

**T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**20 α -HİDROKSİTINGENON'UN AKCİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA
SİTOTOKSİK ETKİSİ**

ÇİLER GÜLŞEN DİKEN

YÜKSEK LİSANS

PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

İSTANBUL-2019

ÖZET

20 α -HİDROKSİTINGENON'UN AKCİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK ETKİSİ

ÇİLER GÜLŞEN DİKEN

Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi
Danışman: Prof. Dr. Engin Ulukaya

2019

Son yıllardaki çalışmalar, doğal bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik özelliklerinin incelenmesi üzerine yoğunlaşmış ve bu maddelerin tamamlayıcı ya da alternatif terapötik ajan olarak kullanılacakları öne sürülmüştür. Gelecekte kemoterapötiklerin yerini, apoptozis gibi fizyolojik mekanizmaları çalıştıran, yan etki profili düşük moleküllerin alması öngörülmektedir. Kanser hücrelerinin standart kemo-terapilere karşı dirençli olduğu göz önüne alındığında, doğal bileşikler bu hücreleri yok etme potansiyeli taşıyabilir. Bu nedenle, bu çalışmada *Maytenus chiapensis* bitkisinden izole edilen doğal bir bileşik olan Tingenon'un A549 akciğer kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirilmiştir. SRB canlılık metoduyla IC_{50} dozu $50,9 \pm 1,5 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir. DAPI ve PI ile yapılan ikili florasan boyama ile parçalı nükleus yapıları ve/veya kondense kromatin apoptotik yapılar açık bir şekilde görüldü. Akım sitometrinde yapılan Annexin- V, ROS ve Caspase 3/7 analizleri ile sekonder nekroz/geç apoptotik ölüm olduğu desteklendi. Fakat DNA hasarına sebep olup olmadığı gelecek çalışmalarda protein ve gen düzeyinde araştırılmalıdır. Sonuç olarak Tingenon yüksek dozlarda A549 hücrelerinde apoptotik etkisi gözlemlenmiş olup iyi bir antikanser ürün adayı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimer: Tingenon, *M. Chiapensis*, Akciğer Kanseri

ABSTRACT

CYTOTOXIC EFFECT OF 20 α -HYDROXYTINGENONE MOLECULE ON LUNG CANCER CELL LINE

ÇİLER GÜLŞEN DİKEN

Cancer Biology and Pharmacology

Danışman: Prof. Dr. Engin Ulukaya

2019

In recent years, studies have focused on examining the cytotoxic properties of natural compounds on cancer cells and have been proposed to be used as complementary or alternative therapeutic agents. In the future, it is envisaged that chemotherapeutics will be replaced by molecules with low side-effect profiles, which operate physiological mechanisms such as apoptosis. Cancer cells are resistant to standard chemical chemotherapies, natural compounds may have the potential to destroy these cells. Therefore, this study evaluated the cytotoxic effect of Tingenon, a natural compound isolated from the plant *Maytenus chiapensis*, on the A549 lung cancer cell line. The IC_{50} dose was determined as $50,9 \pm 1,5 \mu\text{M}$ by using SRB viability method. Also double fluorescence staining with DAPI and PI, fragmented nucleus structures and / or condensed chromatin which is apoptotic structure were clearly seen. Secondary necrosis / late apoptotic death was supported by flow cytometry analysis such as Annexin-V, ROS and Caspase 3/7. DNA damage should be investigated at future protein and gene levels. Thus, in the future, Tingenon compound is thought to be an anticancer product candidate.

Keywords: Tingenon, M. Chiapensis, Lung Cancer

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmamda değerli bilgilerini benimle paylaşan ve her an destek olan, sorularımı cevapsız bırakmayan ve her konuda yardımcı olan değerli hocam Sayın PROF. DR. ENGİN ULUKAYA'ya,

Çalışmalarım sürecinde bilgi, deneyim ve önerilerini benimle paylaşarak bana yol yol göstermiş olan MERVE ERKISA, SELİN SELVİ, HATİCE DİNÇER, MELDA SARIMAN ve EREN ŞAHİN'e,

Tüm eğitim hayatım boyunca hayallerini hayallerime katan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen canım babam HÜSEYİN GÖKÇEBEL'e, hayatıma kattığı ışığı ve enerjisiyle beni her daim güler yüzü ile karşılayan canım annem SÜEYLA GÖKÇEBEL'e, beni her daim güçlü kılan kardeşim ARİF CANER GÖKÇEBEL'e, ve mesafemizi sorun etmeden her daim destek olan sevgili eşim BAHADIR EMRE DİKEN' e teşekkürü bir borç bilirim.

ÇİLER GÜLŞEN DİKEN

20.08.2019

İÇİNDEKİLER

ENSTİTÜ ONAYI.....	iii
ETİK BEYANI.....	iv
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	viii
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	2
1.1. 20A-HİDROKSİTINGENON BİLEŞİĞİ.....	2
1.2. KANSER	3
1.2.1. Akciğer Kanseri	5
1.3. APOPTOSİZ.....	8
1.3.1. Apoptosiz ve Nekrosiz.....	8
1.3.2. Apoptosiz Mekanizmaları.....	10
2. MATERYAL ve METOD	13
2.1. MATERYAL	13
2.1.1. Kimyasal Maddeler.....	13
2.1.2. Sarf Malzemeler.....	13
2.1.3. Cihazlar	14
2.2. METOD	15

2.2.1. Tingenon Molekülünün Hazırlanması	15
2.2.2. Hücre Kültürü	15
1.2.2.1. Besiyerinin hazırlanması	15
1.2.2.2. Hücre hattının stoktan çıkarılması	15
1.2.2.3. Hücre hatlarının pasajlanması	16
1.2.2.4. Hücre hatlarının stoklanması	16
1.2.2.5. Hemositometre ile hücrelerin sayımı	17
2.2.3. SRB Canlılık Metodu.....	17
2.2.4. İkili Florasan Boyama Yöntemi.....	19
2.2.5. Akım Sitometri Analizleri	21
2.2.5.1. Kaspaz 3/7 testi.....	21
2.2.5.2. Anneksin-V Metodu	22
2.2.5.3. Oksidatif stres belirlenmesi	24
3. BULGULAR.....	26
3.1. SRB TESTİ BULGULARI.....	26
3.2. DAPI VE PI İLE İKİLİ FLORASAN BOYAMA YÖNTEMİ BULGULARI.....	29
3.3. AKIM SİTOMETRİSİ BULGULARI.....	31
3.3.1. Kaspaz 3/7 Testi Bulguları	31
3.3.2. Anneksin-V Testi Bulguları.....	32
3.3.3. Oksidatif Stres Değerlendirmesi.....	33
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
KAYNAKLAR	37

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. 20 α -hidroksitingenon'un elde edildiği <i>Maytenus chiapensis</i> bitkisi.....	2
Şekil 1.2. 20 α -hidroksitingenon' bileşiğinin kimyasal yapısı.....	3
Şekil 1.3. Akciğer kanserinin ülkelere ve cinsiyete göre dağılımı	6
Şekil 1.4. Apoptozis ve Nekrozis farkı	9
Şekil 1.5. Apoptozisu indükleyen yollar.....	10
Şekil 2.1. İlaç dozları ve 96 kuyulu plate düzeni.....	17
Şekil 2.2. Kaspaz 3/7 yolağı.....	20
Şekil 2.3. Apoptotik hücrelerde fosfatidil serin translokasyonu.....	22
Şekil 3.1. A549 hücrelerinde Tingenon bileşiğinin 72 saat tedavi sonundaki 10X faz görüntüleri.....	26
Şekil 3.2. Tingenon bileşiği uygulanan A549 hücre hattının canlılık yüzde grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir.	27
Şekil 3.3. Tingenon bileşiğinin 48 saatlik tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. Mavi ok: Piknotik veya kondanse nükleus.....	29
Şekil 3.4. Tingenon bileşiği ile 48 tedavi sonrasında Kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları. A:Nekroz, B:Geç Apoptozis, C:% Canlılık, D:Erken Apoptozis.....	30
Şekil 3.5. Tingenon bileşiği ile 48 tedavi sonrasında A549 akciğer kanser hücrelerinde Annexin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları. A:Nekroz, B:Geç Apoptozis, C:% Canlılık, D:Erken Apoptozis.....	31
Şekil 3.6. Tingenon bileşiği ile 48 saat tedavi sonrasında A549 akciğer kanser hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin histogramı. M1: ROS negatif hücreler (-); M2: ROS pozitif hücreler ROS(+).	32

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Floresan mikroskopide apoptotik hücrelerin nekrotik ve normal hücrelerden ayırımı.....19

Tablo 3.1. Tingenon bileşiği uygulanan A549 hücre hatlarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre 72 saat tedavi süresindeki IC_{50} ve IC_{90} değerleri.....27



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
AAD	: 7-Aminoaktinomisin D
DAPI	: Diaminofenilindol
DMSO	: Dimetilsülfoksit (Dimethylsulfoxide)
DNA	: Deoksi ribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)
ELISA	:Enzim Bağlantılı Immunoabsorbans Tahlili (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)
FADD	:Fas-İlişkili Ölüm Alanı (Fas-Associated Death Domain)
IC₅₀	:Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon
IC₉₀	:Hücrelerin %90'nını öldüren konsantrasyon
NBCS	: Yeni doğan buzağı serumu (Newborn Calf Serum)
NCLC:	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
PARP	:Poli(ADP-riboz)polimeraz (Poly ADP-ribose polymerase)
PBS	: Fosfat Tuz Tamponu (Phosphate buffered saline)
PI	: Propidyum İyodür
PS	: Fosfatidil serin (phosphatidylserine)
ROS	: Reaktif Oksijen Canlıları
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium
SRB	: Sulforhodamine B
SCLC	: Küçük hücreli akciğer kanseri
TCA	: Trikloroasetik asit

GİRİŞ

Son yıllardaki çalışmalar, doğal bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik özelliklerinin incelenmesi üzerine yoğunlaşmış ve bu maddelerin tamamlayıcı ya da alternatif terapötik ajan olarak kullanılabilecekleri öne sürülmüştür. Gelecekte kemoterapötiklerin yerini, apoptozis gibi fizyolojik mekanizmaları çalıştıran, yan etki profili düşük moleküllerin alması öngörülmektedir.

Tüm dünya genelinde hem kadın hem erkeklerde akciğer kanseri en yaygın görülen kanser türü olmak ile birlikte tüm kanser ölümlerinin %18.4'ini oluşturarak en ölümcül kanser türü de olmuştur (Bray ve ark., 2018).

