediated G2/M arrest and apoptosis., *J Agric Food Chem.* 2010 Jun 9;58(11):7096-103.
- [99]. Wang HC, Pao J, Lin SY, Sheen LY.,2012, Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression., *Ann N Y Acad Sci.*, 2012 Oct;1271:44-52.
- [100]. Gonzalez FJ.,1991, Human cytochrome P450: possible roles of drug-metabolizing enzymes and polymorphic drug oxidation in addiction. *NIDA Res Monogr.*1991;111:202-13.
- [101]. Tsubura A, Lai YC, Kuwata M, Uehara N, Yoshizawa K.,2011, Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. *Anticancer Agents Med Chem.*, 2011 Mar;11(3):249-53.
- [102]. Zhang YS, Chen XR, Yu YN.,1989, Antimutagenic effect of garlic (*Allium sativum L.*) on 4NQO-induced mutagenesis in Escherichia coli WP2. *Mutat Res.* 1989 Dec;227(4):215-9.

- [103]. Knasmüller S, de Martin R, Domjan G, Szakmary A.,1989, Studies on the antimutagenic activities of garlic extract., *Environ Mol Mutagen*, 1989;13(4):357-65.
- [104]. Lu HF, Sue CC, Yu CS, Chen SC, Chen GW, Chung JG.,2004, Diallyl disulfide (DADS)induced apoptosis undergo caspase-3 activity in human bladder cancer T24 cells., *Food Chem Toxicol.*, 2004 Oct;42(10):1543-52.
- [105]. Shukla Y, Taneja P.,2002, Antimutagenic effects of garlic extract on chromosomal Aberrations, *Cancer Lett.*, 2002 Feb 8;176(1):31-6.
- [106]. Sharma Pushpa Et Al., 2012, Antioxidant Mushrooms: A Review, *International research journal of pharmacy*, 2012, 3 (6), Issn: 2230-8407.
- [107]. Singh SS, Wang H, Chan YS, Pan W, Dan X, Yin CM, Akkouch O, Ng TB.,2014, Lectins from edible mushrooms, *Molecules*, 2014 Dec 31;20(1):446-69.
- [108]. Roupas P., Krause D., Taylor P., 2014, *Mushrooms and health 2014: Clinical and nutritional studies in humans*, CSIRO Food and Health Flagship.
- [109]. Davoli P, Mucci A, Schenetti L, Weber RW.,2005, Laetiporic acids, a family of non-carotenoid polyene pigments from fruit-bodies and liquid cultures of *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi), *Phytochemistry*, 2005 Apr;66(7):817-23.
- [110]. Doğan H.H., Öztürk C., Kaşık G. and Aktaş S., 2005, A checklist of Aphyllophorales of Turkey, *Pak. J. Bot.*, 37(2): 459-485, 2005.
- [111]. Schlosser D. and Hofer C., 2002, Laccase-Catalyzed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase, *Applied and environmental microbiology*, July 2002, P. 3514–3521.
- [112]. Özcan B., Topçuoğlu S.F., 2001, GA3, ABA and Cytokinin Production by *Lentinus tigrinus* and *Laetiporus sulphureus* Fungi Cultured in the Medium of Olive Oil Mill Waste, *Turk J Biol.*,25 (2001) 453-462.
- [113]. Okamura T, Takeno T, Dohi M, Yasumasa I, Hayashi T, Toyoda M, Noda H, Fukuda S, Horie N, Ohsugi M.,2000, Development of mushrooms for thrombosis prevention by protoplast fusion, *J Biosci Bioeng*, 2000;89(5):474-8.
- [114]. Türkoğlu A., Duru M.E. and Mercan N., 2007, Antioxidant and antimicrobial activity of *Russula delica* Fr: An edible wild mushroom, *Eurasian Journal of Analytical Chemistry* Volume 2, Number 1, 2007.
- [115]. Jayasooriya RG, Kang CH, Seo MJ, Choi YH, Jeong YK, Kim GY.,2011, Exopolysaccharide of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* downregulates LPS-induced production of NO, PGE_2 , and TNF- α in BV2 microglia cells via suppression of the NF- κ B pathway., *Food Chem Toxicol.* 2011 Nov;49(11):2758-64.