Bu çalışmadaki temel amaç *Maytenus chiapensis* bitkisinden izole edilmiş olan doğal bir bileşik olan Tingenon'un A549 akciğer kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirebilmektir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. 20A-HİDROKSİTINGENON BİLEŞİĞİ

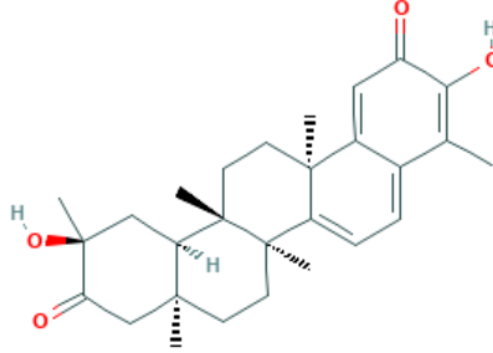
Kanser hücrelerinin standart kemo-terapilere karşı dirençli olduğu göz önüne alındığında, doğal bileşikler, bu hücreleri yok etme potansiyeli taşıyabilir. Doğal bileşikler kanser alanında çok önemli bir rol oynar. Doğal bileşiklerden biri olan Tingenon bileşiği Celastraceae familyasından olan *Maytenus chiapensis* bitkisinden izole edilmiştir. (Taddeo ve ark., 2019) . Celastraceae familyasının türleri, Kuzey Afrika, Güney ve Orta Amerika ve Orta ve Doğu Asya'da geleneksel tıp ve tarım alanında uzun bir geçmişe sahiptir (Gonzalez ve ark., 2000). Tinegenon Bileşiği (20 α -hidroksitingenon) terpenoiddir.

Terpenler, 2-metil-1,3-bütadien birimlerinin birleşerek oluşmuş en sık doğal ürün gruplarından. Terpenlerin yapılarında oksijen içermesiyle oluşan terpen türevi esterler, alkoller ve aldehitler ise terpenoidler olarak adlandırılır (Ludwiczuk ve ark., 2017).



Şekil 1.1. 20 α -hidroksitingenon' un elde edildiği *Maytenus chiapensis* bitkisi

Tingenon (20 α -hidroksitingenon) bileşiğın türevi olan Tingenin b (22-Hydroxytingenon) bileşiğı ile meme kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda, bu doğal bileşiğın düşük dozlarda apoptotik etkisi bulunmuştur (Cevatemre ve ark., 2016). 22-Hidroksitingenon ile 20 α -hidroksitingenon bileşiğının moleküler ağırlığı aynıdır (Gunatilaka ve Walser, 1996).



şekil 1.2. 20 α -hidroksitingenon bileşiğının kimyasal yapısı (Pubchem)

1.2. KANSER

Kanser, vücuttaki farklı hücre türlerinden herhangi birinin anormal şekilde çoğalmasından kaynaklanabilir, bu nedenle davranışları ve tedaviye yanıtları arasında büyük ölçüde değişiklik gösterebilen yüzden fazla kanser türü vardır. Kanser patolojisinde en önemli husus, iyi huylu ve kötü huylu tümörler arasındaki ayırımıdır. Bir tümör, iyi huylu veya kötü huylu olabilen herhangi bir anormal hücre çoğalmasıdır. İyi huylu bir tümör, normal dokuyu çevreleyen ve uzak vücut bölgelerine yayılmadan orijinal konumuna sınırlı kalır. Bununla birlikte, kötü huylu bir tümör, hem çevreleyen normal dokuyu istila etme hem de dolaşım veya lenfatik sistemler (metastaz) yoluyla vücutta yayılma yeteneğine sahiptir. Yalnızca kötü huylu tümörlere kanser denir.

Apoptosizden kaçma, sınırsız replikasyon yeteneği, anjiyogenezi uyarna, invazyon, inflamatuvar mikroçevre oluşumu, büyüme baskılıyıcı sinyallere duyarsız olma ve kendi kendine yeterli büyüme sinyalleri üretmek kanser hücrelerinin genel özellikleridir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanseri çok tehlikeli yapan istila ve metastaz yapma yetenekleridir. İyi huylu tümörler genellikle cerrahi olarak çıkarılabilse de, malign tümörlerin uzak vücut bölgelerine yayılması sıklıkla bu tür lokalize tedaviye dirençli hale getirir (Shivapurkar ve ark.,2003).

Hem benign hem de malign tümörler, ortaya çıktıkları hücre tipine göre sınıflandırılır. Kanselerin çoğu üç ana gruba ayrılır: karsinomalar, sarkomlar ve lösemiler veya lenfomalar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90' ını içeren karsinomlar, epitel hücrelerinin maligniteleridir (Shivapurkar ve ark.,2003). İnsanlarda nadir görülen sarkomlar, kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokuların katı tümörleridir. İnsan malignitelerinin yaklaşık % 8' ini oluşturan lösemiler ve lenfomalar, sırasıyla, kan oluşturan hücrelerden ve bağışıklık sisteminin hücrelerinden kaynaklanır.

Tüm kanser vakalarının yarısından fazlasına karşılık gelen en yaygın dört kanser türü vardır. Bunlar; meme, prostat, akciğer ve kolon / rektumdur. Akciğer kanseri, en ölümcül olanıdır.

Kanser gelişim süreci Karsinojenez olarak adlandırılır ve inisiyasyon (başlangıç), promosyon (artma) ve progresyon (ilerleme) olarak üç evreden oluşur. İnisiyasyon evresinde, gen ekspresyonunu düzenleyen epigenom, kromozom ve DNA hasarı gerçekleşir. İnflamasyon ile kararsız hücrelerin genomik olarak büyür. Progresyon evresinde hücreler çoğalır, genomlarına daha fazla zarar vererek kötü huylu tümöre dönüşür (Tod ve Wong, 1999).

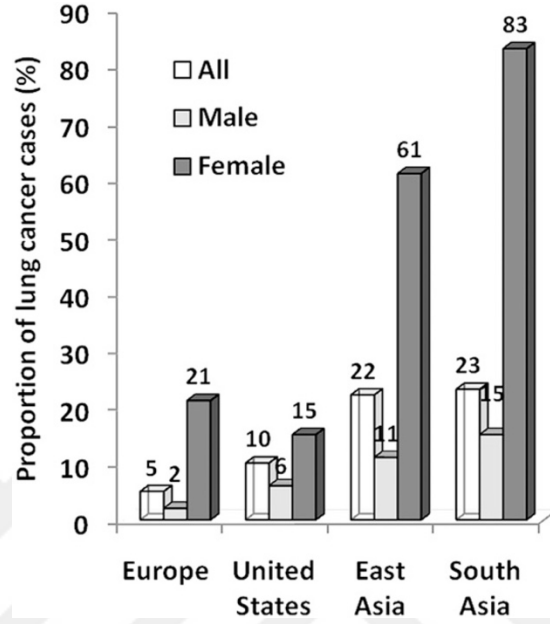
1.2.1. Akciğer Kanseri

İnsan akciğer kanserleri ikiye ayrılır; küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) (Travis ve ark., 1995). SCLC kanserleri, nöroendokrin tümörleridir, kuvvetli bir şekilde sigara içimi ile ilişkilidir ve NSCLC kanserlerinden farklıdır. Hızlı ilerleyen ve diğer organlara yayılma olasılığı yüksektir. NSCLC kanserleri daha yaygındır ve diğer organlara yayılma oranı düşüktür. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri temel olarak tedavi edilemez, RAS ve p53 yollarını etkileyen mutasyonların birikmesinden dolayı, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Beş yıllık sağkalım oranları cerrahi rezeksiyonu ile % 70'e yaklaşabilir (Alberle ve ark., 2011).

Genetik faktörler, sigara içmek, asbest ve hava kirliliği akciğer kanserinin temel nedenlerindedir.

Sigaranın etkisi, akciğer kanserine yol açan diğer tüm faktörlerden ağır basmaktadır. Akciğer kanseri riski, sigara içme süresi ve günlük içilen sigara sayısı ile doğru orantı şeklinde artar. Ortalama sigara içen erkeklerin akciğer kanseri için yaklaşık 9 kat ila 10 kat riskine sahip olduğu, buna karşın ağır sigara içicilerin en az 20 kat risk olduğu görülmüştür (Jemal ve ark., 2011).

Sigara içmek erkeklerde akciğer kanseri ile nedensel olarak ilişkilidir. Erkek sigara içenlerin koroner arter hastalığından ölüm oranı sigara içmeyen erkeklere göre daha yüksektir ve genel küresel istatistikler, erkeklerde akciğer kanserlerinin %15'inin ve kadınlarda % 53'ünün sigara içme nedeni olduğu görülmüştür (Parkin ve ark., 2002).



Şekil 1.3. Akciğer kanserinin ülkelere ve cinsiyete göre dağılımı (Sun ve ark., 2007)

Asbest, akciğer kanserinin en yaygın bilinen ve en yaygın mesleki nedenidir. Asbest, başlıca 2 tipten oluşan doğal olarak oluşan lifli minerallerin bir sınıfıdır: (1) serpantin (krizotil) ve (2) amfibol (amosit, krosidolit ve tremolitler). Asbest 1800'lerin sonlarından beri ticari olarak kullanılmaktadır. Alev almama ve dayanıklılığı sayesinde inşaat ve yalıtım malzemelerinde yararlı olmuştur. Almanya'da 1940'lı yılların başlarında, asbest akciğer kanserojen olarak kaydedildi (Hughes ve ark., 1994). Asbest liflerinin solunması parankimal akciğer hastalığına, özellikle asbest hastalığı olarak bilinen interstisyel akciğer hastalığına neden olabilir. Tüm ana asbest tipleri interstisyel akciğer hastalığına neden olabilir, ancak amfibol lifleri krizotil liflerinden daha fazla fibrojenik olabilir. Asbest teşhisi esas olarak spesifik olmayan interstisyel akciğer hastalığının yanı sıra idiyopatik pulmoner fibroz ile aynıdır. İnterstisyel fibrozisin gelişimi genellikle aylar ve yıllar boyunca uzun süre maruz kalmayı gerektirir (Mossman ve ark., 1998). Akciğer kanseri riski

amfibol liflerine maruz kalan işçiler için, krizotil liflerine maruz kalanlara göre daha yüksek görünmektedir.

Akciğer kanserinden ölüm riskinin, asbest çalışanlarında günde 1 paketten fazla sigara içmeleri durumunda 16 kat, günde 1 paketten az sigara içmeleri durumunda 9 kat arttığı görülmüştür (Hammond ve ark., 1979).

Hava kirliliği, küreselleşme ve sanayileşmenin mevcut şaşırtıcı oranı göz önüne alındığında dünya çapında bir sorun haline gelmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde hava kirliliği giderek artmaktadır, ülkelerin büyük şehirlerinde riskli partikül, sülfür dioksit ve dumanın en yüksek konsantrasyonlarının varlığı kaydedilmiştir. Dış mekan hava kirliliğinin, akciğer kanseri riskini arttırdığı uzun süredir düşünülmektedir. Spesifik kirleticileri tespit etmek için kullanılan analitik metotlardaki gelişmeler, araştırmacıların havadaki partiküllerin etkilerini incelemelerine yardımcı olmuştur.

Fosil yakıt kullanım ile çeşitli potansiyel kanserojen bileşenlerinin yayıldığı düşünülmektedir (Pershagen ve Simonato, 1990). Karmaşık bir gaz ve ince tanecik karışımından oluşan dizel egzoz, hava kirliliğinin önemli bir nedeni oluşturur. Özellikle kamyon endüstrisindeki dizel egzozuna mesleki nedenle maruz kalan kişilerde, akciğer kanseri riski yaklaşık % 30 fazla olduğu bilinmektedir. Benzen, formaldehit ve 1,3-butadien gibi bu gaz halindeki bileşenler akciğer kanserine neden olur (Bhatia ve ark., 1998).