- [116]. Lung M-Y., Huang W-Z, 2012, Antioxidant properties of polysaccharides from *Laetiporus sulphureus* in submerged cultures, *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(23), pp. 6350-6358, 20 March, 2012.
- [117]. Ríos JL, Andújar I, Recio MC, Giner RM.,2012, Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds, *J. Nat. Prod.*, 2012 Nov 26;75(11):2016-44.
- [118]. León F, Quintana J, Rivera A, Estévez F, Bermejo J.,2004, Lanostanoid triterpenes from *Laetiporus sulphureus* and apoptosis induction on HL-60 human myeloid leukemia cells., *J Nat Prod.* 2004 Dec;67(12):2008-11.
- [119]. Gascoigne R.M., Holker J.S.E., Ralph B.J.,1950, *Nature*, October 14,1950, Vol.166.
- [120]. Shiono Y, Tamesada Y, Muravayev YD, Murayama T, Ikeda M. N.,2005, Phenethylhexadecanamide from the edible mushroom *Laetiporus sulphureus*, *Nat Prod Res.* 2005 Jun;19(4):363-6.
- [121]. Su Y-C, Liu C-T, Chu Y-L, Raghu R., Kuo Y-H., and Sheen L-Y., 2011, Eburicoic acid, an active triterpenoid from the fruiting bodies of basswood cultivated *Antrodia cinnamomea*, induces ER stress-mediated autophagy in human hepatoma cells, *Journal of Traditional and Complementary Medicine* Vol.2, No.4 , pp.312-322.
- [122]. Lear MJ, Simon O, Foley TL, Burkart MD, Baiga TJ, Noel JP, DiPasquale AG, Rheingold AL, La Clair JJ.,2009, Laetirobin from the parasitic growth of *Laetiporus sulphureus* on *Robinia pseudoacacia*., *J Nat Prod.* 2009 Nov;72(11):1980-7.
- [123]. Jordan, G., Vivien, W., 2001., *The Story of Taxol: Nature and Politics in the Pursuit of an Anti-Cancer Drug*. Cambridge University Press. p. 17. ISBN 0-521-56123.
- [124]. Rajnish, B., Hongtao, Y. 2004. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*, 23: 2016–2027.
- [125]. Rowinsky, E.K. 1997. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents, *Annual review of medicine*, 48(1): 353-374.
- [126]. Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. 2011. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Func.* 29: 468-480.
- [127]. Leers, M.P., Kölgen, W., Björklund, at al., 1999, Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol.*, 187: 567-72.
- [128]. Ueno, T., Toi, M., Bivén, K., Bando, H., Ogawa, T., Linder, S. 2003. Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients, *European Journal of Cancer*, 39: 769-74.

- [129]. Micha, D., Cummings, J., Shoemaker, A., Elmore, S., Foster, K., Greaves, M., Ward, T., Rosenberg, S., Dive, C. & Simpson, K. 2008. Circulating biomarkers of cell death after treatment with the BH-3 mimetic ABT-737 in a preclinical model of small-cell lung cancer, *Clin Cancer Res.* Vol. 14, no. 22, pp. 7304–7310.
- [130]. Taneli F. 2007, Methodology of Flow Cytometry and Its Role in Clinical Laboratory, *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 2007; 5(2): 75-82.
- [131]. Ulukaya E. 2003, Apoptozis ders notları, http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf [Ziyaret tarihi:27 Mart 2016].
- [132]. <http://synentec.com/solutions/cell-line-development>, [Ziyaret tarihi: 25.12.2016].
- [133]. Millipore, Guava., *Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide* March 6, 2013, Revision B Part No. 4600-3384 MAN.
- [134]. Riedl SJ, Shi Y., 2004, Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2004 Nov;5(11):897-907.
- [135]. Porter AG, Jänicke RU., 1999, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death Differ.* 1999 Feb;6(2):99-104.
- [136]. Liu X, Chen H, Patel DJ., 1991 Solution structure of actinomycin-DNA complexes: drug intercalation at isolated G-C sites. *J Biomol NMR.* 1991 Nov;1(4):323-47.
- [137]. Viljoen G.J., Nel L.H., Crowther J.R., 2005, *Molecular Diagnostic PCR Handbook*, ISBN-10 1-4020-3404-0 (e-book).
- [138]. <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>, [Ziyaret tarihi 07.01.2017].
- [139]. Grove D., 1999, Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT.* 1999;10(1):11-16.
- [140]. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH., 1991, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991;88(16):7276-7280.
- [141]. Livak, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995, Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4: 357-362.
- [142]. Morris T, Robertson B, Gallagher M., 1996, Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J Clin Microbiol.* 1996 Dec;34(12):2933-6.