1.3. APOPTOSİZ

Apoptosis, sağlıklı hem sağlıklı tüm hücrelerin işleyişinde düzenli görülmesi beklenen hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptosis düşen bir ağacın yaprağında dahi görebiliriz. Ağacın canlılığının devamı için yaprakların zamanında dökülmesi ve yeni yaprakların çıkması şarttır. Apoptosis eğer zamanında, doğru ve gerekli sayıda işlemese bu durum patolojiktir.

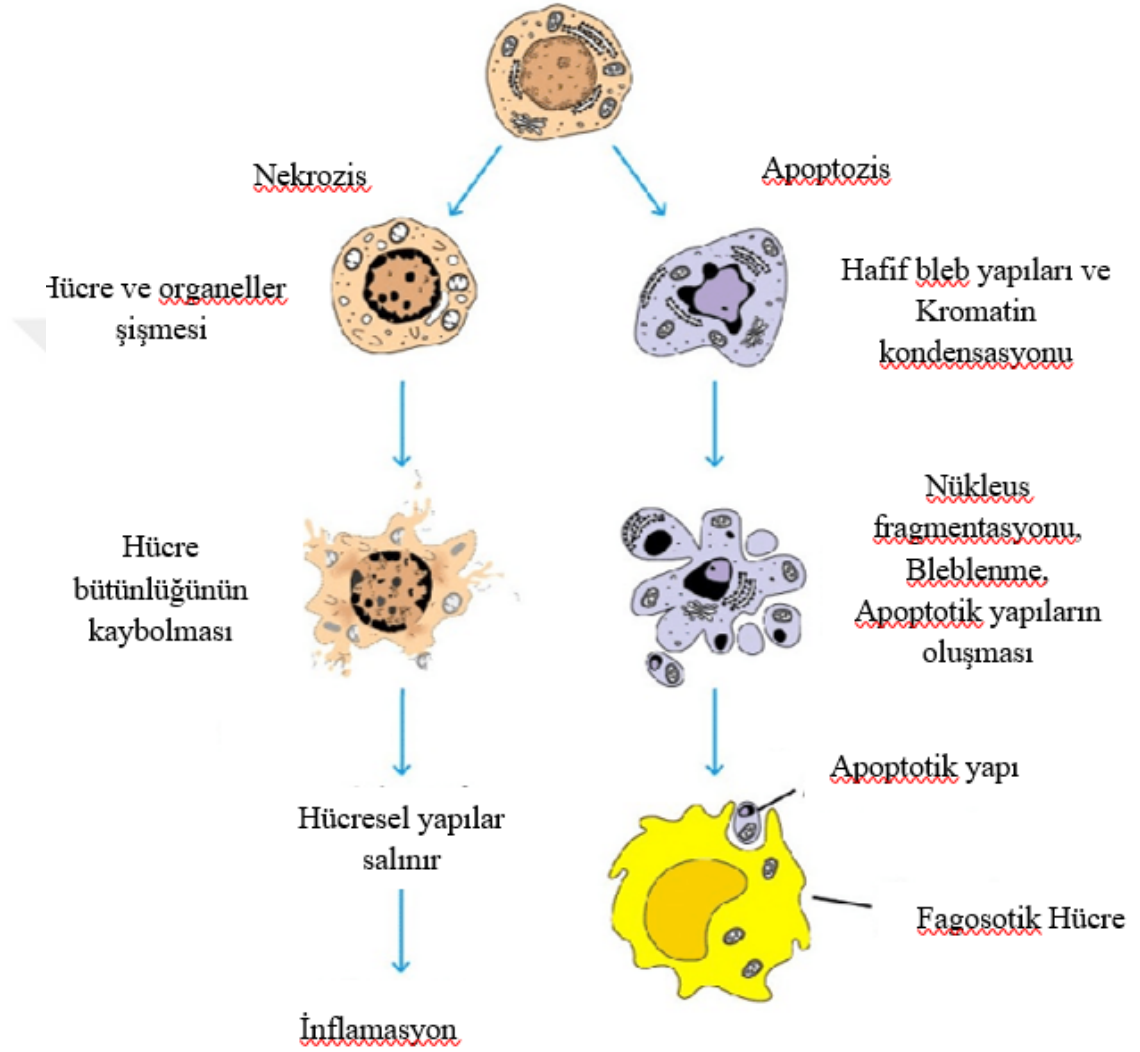
Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması, HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon ve Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu apoptozisa yol açan faktörlerdir. Apoptosis ölüm şekliyle nekrozu karıştırmamak gerekir. Apoptosis olan hücrenin morfoojik özelliği Hücre küçülme ve lebler oluşur, kromatin kondensasyonu gerçekleşir, apoptotik cisimcikler oluşur ve erken evrede fosfatidil serin translokasyonu gözlenir. Organeller sağlamdır (Ulukaya ve ark., 2011).

Vücudumuz kanser gelişimine karşı korunmak için çeşitli karmaşık mekanizmalar kullanır. Bu mekanizmalar DNA mutasyonlarını tanır ve hatalı DNA'nın onarımını veya etkilenen hücrenin onkojenik hale gelmeden ölmesini sağlar. Kaspazlar apoptosis için çok önemli olduğu için, bu enzimlerin ve içerdikleri yolakların düzensizleştirilmesinin mutasyona uğramış hücrelerin kalıcılığına yardımcı olması ve tümörjenezini desteklemesi şaşırtıcı değildir. Bununla birlikte kaspazlar, kanser hücresi ölümü mekanizmasındaki en iyi kilit oyuncularındır (Mcilwain ve Mak, 2015).

1.3.1. Apoptosis ve Nekrosis

Nekroz iskemi, radyasyon, toksin gibi dış etkenlerle başlar. Enerji gerektirmez ve belirgin bir inflamasyon vardır. Apoptosis is iç dış sinyallerle başlar ve enerji gereklidir. Apoptosisda tek hücre etkilenirken nekrozda hücre toplulukları etkilenir.

Apoptozis, iltihaplanma ve çevre hücrelere zarar gelmesini önlerken hücre içi bileşenlerin kontrollü bir şekilde atılmasını içeren programlanmış hücre ölümüdür. Başlatıcı kaspazlar, temel yapısal proteinleri yıkmak ve diğer enzimleri aktive etmek için aktivitelerini koordine eden yürütücü kaspazları aktive eder ve sonuç olarak DNA parçalanması ve bleblenme ile apoptozisin morfolojik özellikleri ortaya çıkar (Şekil 1.4). Oysa nekrozda hücre membranı bütünlüğü kaybolur, hücre şişer, büyük vakuoller oluşur, organelleri parçalanır, hücre lizisi gerçekleşir ve fosfatidilserin tanslokasyonu yoktur. Apoptozis kaspaz bağımlı bir ölüm yolağıdır fakat nekrozis kaspaz aktivasyonundan bağımsızdır. (Ulukaya ve ark., 2011).



Şekil 1.4. Apoptozis ve Nekrozis farkı (Asensi ve Gray, 2017 değiştirilerek alınmıştır.)

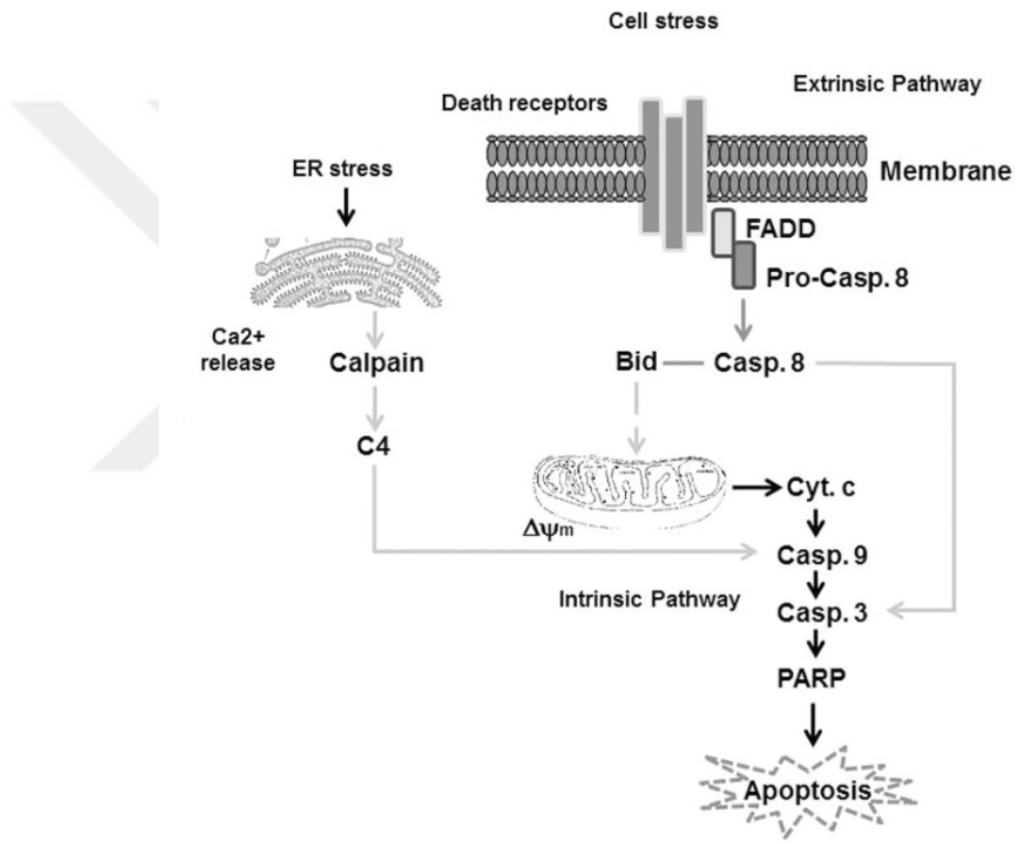
1.3.2. Apoptosis Mekanizmaları

Apoptosisin üç yolla oluşur (Şekil 1.3).

1. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile (Dışsal yolak)
2. Mitokondriyel (içsel yolak)

3. Endoplazmik retikulum aracılığı ile (El-Khattouti ve ark., 2003).

Ekstra ve hücre içi strese cevap olarak dışsal ve içsel apoptotik yollar içindeki anahtar proteinleri gösteren basitleştirilmiş taslak Şekil 1.3'de verilmiştir.