- [143]. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N.,2013, Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy., *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):3448-59.
- [144]. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, Los MJ.,2013, Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013 Feb;61(1):43-58.
- [145]. Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla VR, Maddika S, Los M.,2013, Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development, *J Cell Mol Med*. 2013 Jan;17(1):12-29.
- [146]. El-Khattouti A, Selimovic D, Haikel Y, Hassan M.,2013, Crosstalk Between Apoptosis and Autophagy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies in Cancer. *Journal of Cell Death*. 2013; 6:37-55.
- [147]. Soares R, Meireles M, Rocha A, Pirraco A, Obiol D, Alonso E, Joos G, Balogh G.,2011, Maitake (D fraction) mushroom extract induces apoptosis in breast cancer cells by BAK-1 gene activation, *J Med Food*, 2011 Jun;14(6):563-72.
- [148]. Ahmadnia Z, Joukar F, Hasavari F, Roushan ZA, Khalili M.,2016, Dietary Patterns and Risk of Breast Cancer in Women in Guilan Province, *Iran. Asian Pac J Cancer Prev*.2016;17(4):2035-40.
- [149]. Novaes MR, Valadares F, Reis MC, Gonçalves DR, Menezes Mda C.,2011, The effects of dietary supplementation with Agaricales mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: evidence-based medicine, *Clinics (Sao Paulo)*.,2011;66(12):2133-9. Review.
- [150]. Buck K, Vrieling A, Flesch-Janys D, Chang-Claude J.,2011, Dietary patterns and the risk of postmenopausal breast cancer in a German case-control study, *Cancer Causes Control*,2011 Feb;22(2):273-82.
- [151]. Modem S, Dicarlo SE, Reddy TR.,2012, Fresh Garlic Extract Induces Growth Arrest and Morphological Differentiation of MCF7 Breast Cancer Cells, *Genes Cance*, 2012 Feb;3(2):177-86.
- [152]. Clement YN, Mahase V, Jagroop A, Kissoon K, Maharaj A, Mathura P, Quan CM, Ramadhin D, Mohammed C.,2016, Herbal remedies and functional foods used by cancer patients attending specialty oncology clinics in Trinidad. *BMC Complement Altern Med.*, 2016 Oct 21;16(1):399.
- [153]. Majewski M.,2014 *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2014;65(1):1-8. Review.