Şekil 1.5. Apoptozisu indükleyen yollar (El-Khattouti ve ark., 2003)

Genel olarak, CD95 (APO-1 / Fas) içeren ölüm alanı içeren reseptörler, Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) yoluyla ekstrinsik(dışsal) apoptozis yolunun aktivitesini tetikleyen harici sinyallere (Fas ligand gibi) cevap olarak aktive edilebilir. Bu yolak, bir başlatıcı kaspaz olan kaspaz-8'in (Pro-kasp 8), ölüm indükleyici sinyal kompleksi içinde alım ve aktivasyonu ve ardından Kaspaz-3 gibi akış aşağı efektör kaspazlarının doğrudan bölünmesi aracılık eder. Bu nedenle, 8 kaspazı, dışsal

apoptotik yol için önemli bir apoptotik proteindir. İntrinsik apoptozis yolağının başlatılması, hücre içi stresten kaynaklanır ve mitokondriyal membran potansiyelinin ($\Delta\psi_m$) ve sitokrom c (cyt c) salınımı ile karakterize edilen mitokondriyal hasara yol açar. Bu, başlatıcı kaspaz-9'un (kasp 9) aktivasyonunu tetikler ve nihayetinde, poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP) parçalanmasına aracılık eden ve sonunda apoptozise yol açan kaspaz 3 (kasp 3) gibi efektör kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır. Ek olarak, oksidatif stresin aracılık edebileceği endoplazmik retikulum stresi, Kaspaz-4'ün aktivasyonuna yol açan Kaspaz-4'ün aktivasyonuna yol açan hücre içi salınımı artırır. ve PARP apoptozisiye yol açar.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kimyasal Maddeler

- Yenidoğan Buzağı Serumı (NBCS), Biochrom AG
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Hyclone
- % 0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Tripan mavisi (% 0,5), Biological Industries
- Tingenon, İstinye Üniversitesi
- SRB, Chem Cruz
- PI, Cell Signaling technology
- DAPI, Biolegend

2.1.2. Sarf Malzemeler

- 25cm² ve 75cm² lik flask, Thermo Scientific, USA
- 96 kuyulu flat plate, Corning Incorporated, USA
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject, Çin
- 10µl'lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya
- 100µl'lik pipet uçları, Expell
- 1000µl'lik pipet uçları, Ayset, Türkiye
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), Orange Scientific, Belçika

- Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest, Çin
- Thoma lamı, Bright –Line, Haussier Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, Corning Incorporated, USA
- 10 ml’lik pastör pipetler, Corning Incorporated, USA
- 25 ml’lik pastör pipetler, Lp Italiana Spa, İtalya
- 2 ml’lik cam pastör pipetler, Heinz Herenz, Almanya
- 1 ml ve 5 ml’lik Kombi tip, Eppendorf, Almanya
- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab, Almanya
- Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit, Merck Millipore
- Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore
- Muse® Oxidative Stress Kit, Merck Millipore

2.1.3. Cihazlar

- CO₂ inkübatörü, Panasonic, Japonya
- Laminer Hava Kabini, Telstar, Japonya
- Soğutmalı Santrifüj, Hitachi, Japonya
- Inverted mikroskop, Nikon, Japonya
- Spektrofotometre, BGM Labtech, Almanya
- Muse Akım Sitometrisi, Merck Millipore, Toronto
- Buzdolabı, Panasonic, Japonya
- Minispın, Heatrow Sci.,
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, 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, Alman

2.2. METOD

2.2.1. Tingenon Molekölünün Hazırlanması

Tingenon molekülü İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nden temin edilmiştir. DMSO içerisinde 10 mM derişim ile 10 µl alikot şeklinde -20 °C' de muhafaza edilmiştir. A549 hücre hattında muamele edilecek olan Tingenon'un en yüksek ilaç konsantrasyonu 100 µM olması için 40 µl alınarak 1ml besiyeri içerisinde 400 µM lık ilaç stok çözeltisi hazırlanarak etkin doz belirleme yapılmıştır.

2.2.2. Hücre Kültürü

A549 insan akciğer kanseri hücre hattı İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

1.2.2.1. Besiyerinin hazırlanması

Hücre kültüründe kullanılan besiyerini hazırlamak için 50 ml falcon tüplere sırasıyla RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) %10 NBCS (Newborn Calf Serum) ve %1 penisilin-streptomisin Solüsyonu (10000U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, Gibco, USA) eklendi ve +4°C'de muhafaza edildi.

1.2.2.2. Hücre hattının stoktan çıkarılması

Kriyovial hızlı bir şekilde sıcak su banyosunda çözüldü. Çözülen hücreler; falcon tüp içerisinde bulunan 5ml RPMI %10 NBCS ve %1 penisilin-streptomisin içeren besiyerine alındı.

Falkon tüp 800rpm’de 5dk santrifüj edildi ve süpernatant kısım aspire edildikten sonra peletin üzerine 5ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. 25cm²’lik flasklara alınarak 37°C’de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

1.2.2.3. Hücre hatlarının pasajlanması

Hücrelerin 25cm²’lik flaskın yüzey alanını yaklaşık %70-80 kapladığı görüldüğünde pasajlama işlemine geçildi. Öncelikle besiyeri aspire edildi. Hücrelerin iyi tripsinlenebilmesi için 25cm²’lik flask içerisine 2ml 1X PBS eklenerek flask hafifçe yıkanması çalkalandı. PBS ortamdaki aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücreleri kaldırma için 0,5ml %0,05 Tripsin-EDTA eklendi ve %5 37°C, CO₂ inkübatörde 5dk inkübe edildi. Hücrelerin kalktığı mikroskopla teyit edildikten sonra tripsinin aktivitesini inhibe etmek amacıyla 5ml besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücreler 15ml’lik falkon tüp içerisine alınarak 800rpm’e 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi. Kalan hücre peleti 10ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra hücre süspansiyonu 75cm² lik flasklara alınarak CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücreler flaskın yüzey alanını yaklaşık %70-80 kaplayana kadar çoğalmaları sağlandı.

1.2.2.4. Hücre hatlarının stoklanması

Hücre hatlarını stoklamak için flask içindeki besiyeri uzaklaştırılır ve hücre yüzeyini kaplayacak kadar 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu eklendi ve 4 dakika, 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla hücrelerin yüzeyden kalkıp yuvarlak yapıyı aldıkları saptandığında besiyeri eklenerek tripsinizasyon işlemi inhibe edildi ve 15 ml’lik falcon tüpe alındı.

800rpm'de 5dk santrifüj yapıp pelet kısmını tüpte kalmasını sağlayacak şekilde süpernatant kısmı aspire edildi. Hücreleri stoklamak için 1 kriyoviale 5ml DMSO + 5ml NBFS + 40ml RPMI içeren dondurma solüsyonundan 1.5 ml eklendi. Stoklanan hücreler -80°C'de muhafaza edildi.

1.2.2.5. Hemositometre ile hücrelerin sayımı

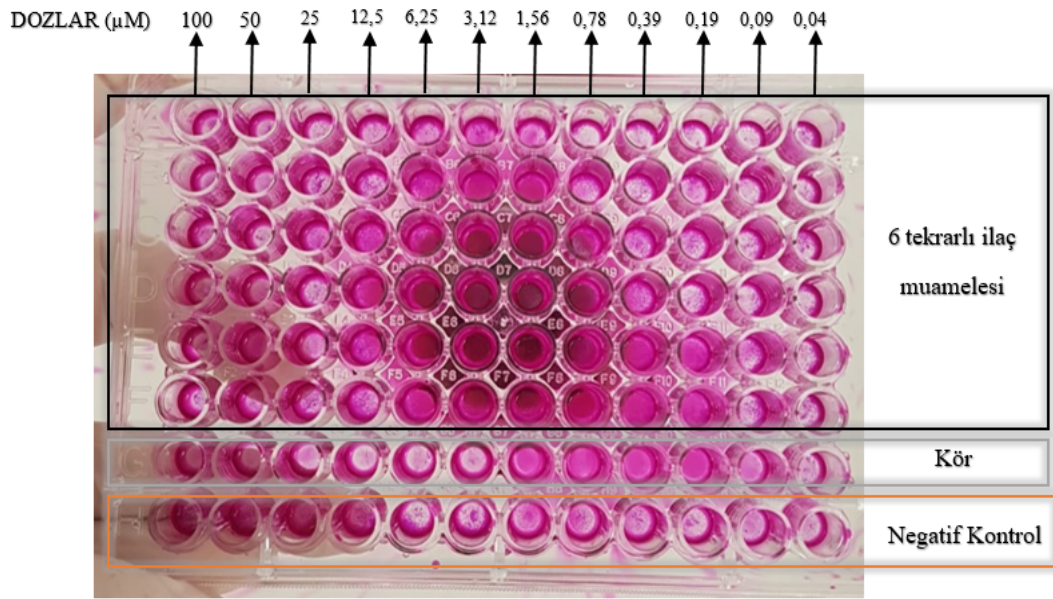
Test metodlarının uygularken plate well kuyucuklarına koyulacak hücrelerin sayım işlemi için Hemositometre kullanılmıştır. Tripsinizasyon işlemi sonrası hücre süspansiyonundan 10µl alınarak üzerine 10µl %0,5 tripan mavisi (Biological Industries, İsrail) eklendi. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyularak sayım yapıldı.

2.2.3. SRB Canlılık Metodu

SRB (Sulforhodamine B) canlılık analiz metodunun temel prensibi hücrel protein içeriğinin ölçümüne dayanan ve hücre bazlı çalışmalarda sitotoksiteyi araştırmak için yaygın olarak kullanılan düşük maliyetli bir yöntemdir (Orellena ve ark.,2016). SRB boyası asidik koşullarda hücrel proteinlere bağlanır, daha sonra bağlanan boya bazik ortamda çözünür hale getirilir ve renk yoğunluğu kolorimetrik olarak ölçülür.

Protokol dört ana aşamaya ayrılabilir: tedavinin hazırlanması, tercih edilen tedaviyle hücrelerin inkübasyonu, hücre fiksasyonu ardından SRB boyanması ve absorbans ölçümü. Bu yöntem, yapışık hücrelerde kemoterapötik ilaçları veya küçük molekülleri test etmek için etkili ve hassas bir şekilde kullanılabilir. Aynı zamanda gen ekspresyon modülasyonunun etkilerinin değerlendirilmesinde ve miRNA replasmanının hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini incelenebilmektedir (Kasinski AL ve ark.,2016).

SRB metodu için önce A549 hücreler, 96 kuyulu plate'e 100 µl besiyeri eklendi. Eş zamanlı olarak 400 µM ilaç stok solüsyonundan 100 µl seri dilüsyonla Şekil 3.1'de görüldüğü gibi eklenmiştir. Ardından, her kuyuya 5000 hücre olacak şekilde 100 µl hücre eklendi. Kör için kullanılan kuyulara 200 µl besiyeri eklendi. Negatif Kontrole ilaç muamelesi yapılmamış olup sadece besiyeri ve A549 eklenmiştir.



Şekil 2.1. İlaç dozları ve 96 kuyulu plate düzeni

72 saat 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda tedavi sonunda SRB Metodu için aşağıdaki adımlar izlendi;

- 1) Hücresel proteinleri fikse etmek için, her kuyuya %50(w/v) TCA(Trikloroasetik asit) çözeltisinde 50 µl eklendi ve +4°C'de 1 saat fikse edildi.
- 2) Fiksasyon sonunda plate ters çevrilerek TCA uzaklaştırıldı.

3) TCA'yı yıkamak için kuyular 5 defa deiyonize su ile yıkandı ve her yıkama sonunda plate ters çevrilerek döküldü.

4) Yıkama sonrası %0,4 SRB solüsyonundan (100 ml %1 asetik asit+ 400 mg SRB) her kuyuya 50 µl eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi.

5) İnkübasyon süresi sonunda plate ters çevrilerek SRB solüsyonu uzaklaştırıldı.

6) Bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için kuyular 5 defa %1 asetik asit (1 ml asetik asit+ 99 ml steril deiyonize su) ile yıkandı.

7) Yıkama sonunda kuyular içinde hiç damla kalmayacak şekilde havada kurutuldu.

8) Proteinlere bağlanan boyanın çözünebilmesi için, 10 Mm tris bazı(121 mg tris bazı+ 100 ml steril deiyonize su) 150 µl her kuyuya eklendi.

9) Shaker da 10 dakika 150 rpmde inkübe edildi.

10) Optik densite ELISA reader' 564nm da okundu.

2.2.4. İkili Florasan Boyama Yöntemi

DAPI ve Hoechst gibi boyalar hem canlı hem cansız hücreleri boyarlar. Bu nedenle canlı ve ölü hücrelerin ayrımını yapmak için ikinci bir boya kullanılır. Bu çalışmada DAPI ile tüm canlı ve ölü hücreler boyanırken, hücre membran bütünlüğü bozulan primer nekrotik veya geç apoptotik (sekonder nekrotik) ölü hücreleri görünür hale getirmek için PI kullanılmıştır. Canlı hücrelerin membran bütünlüğü korunduğu için PI hücre içine alınamaz ve boyanamaz. Sekonder nekroza kadar hücrenin membran bütünlüğü bozulmaz. Ölen hücrelerin apoptozis ya da nekroz ile ölüp ölmediğinin ayrımını hücre çekirdeği morfolojisine bakarak yapılır. Kromotin yoğunlaşması ve nükleus fragmentasyonu görülen hücrelerin apoptotik ölüm olduğu kabul edilir (Ulukaya, 2003).

İkili boyama için;

1) Hücreler sayılarak 96 kuyulu plate içerisine 3 tekrarlı olacak şekilde A549 hücreleri 100µl besiyerinde 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Eş zamanlı olarak üzerlerine Tingenonun'nun 100 µM dozu 100µl besiyeri içerisinde olacak şekilde muamele edildi. Negatif kontrol için 3 kuyuya 200 µl besiyeri koyuldu. 48 saat 37°C, %5 CO2'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

2) 48 saat inkübasyon sonrasında platedeki 180µl besiyeri aspire edildi.

3) 5ml PBS içinde 1 kuyuda 300mM olacak şekilde DAPI olacak şekilde eklendi ve pipetlendi. Ardından 1 kuyuda 1µg/ml olacak şekilde PI eklendi ve pipetlendi. Hazırlanan çözeltiden 50 µl her kuyuya eklendi. 30 dakika 37°C'de, %5 CO2'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

4) Florasan mikroskopunda görüntüleme yapıldı.

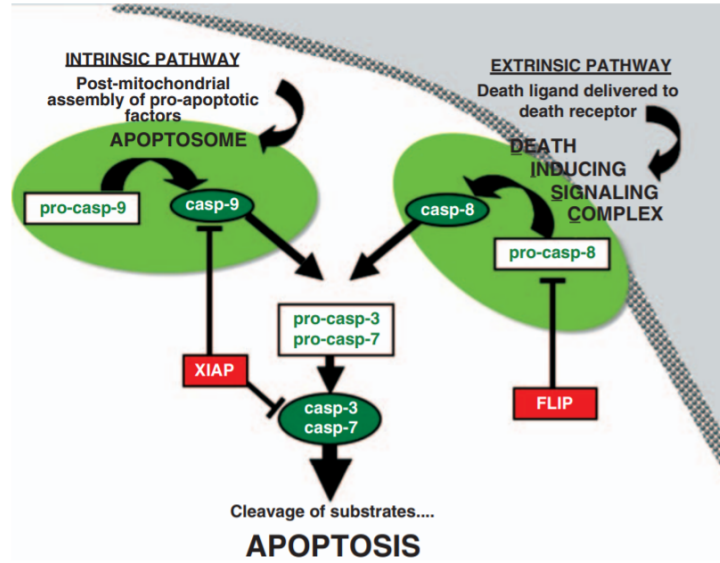
Tablo 2.1. Floresan mikroskopide apoptotik hücrelerin nekrotik ve normal hücrelerden ayırımı.

	Hoechst boyası	Propidiyum iyodür	Apoptotik morfoloji
Nekrotik hücreler	+	+	-
Apoptotik hücreler	+	-	+
Normal hücreler	+	-	-

2.2.5. Akım Sitometri Analizleri

2.2.5.1. Kaspaz 3/7 testi

Kaspaz olarak bilinen proteolitik enzimlerin kaskad aktivasyonu, çoğu apoptozis aşamasının kritik bir bileşenidir. Biri ölüm reseptörü stimülasyonu ile tetiklenen ve diğeri mitokondride başlatılan iki ana kaspaz kaskad, DNA hasarı gibi çeşitli hücrel stres indükleyicilere cevap olarak tanımlanmıştır. Kaspaz 3/7 indüklenmesi, kaspaz 9 ile yada kaspaz 8 in aktivasyonu ile gerçekleşebilir. Kaspaz 9 ile mitokondriyal, kaspaz 8 ise dışsal yolak ile pro kaspaz 3/7 altifleşerek apoptosiz gerçekleşmiştir (Şekil 2.2) (Salvesan ve ark., 2008).



Şekil 2.2. Kaspaz 3/7 yolağı (Salvesan ve ark., 2008)

Kaspaz 3/7 testi için;

1) Hücreler sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına A549 her kuyuya 1 ml içerisinde 300×10^3 hücre olacak ekim yapıldı. Eş zamanlı olarak üzerlerine

Tingenonun'nin 100 μ M dozu 1 ml besiyeri içerisinde olacak şekilde uygulandı 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

2) 6 kuyulu hücre kültür kaplarından besiyeri aspire edildi ve serumdan uzaklaştırmak için kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yıkandı. PBS ortamdaki aspire edildi ve yapışan hücrelerin kaldırmak için 0,6 ml %0,05 Tripsin-EDTA(Gibco) kullanıldı. Yaklaşık 5 dakika 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı ve mikroskop ile hücrelerin kalktığına emin olduğunda 15ml'lik falkonlara toplandı 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

3) 1 ml'sinde 40x10³ hücre olacak şekilde hücre peleti sulandırıldı.

4) Tedavi yapılan hücre süspansiyonundan 50 μ l eklendi.

5) Ardından kaspaz3/7 çalışma solüsyonundan ependorfla 5 μ l eklendi.

6) Pipetaj işleminin ardından ependorf kapağı açık bir şekilde 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 30dk inkübasyona bırakıldı.

7) Inkübasyon süresi sonunda ependorf içerisinde hücre süspansiyonunun 150 μ l DNA'ya bağlanabilen 7-AAD eklendi ve homojen hale getirildi ve oda sıcaklığında, karanlık ortamda 5 dk inkübasyona bırakıldı.

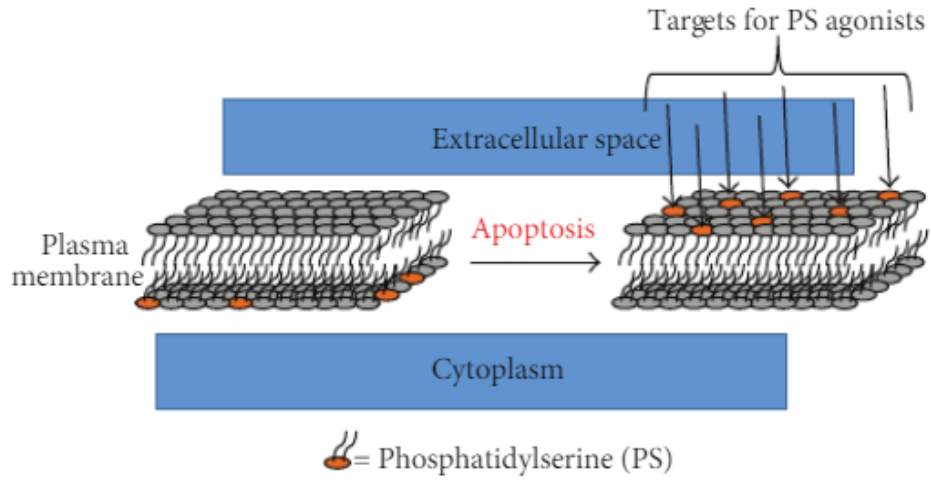
8) Daha sonra muse cihazında kaspaz3/7 aktivitesi ölçümü yapıldı.

2.2.5.2. *Anneksin-V Metodu*

Normal hücrelerde hücre zarının membran iç yüzeyinde PS(Fosfatidil serin) bulunur. Apoptozis ile hücre ölümü gerçekleştiğinde normalde sitoplazma yüzeyinde bulunan PS molekülleri transloke olarak hücre zarının dış yüzeyine çıkarlar (Şekil 3.2).

PS translakasyonu erken apoptotik dönemde yani hücre membran bütünlüğü bozulmadığı dönemde meydana gelir. Anneksin-V, PS moleküle bağlanan bir protein olması nedeniyle florasan bir molekü ile işaretlendiğinde apoptotik hücreler görünür hale getirilir (Ulukaya 2013). Floresans karkterdeki DNA'ya yüksek

affiniteye sahip 7-ADD (7- Aminoaktinomisin D) boyası kullanılarak nekrotik hücrelerde DNA'da G-C bazı yoğun bölgelere bağlanır.



Şekil 2.3. Apoptotik hücrelerde fosfatidil serin translokasyonu (Sogbein ve ark., 2014).

Anneksin- V için, aşağıdaki adımlar takip edildi;

1) A549 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına her kuyuya 1 mililitrede 300.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Aynı anda üzerine *Tingenon*'un 5 μ M dozu 1ml besiyeri içerisinde olacak şekilde hücreler muamele edildi. 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon yapıldı. Tedavi süresi sonunda öncelik olarak kit oda sıcaklığında bekletildi.

2) 6 kuyulu hücre kültür kaplarından besiyeri aspire edildi ve serumdan uzaklaştırmak için kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yıkandı. PBS ortamdaki aspire edildi ve yapışan hücrelerin kaldırmak için 0,6 ml %0,05 Tripsin-EDTA(Gibco) kullanıldı. Yaklaşık 5 dakika 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda

inkübasyona bırakıldı ve mikroskop ile hücrelerin kalktığına emin olunduğunda 15ml'lik falkonlara toplandı 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

3) Süpernatantları uzaklaştırıldı ve 100 µl %1 NBCS içeren besiyeri eklendi ve ependorflara 100µl hücre süspansiyonu alındı.

4) Üzerine 100µl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi.

5) Vorteks yapılarak homojen hale getirildi.