- [154]. Omar SH, Al-Wabel NA.,2010, Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer.,*Saudi Pharm J.*, 2010 Jan;18(1):51-8.
- [155]. Petrović J, Stojković D, Reis FS, Barros L, Glamočlija J, Ćirić A, Ferreira IC, Soković M.,2014, Study on chemical, bioactive and food preserving properties of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) *Murr. Food Funct.*, 2014 Jul 25;5(7):1441-51.
- [156]. Wang J, Sun W, Luo H, He H, Deng W, Zou K, Liu C, Song J, Huang W., 2015, Protective Effect of Eburicoic Acid of the Chicken of the Woods Mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Higher Basidiomycetes), Against Gastric Ulcers in Mice, *Int J Med Mushrooms*.2015;17(7):619-26.
- [157]. Ari F, Celikler S, Oran S, Balikci N, Ozturk S, Ozel MZ, Ozyurt D, Ulukaya E. 2014, Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. On breast cancer cells, *Environ Toxicol*, 2014 May;29(7):804-13.
- [158]. Cevatemre B, Ulukaya E, Sarimahmut M, Oral AY, Frame FM. The M30 assay does not detect apoptosis in epithelial-derived cancer cells expressing low levels of cytokeratin 18. *Tumour Biol*. 2015 Sep;36(9):6857-65. doi:10.1007/s13277-015-3367-5. Epub 2015 Apr 7. PubMed PMID: 25846732.
- [159]. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al., 2012, Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012, *Cell Death Differ*, 2012 Jan;19(1):107-20.
- [160]. Ulukaya E., Acilan C., Ari F., İkitimur E. Yilmaz Y., 2011, A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively, *Turk J Biochem* 2011; 36 (3);261–269.
- [161]. Acilan C, Cevatemre B, Adiguzel Z, Karakas D, Ulukaya E, Ribeiro N, Correia I, Pessoa JC. Validation data supporting the characterization of novel copper complexes as anticancer agents. *Data Brief*. 2016 Nov 22; 9:1160-1174. doi: 10.1016/j.dib.2016.11.063. eCollection 2016 Dec. PubMed PMID: 28054019; PubMed Central PMCID: PMC5194229.
- [162]. Li T, Su L, Lei Y, Liu X, Zhang Y, Liu X., 2015, DDIT3 and KAT2A Proteins Regulate TNFRSF10A and TNFRSF10B Expression in Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis in Human Lung Cancer Cells, *J Biol Chem*, 2015 Apr 24;290(17):11108-18.
- [163]. <http://www.umassmed.edu/kelliherlab/research/RIPK-proteins-in-cell-death-and-tissue-homeostasisrihi>, [Ziyaret tarihi 08.08.2016].
- [164]. Karakas D, Cevatemre B, Aztopal N, Ari F, Yilmaz VT, Ulukaya E. Addition of niclosamide to palladium(II) saccharinate complex of terpyridine results in enhanced cytotoxic activity inducing apoptosis on cancer stem cells of breast cancer. *Bioorg Med Chem*. 2015 Sep 1;23(17):5580-6. doi: 10.1016/j.bmc.2015.07.026. Epub 2015 Jul 18. PubMed PMID: 26234907.

- [165]. Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J., 2015, Programmed cell death and its role in Inflammation, *Mil Med Res*, 2015 May 19;2:12.
- [166]. Özarslan D., Korkmaz G., Gözüaçık D., 2011, Autophagy: a cellular stress and a cell death mechanism, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* Cilt: 2, Sayı: 4, Ekim 2011.
- [167]. Gozuacik D, Kimchi A., 2013, Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, *Oncogene*, 2004 Apr 12;23(16):2891-906. Review.
- [168]. Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene*. 2008 Dec;27 Suppl 1: S137-48. doi: 10.1038/onc.2009.51. Review. PubMedPMID: 19641499; PubMed Central PMCID: PMC2731580.
- [169]. Nakamura M, Shimada K, Konishi N. The role of HRK gene in human cancer. *Oncogene*. 2008 Dec;27 Suppl 1: S105-13. doi: 10.1038/onc.2009.48. Review.
- [170]. Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, Schweizer F, Lengerke C, Davoodpour P, Palicharla VR, Maddika S, Los M. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med*. 2013.
- [171]. Shin MS, Kim HS, Lee SH, Park WS, Kim SY, Park JY, Lee JH, Lee SK, Lee SN, Jung SS, Han JY, Kim H, Lee JY, Yoo NJ. Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res*. 2001.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Fevziye Emin Akman
Doğum Yeri	Bulgaristan
Doğum Tarihi	22.07.1976
Uyruğu	<input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer: Bulgaristan
Telefon	0535 379 83 38
E-Posta Adresi	fevziye22@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Şumen Üniversitesi Piskopos Konstantin Preslavski
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji ve Kimya
Mezuniyet Yılı	1998

Yüksek Lisans	
Üniversite	Şumen Üniversitesi Piskopos Konstantin Preslavski
Enstitü Adı	Fen Fakültesi
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Klinik Biyoloji
Mezuniyet Tarihi	2004

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
Mezuniyet Tarihi	27.12.2017