6) Karanlık ortamda 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

7) Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı

2.2.5.3. Oksidatif stres belirlenmesi

Süperoksit radikali ($O_2 \cdot^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH\cdot$) üç majör reaktif oksijen türleri (ROS) 'ndendir ve normal metabolizama olaylarında az miktarda bulunur. ROS hem toksik hem de yararlı olmasıyla ikili bir role sahiptir. Bu denklemlerle bu zıt rollerde denge önemlidir. Çünkü ROS, bir yandan, kanser hücrelerinin çoğalmasını, hayatta kalmasını ve hipoksiye adaptasyonunu kolaylaştırarak, protumoriyenik sinyalleşmeyi teşvik edebilir. Öte yandan antitumoriyenik sinyalleşmeyi teşvik edebilir ve oksidatif stres kaynaklı kanser hücresi ölümünü tetikleyebilir. Hücre transformasyonu ve tümörizasyonu için gerekli hücre sinyal yollarını hiperaktivize etmek için, kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla ROS üretim hızlarını artırır. Bununla birlikte, ROS homeostazını korumak ve hücre ölümünden kaçmak için kanser hücreleri, antioksidan kapasitelerini artırır(Liou GY ve ark.,2010)

Hücrelerdeki ROS seviyesini saptamak için Muse® Oksidatif Stres kiti kullanıldı. Bu kit süperoksit radikallerini saptayarak oksidatif stres yüzdesi hakkında bilgi vermektedir.

Oksidatif stres testi için, aşağıdaki adımlar takip edildi.

1) A549 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına her kuyuya 1 mililitrede 300.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Aynı anda üzerine

Tingenon'un 5 µM dozu 1ml besiyeri içerisinde olacak şekilde hücreler muamele edildi. 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon yapıldı. Tedavi süresi sonunda öncelik olarak kit oda sıcaklığında bekletildi.

2) 6 kuyulu hücre kültür kaplarından besiyeri aspire edildi ve serumdan uzaklaştırmak için kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yıkandı. PBS ortamdaki aspire edildi ve yapışan hücrelerin kaldırmak için 0,6 ml %0,05 Tripsin-EDTA(Gibco) kullanıldı. Yaklaşık 5 dakika 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı ve mikroskop ile hücrelerin kalktığına emin olduğunda 15ml'lik falkonlara toplandı 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

3) Santrifüj sonrası hücre peleti ml'sinde 1x10⁶ hücre olacak şekilde Muse® Oksidatif Stres kiti içindeki oksidatif stres çalışma solüsyonu ile karıştırıldı ve homojen hale getirilip 30 dk inkübasyona bırakıldı.

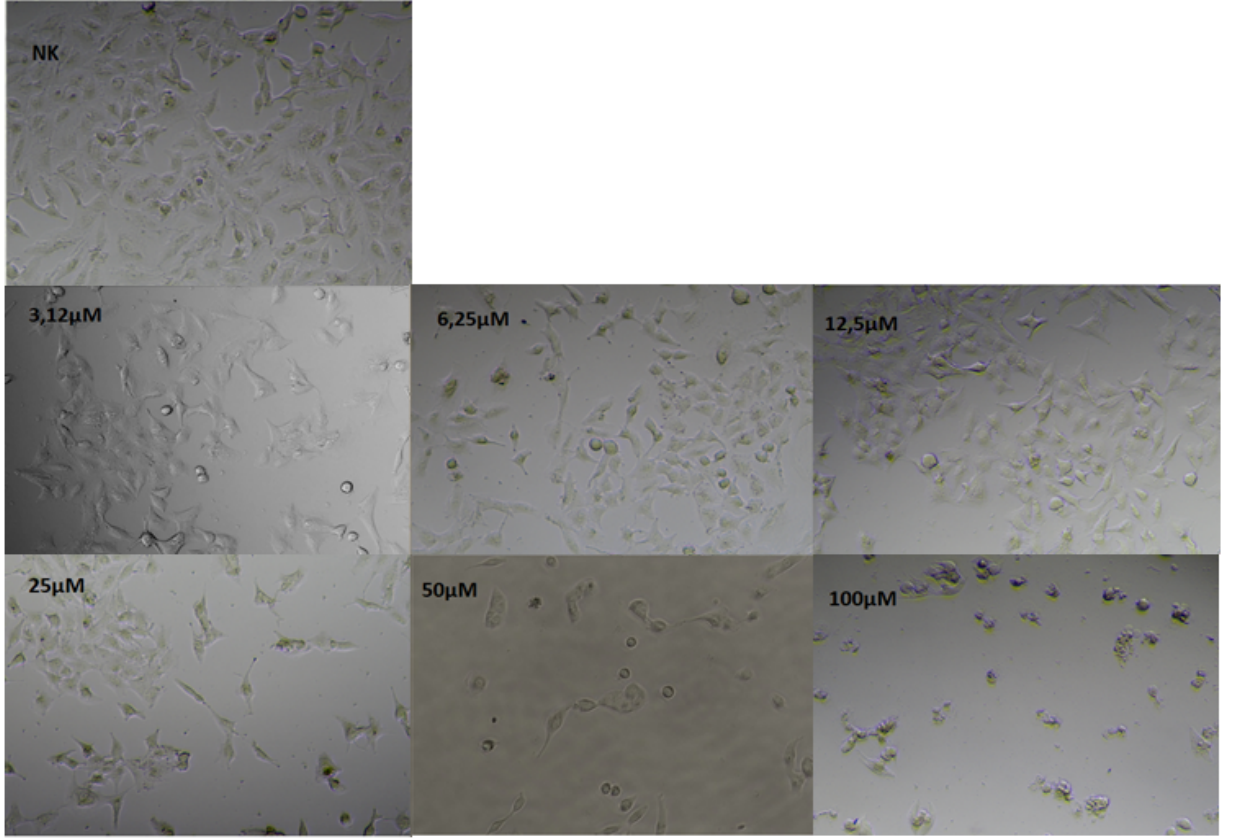
4) Inkübasyon ardından Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı.

3. BULGULAR

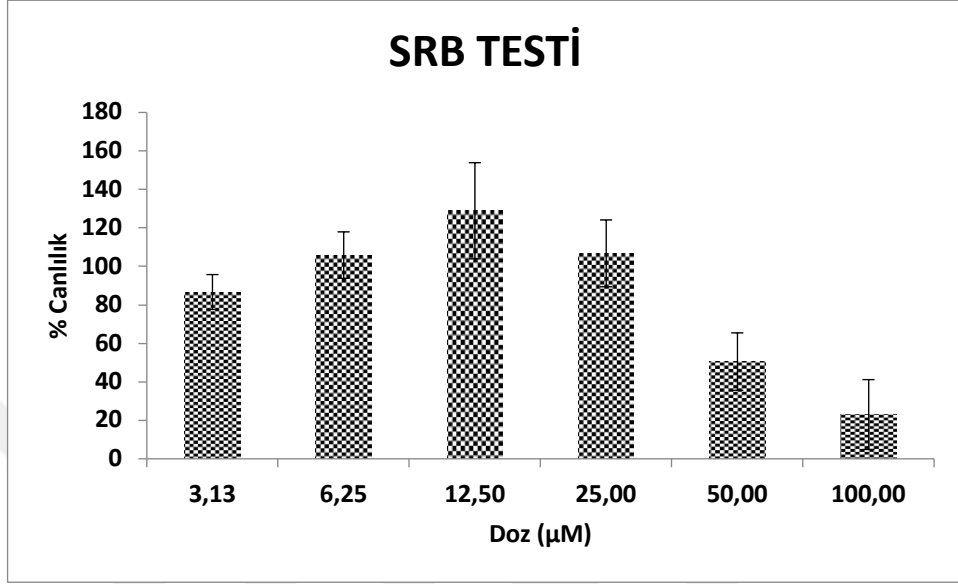
3.1. SRB TESTİ BULGULARI

SRB boyaması yapmadan önce farklı dozlardaki Tingenon bileşiminin 72 saatlik tedavi sonrasında faz fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.1). Negatif kontrol (NK) kuyucuğundaki A549 hücreleri beklendiği gibi yoğunlukta proliferasyon gözlemlenmiştir. 25µM dozundan itibaren mikroskop gözleminde yeterli proliferasyonun olmadığı gözlenmiştir. 100 µM dozunda alandaki hücrelerin çoğunun ölü olduğu gözlemlenmektedir.

Tingenon bileşiminin 72 saat tedavisinde farklı konsantrasyonlarının (0,04-100 µM) hücre canlılığı üzerine etkisi SRB testi ile belirlendi. Doz konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 3.1. A549 hücrelerinde 20 α -hidroksitingenon bileşiğinin tedavi sonundaki 10X faz görüntüleri.



Şekil 3.2. 20α-hidroksitingenon bileşiği uygulanan A549 hücre hattının canlılık yüzde grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir.

SRB verilerine göre A549 hücrelerinde Tingenon bileşiğinin sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC_{50} (tedavi sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC_{90} (tedavi sonrası hücrelerin %90'ını öldüren konsantrasyon) değerleri ise Tablo 3.1' de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. 20α-hidroksitingenon bileşiği uygulanan A549 hücre hatlarında SRB canlılık testi sonuçlarına göre IC_{50} ve IC_{90} değerleri.

Doz (μM)	A549
IC_{50}	50,9±1,5
IC_{90}	123,6±2,8

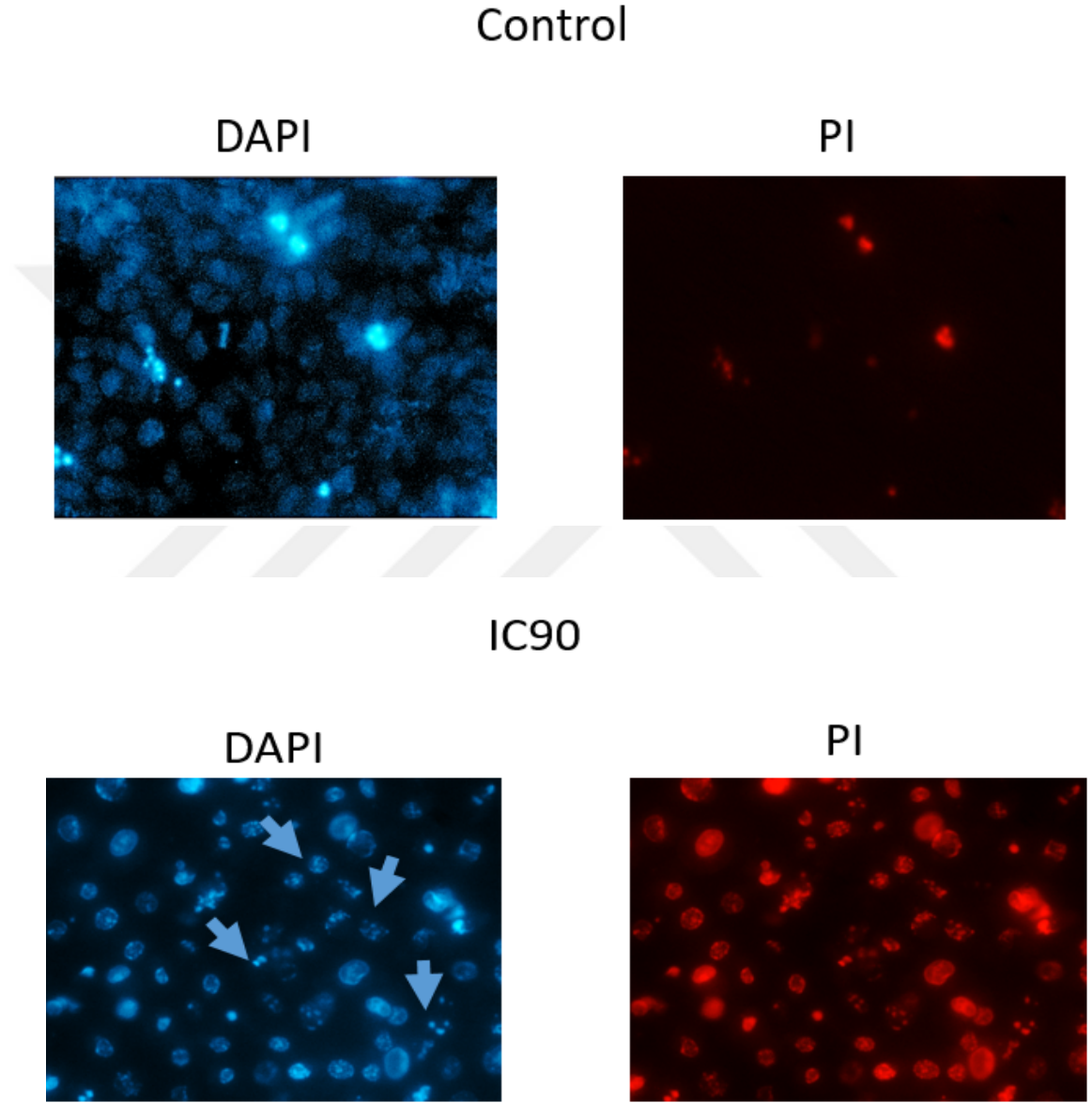
3.2. DAPI VE PI İLE İKİLİ FLORASAN BOYAMA YÖNTEMİ BULGULARI

Florsan boyamada DAPI(mavi renk) tüm canlı ve ölü hücreleri boyamak, PI (kırmızı renk) ise sadece membran bütünlüğü bozulan hücrelerin çekirdeğini boyaması nedeniyle ölü hücreleri gözlemlemek için kullanıldı. Apoptosizde DNA belli baz aralıklarında fragmente olmaya başlar ve parçalı nükleus yapıları oluşur. Apoptotik hücreler boyama sonucunda daha parlak ve küçülmüş olarak görülür.

Nükleus morfolojisinde pignotik yapı, küçülme, fragmentasyon yada kromotin yoğunlaşması ile ölümü bağdaştırılır. Fakat hücrenin küçülmüş morfolojisine rağmen yaşadığını anlamak için PI boyaya ihtiyaç duyulur. Çünkü PI boya alan hücre ölmüş demektir.

A549 hücrelerinin 48 saat ile tedavisi sonucunda florosan mikroskobunda yapılan gözlem Şekil 4.3' de verilmiştir. Kontrol grubu beklendiği gibi nükleus morfolojisi yuvarlak ve intaktır.

Tedavi sonucu hücrelerde ise parçalı nükleus yapıları ve/veya kondense kromotin apoptotik yapılar açık bir şekilde görüldü.

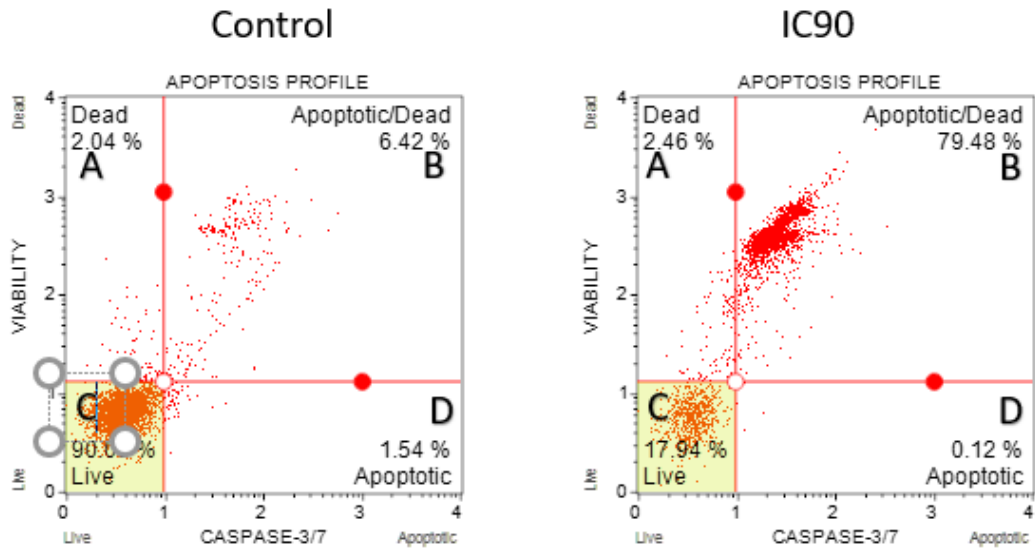


Şekil 3.3. 20α -hidroksitingenon bileşiminin 48 saatlik tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. Mavi ok: Piknotik veya kondanse nükleus

3.3. AKIM SİTOMETRİSİ BULGULARI

3.3.1. Kaspaz 3/7 Testi Bulguları

Kaspaz 3/7 aktivasyonunun apoptotik hücre ölümünde bilgi verir. Apoptosiz proteazların aktifleşmesiyle oluşur. Akım sitometrisinde Kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmesinde A549 hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasında, Tingenon bileşiğinin tedavi sonucunda total apoptotik hücre yüzdesi %79,6 (B+D) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



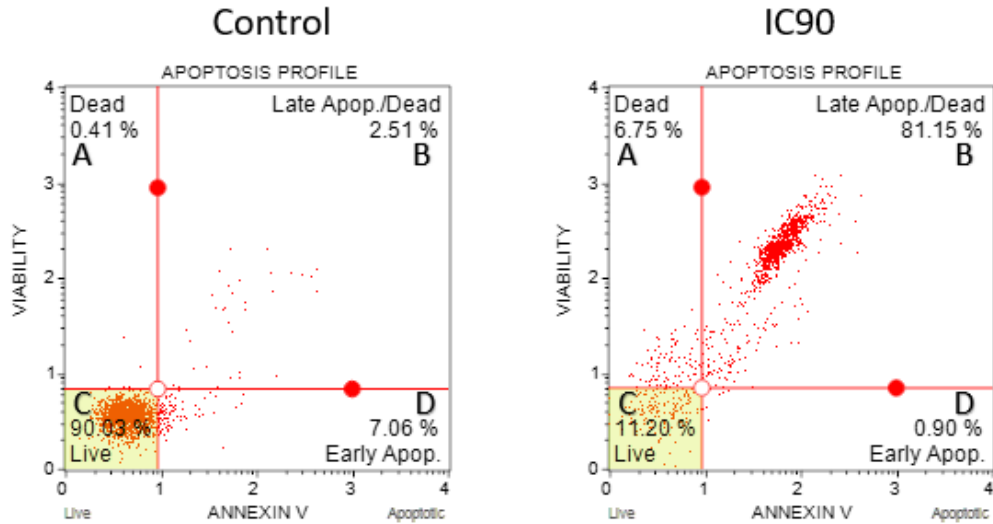
Şekil 3.4. 20 α -Hidroksi Tingenon bileşiğinin ile 48 tedavi sonrasında Kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları.

A:Nekroz, B:Geç Apoptozis, C: Canlılık, D:Erken Apoptozis

3.3.2. Annexin-V Testi Bulguları

Annexin V-FITC ve 7-AAD negatif olan bölge canlı hücreleri (C), Annexin V-FITC ve 7-AAD pozitif olan bölge geç apoptotik hücreleri (B), Annexin V-FITC pozitif ve 7-AAD negatif olan bölge erken apoptotik hücreleri (D), Annexin V-FITC negatif ve 7-AAD pozitif olan bölge ise nekrotik hücreleri (A) yüzde değerlerini göstermektedir.

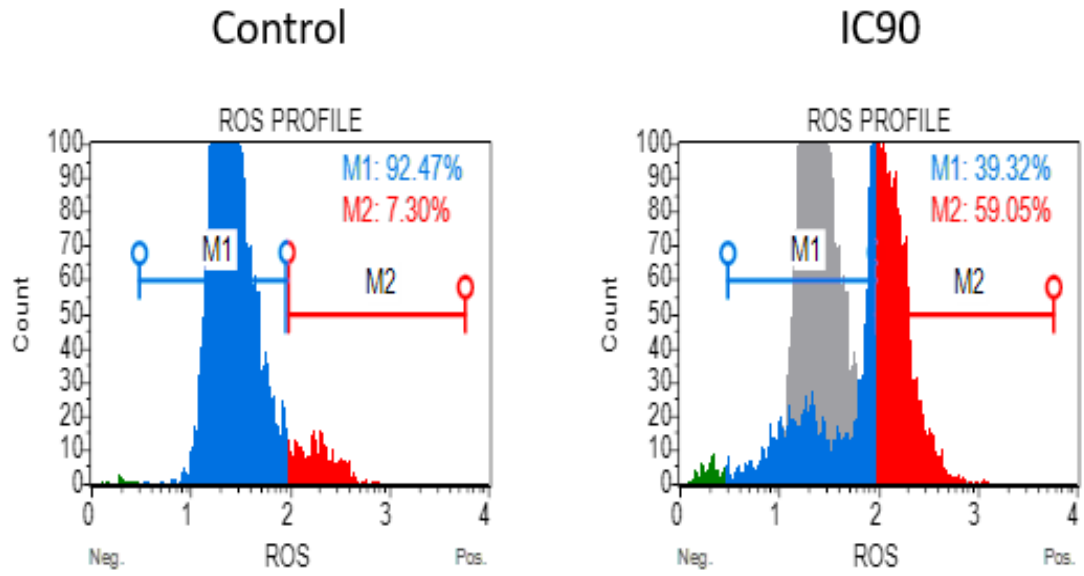
Akım sitometrisinde Annexin-V değerlendirmesinde A549 hücreleride 48 saatlik tedavi sonrasında apoptotik oran %82,05 (B+D) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5). Kontrol grubunda tedavi uygulanmayan A549 hücreleri, beklendiği gibi canlılık bölgesinde (C) canlılık %90 üzerindedir. Annexin-V değerlendirmesi sonucunda sekonder nekroz yani geç dönem apoptozis gözlemlendi. Bu durum hücrelerde görülen apoptozisin kaspaz bağımlı olabileceğini göstermektedir.



Şekil 3.5. 20 α -Hidroksi Tingenon bileşimini ile 48 tedavi sonrasında A549 akciğer kanser hücrelerinde Annexin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramları. A:Nekroz, B:Geç Apoptozis, C:Canlılık, D:Erken Apoptozis

3.3.3. Oksidatif Stres Değerlendirmesi

Tingenon bileşiminin A549 hücrelerinde 48 saatlik tedavi sonunda meydana gelen apoptotik ölümün ROS kaynaklı olup olmadığını görmek için akım sitometresinde ROS miktarı değerlendirildi. ROS pozitif hücrelerin %59,05 olduğu görüldü. Kontrol grubunda ROS miktarı beklendiği gibi çok düşük miktardadır.



Şekil 3.6. 20 α -Hidroksi Tingenon bileşiği ile 48 saat tedavi sonrasında A549 akciğer kanser hücrelerinde ROS yüzde değerlerinin histogramı. M1: ROS negatif hücreler (-); M2: ROS pozitif hücreler ROS(+)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada A549 hücre hattında 20 α -hidroksitingenon bileşiminin 0,04 μ l' de 100 μ l' a kadar dozlarına 72 saatlik tedavi uygulanmıştır. Doza bağılı fakat zaman bağımsız uygulanan SRB metodu sonucuna göre, 20 α -hidroksitingenon bileşiminin düşük konsantrasyonların ölüme sebep olmadığı gözlenmiştir. Ancak, özellikle 12,5 μ M dozundan itibaren üst konsantrasyonlara gittikçe artan bir ölüm oranı gözlenmiştir. Bu çalışmadaki Tingenon bileşiminin IC_{50} değeri 50,9 μ M olduğu belirlenmiştir.

Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında, Tingenon ve türevi diğer bileşikler (22-hidroksitingenon ve pristimerin) ile Gomes ve arkadaşları (2011) 'nın yaptığı çalışmada meme (LM3) and ve akciğer (LP07) hücre hatlarında 2- 5 μ M arasında IC_{50} değerleri saptanmış olup bu bileşiklerin önemli bir antikanser ajanı olabileceği belirtilmiştir.

Cevatemre ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmada MCF-7 meme kanser hücrelerinde düşük dozlarda (2.38 μ M) 20 α -hidroksitingenon bileşiminin türevi olan Tingenon B (22b-hydroxytingenone)' nin Endoplazmik Retikulum Stresinin hücre ölümünü indüklediğini saptanmıştır.

Yang ve arkadaşları (2007)' nin pristimerinin PC-3 prostat kanser hücre hatlarında IC_{50} değeri 3 μ M olarak bulunmuş ve kaspaz bağımlı apoptosiz olduğu belirtilmiştir. Costa ve ark. (2008) ise HL-60 hücre hattında IC_{50} değerini 0,88 μ M olarak saptanmış ve pristimerinin DNA sentezi inhibasyonu yaparak hücre ölümü gerçekleştirmesi nedeniyle potansiyel bir antikanser ilacı olabileceğini belirtilmiştir.

20 α -hidroksitingenon bileşiminin A549 akciğer kanser hücre hatlarında tek zamanlı doza bağlı tedavisinde SRB metodu ile IC_{90} değeri 123,6 olarak belirlenmiştir. Ardından IC_{90} değeri ile hücre ölüm modu parametrelerini belirleme yoluna gidilmiştir.

Annexin V ile flowsitometrik değerlendirmede 48 saat boyama sonucunda hücrelerin geç apoptozise gittiği gözlemlendi. Apoptozisi gözlemledikten sonra apoptozis sürecinin en önemli göstergelerinden olan kaspaz aktivasyonu değerlendirildi. Kaspaz 3/7 aktivitesinde artış gözlemlendi.

Doğal bileşiklerin antioksidan etkilere neden olduğu gibi oksidatif strese de neden olabilmektedir. Bu nedenle özellikle reaktif oksijen türlerinden Muse Analiz Kiti'nin dedekte ettiği superoksit radikallerin miktarına bakıldı. A549 hücrelerinde kontrole kıyasla ROS miktarının belirgin derecede arttığı görülmüştür. Hücre içindeki yüksek ROS miktarı apoptozisun uyarılmasına yol açarken; düşük düzeydeki ROS miktarı ise bir sinyal ileti molekülü gibi görev yaparak hücrenin büyümesini ve hayatta kalımını düzenlemektedir (Wong ve ark. 2010). Bu nedenle yüksek ROS'un artışıyla, Tingenon'un apoptotik ölüme etkisi olduğu düşünülmektedir. Tingenon bileşiminin A549 hücre hattındaki ROS miktarının artışının DNA hasarına sebep olup olmadığına protein ve gen düzeyinde araştırmaları sonraki çalışmalarda yapılmalıdır.

Kaspaz 3/7 değerlendirmesinde; geç apoptotik hücre yüzdesi %79,48 (B) olarak belirlenmiştir. Apoptotik ölümün içsel yada dışsal yolla da olabileceği görüldü. Mitokondriden salınan sitokrom c' nin kaspaz 3'ün indüklenmesine sebep olup apoptosize neden olmuş olabilir. Superoksit radikallerinin kontrol grubuna karşı artışı sekonder nekroz olduğunu destekler niteliktedir. Fakat oksidatif stres bakılırken aynı zamanda DNA hasar kiti kullanılarak DNA hasarına yol açıp açmadığı bakılması gerekirdi. İlerdeki çalışmalarda DNA hasarına bakılarak ROS artışı bağdaştırılmalı. Gomes ve arkadaşları (2011) yaptığı çalışmada Tingenon bileşiminin

türevi olan prismetirin molekülünü meme kanser hücrelerinde DNA hasarına sebep olarak apoptozise gittiğini ileri sürmüşlerdir. Tingenon molekülü A549 hücrelerinde DNA hasarına sebep olma nedeniyle ROS seviyelerinde artış gözlemlenmiş olabilir.

Ölümlerin apoptotik ölüm olup olmadığı görmek için ikili florasan boyama yapılmıştır. İkili boyama sonucuna bakıldığında, DAPI ve PI boyası ile piknotik ve/veya fragmente nükleusların varlığı görüntülendi. DAPI ile boyama sonucunda canlı ve ölü tüm hücreler boyayı almıştır. PI boya ise sadece membran bütünlüğünün bozulması nedeniyle ölen hücreler almış olup apoptotik yapılar çok net gözlemlendi. Tedavinin sekonder nekroz/geç apoptozise neden olduğu (DAPI pozitif, PI pozitif) görüldü.

Tingenon molekülünün A549 akciğer kanser hücre hattında apoptotik etkisi yüksek dozlarda görülmektedir. Bütün bu sonuçlar dikkate alındığında Tingenon antikanser ilaç adayı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Asensi, V., Collazos, J., Celada, A., & Garay, E. V. (2017). Role of Neutrophils Apoptosis in Osteomyelitis Pathogenesis. *Clinical Microbiology: Open Access*, 06(01).

Bhatia, R., Lopipero, P., & Smith, A. H. (1998). Diesel Exhaust Exposure and Lung Cancer. *Epidemiology*, 9(1), 84–91.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.

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*, 6.

Cevatemre, B., Botta, B., Mori, M., Berardozzi, S., Ingallina, C., & Ulukaya, E. (2016). The plant-derived triterpenoid tingenin B is a potent anticancer agent due to its cytotoxic activity on cancer stem cells of breast cancer in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, 260, 248–255.

Costa, P. M. D., Ferreira, P. M. P., Bolzani, V. D. S., Furlan, M., Corsino, J., Moraes, M. O. D., ... Pessoa, C. (2008). Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. *Toxicology in Vitro*, 22(4), 854–863.

Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports*, 23(3), 394.

Gomes, J. P. M., Cardoso, C. R. P., Varanda, E. A., Molina, J.-M., Fernandez, M. F., Olea, N., ... Vilegas, W. (2011). Antitumoral, mutagenic and (anti)estrogenic activities of tingenone and pristimerin. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 21(6), 963–971.

González, A., Bazzocchi, I., Moujir, L., & Jiménez, I. (2000). Ethnobotanical uses of celastraceae. Bioactive metabolites. *Bioactive Natural Products (Part D) Studies in Natural Products Chemistry*, 649–738.

Gunatilaka, A. A. L., Tamm, C., & Walser-Volken, P. (1996). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Wien: Springer-Verlag.

Hammond, E. C., Selikoff, I. J., & Seidman, H. (1979). Asbestos Exposure, Cigarette Smoking And Death Rates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 330(1 Health Hazard), 473–790. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

Hughes, J. M., & Weill, H. (1994). Potency versus importance in fiber pathogenicity. *American Journal of Industrial Medicine*, 25(4), 609–610.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90.

Kasinski, A. L., Kelnar, K., Stahlhut, C., Orellana, E., Zhao, J., Shimer, E., ... Slack, F. J. (2014). A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 34(27), 3547–3555.

Liou, G.-Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479–496.

Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. (2017). Terpenoids. *Pharmacognosy*, 233–266.

Maytenus chiapensis. Retrieved from <https://www.inaturalist.org/taxa/287635-Maytenus-chiapensis>

Mcilwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2015). Caspase Functions in Cell Death and Disease: Figure 1. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4).

Mossman, B. T., & Churg, A. (1998). Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157(5), 1666–1680.

National Lung Screening Trial Research Team. Aberle DR, Berg CD, Black WC, Church TR, Fagerstrom RM, et al. (2011). Radiology. *The National Lung Screening Trial: overview and study design*. 258(1):243–53

Orellana, E., & Kasinski, A. (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio-Protocol*, 6(21).

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(2), 74–108.

Pershagen, G., & Simonato, L. (1990). Epidemiological Evidence on Air Pollution and Cancer. *Air Pollution and Human Cancer*, 63–74

Salvesen, G. S., & Riedl, S. J. (2008). Caspase Mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy*, 13–23.

Shivapurkar, N., Reddy, J., Chaudhary, P. M., & Gazdar, A. F. (2003). Apoptosis and lung cancer: A review. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(5), 885–898

Sogbein, O. O., Pelletier-Galarneau, M., Schindler, T. H., Wei, L., Wells, R. G., & Ruddy, T. D. (2014). New SPECT and PET Radiopharmaceuticals for Imaging Cardiovascular Disease. *BioMed Research International*, 2014, 1–24.

Sun, S., Schiller, J. H., & Gazdar, A. F. (2007). Lung cancer in never smokers — a different disease. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 778–790.

Taddeo, V., Castillo, U., Martínez, M., Menjivar, J., Jiménez, I., Núñez, M., & Bazzocchi, I. (2019). Development and Validation of an HPLC-PDA Method for Biologically Active Quinonemethide Triterpenoids Isolated from *Maytenus chiapensis*. *Medicines*, 6(1), 36. doi: 10.3390/medicines6010036

Tingenone. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tingenone>

Todd R, Wong DT. (1999) Anticancer Reserch. *Oncogenes*. 1999;19(6A):4729-46.

Travis, W. D., Travis, L. B., & Devesa, S. S. (1995). Lung cancer. *Cancer*, 75(S1), 191–202.

Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*, 29(6), 468–480. doi: 10.1002/cbf.1774

Ulukaya, E. 2003. Apoptozis ders notları. Erişim:[<https://docplayer.biz.tr/37719187-Apoptozis-dr-engin-ulukaya.html>] (Erişim tarihi, 2019).

Wong, C. H., Iskandar, K. B., Yadav, S. K., Hirpara, J. L., Loh, T., & Pervaiz, S. (2016). Correction: Simultaneous Induction of Non-Canonical Autophagy and Apoptosis in Cancer Cells by ROS-Dependent ERK and JNK Activation. *Plos One*, 11(7). doi: 10.1371/journal.pone.0159352

Yang, H., Landis-Piwowar, K. R., Lu, D., Yuan, P., Li, L., Reddy, G. P.-V., ... Dou, Q. P. (2007). Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(1), 234–244.