

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SODYUM DEOKSİKOLAT MADDESİNİN MEME KANSER
HÜCRE HATTINDA APOPTOTİK, SİTOTOKSİK VE DNA
HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Biyolog Huda ALHAMMUD

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE

VAN-2019

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2019-7354 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Biyolog Huda ALHAMMUD tarafından hazırlanan “*Sodyum Deoksikolat Maddesinin Meme Kanseri Hücre Hattında Apoptotik, Sitotoksik ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi*” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19/07/2019


İmza

Prof. Dr. Yasin Tülüce

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Başkanı


İmza

Doç. Dr. Zafer Çetin

Sanko Üniversitesi

Jüri Üyesi


İmza

Dr. Öğr. Üyesi Gökhan Görgişen

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.


İmza
Unvanı Adı ve Soyadı

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Sodyum Deoksikolat Maddesinin Meme Kanseri Hücre Hattında Apoptotik, Sitotoksik ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi*” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Huda ALHAMMUD

Tarih: 18/07/2019

İmza:

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her konuda özverisi, sabrı ve bilimsel katkılarıyla yoluma ışık tutan, çözümler üreten ve hep ileriye doğru gitmem için bana destek olan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Yasin TÖLÜCE hocama,

Yüksek lisans eğitimi süresince tezimin gerek deney aşamalarında gerekse yazım aşamasındaki yorumları ve değerli katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr Halil ÖZKOL, Dr. Öğretim Üyesi Gökhan GÖRGİŞEN, Dr. Öğretim Üyesi Zehra KAYA hocalarıma ve ayrıca Tıbbı Parazitoloji bölümünden değerli Doç. Dr. Yunus Emre BEYHAN hocama,

Tez çalışmam süresince bana her zaman destek olan Tıbbı Biyoloji Anabilim Dalında öğrenim gören arkadaşlarımdan; Zafer YAREN, Aysun ARSLAN, Yılmaz ECER, Sedat KÖSTEKÇİ, Ahmet Yasin KELEŞ, Selva TUFAN ve bölümümüzün diğer yüksek lisans öğrencilerine, öte yandan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesinde okuyan Suriyeli arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışma süresince de sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen Canım Annem, Babam Abi ve Ablalarım, Amcam ve Kayınvalideme, çalışmam esnasında özveri itina ile çocuklarıma yokluğumu hissettirmeyen değerli eşime beni yalnız bırakmadıkları ve her zaman yanımda oldukları için sonsuz teşekkürler...

ÖZET

Alhamud H, Sodyum Deoksikolat Maddesinin Meme Kanser Hücre Hattında Apoptotik, Sitotoksik ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2019. Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir. Kemoterapi genellikle metastaz azaltmak ve tümörün küçülmesi için uygulanan antineoplastik ilaçlar ile yapılan bir tedavidir. Bu çalışmanın amacı Sodyum deoksikolat maddesinin meme kanser hücre hattında (MCF-7) sitotoksik, apoptotik ve DNA hasarının moleküler mekanizmaları üzerine etkisini araştırmaktır. Bu çalışmada kanser hücrelerini etkileme potansiyeline sahip olduğu hipotezine dayanarak Sodyum deoksikolatın meme kanser hücre hattında farklı dozları kullanılmıştır. Antikanser özellik tespiti için Sodyum deoksikolat maddesinin MCF-7 meme kanser hücreleri ile kontrol grubu olarak sağlıklı normal meme hücreleri (CRL- 4010) üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemiyle incelendi. Sitotoksik etkinin belirlenmesinden sonra, Sodyum deoksikolatın aktif dozunun apoptoz ve DNA hasarı üzerindeki etkinliği apoptotik DNA ladder ve Western Blot metodu ile incelenmiştir. Bunu yanı sıra oksidatif stres indeksi ve hücre göçü testleri yapıldı. Sonuç olarak Sodyum deoksikolat maddesinin MCF-7 ve CRL-4010 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi gösterdiği ama hücrelerin DNA'larına zarar vermediği tespit edildi ve apoptozise yol açan birkaç proApoptotik proteinlerin varlığı tespit edildi. Sodyum deoksikolatın MCF-7 kanser hücrelerinde, kanser için bir prediktif risk faktörü olarak değerlendirebileceğimiz paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitesini önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Ayrıca Sodyum deoksikolatın hücre göçünü zamana bağlı olarak geciktirdiği belirlendi. Sonuçlar, Sodyum deoksikolatın meme kanseri hücrelerinde antimetastatik bir etkiye sahip olduğunu ve daha ileri kanser çalışmaları için potansiyel bir ajan olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, DNA Hasarı, Meme Kanseri, Sitotoksikite, Sodyum Deoksikolat.

ABSTRACT

Alhammad H, The Effect of Sodium Deoxycholate Materials on Apoptotic, Cytotoxic and DNA Damage of Breast Cancer Cell Line. University of Van Yuzuncu Yil, Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, M.Sc. Thesis, Van, 2019. Breast cancer is the most common cancer in women and the leading cause of cancer death worldwide. Chemotherapy is a treatment usually performed with antineoplastic drugs to reduce metastasis and shrink tumor. The aim of this study was to investigate the effect of sodium deoxycholate on the molecular mechanisms of cytotoxic, apoptotic and DNA damage in the breast cancer cell line (MCF-7). In this study, different doses of sodium deoxycholate are used in MCF-7 breast cancer cell line based on the hypothesis that it has the potential to affect cancer cells. Cytotoxic effect of sodium deoxycholate on MCF-7 breast cancer cells and healthy normal breast cells (CRL- 4010) was examined by MTT method for anticancer property detection. After determining the cytotoxic impact, the efficacy of active sodium deoxycholate dose on apoptosis and DNA damage was examined by apoptotic DNA ladder and Western Blot methods. In addition, oxidative stress index and cell migration tests were performed. As a result, it was determined that sodium deoxycholate showed cytotoxic effect on MCF-7 and CRL-4010 cells but did not damage the DNA of the cells, and the presence of several proApoptotic proteins causing apoptosis were determined. Sodium deoxycholate was found to significantly reduce the activity of paraoxonase and arylesterase enzyme in MCF-7 cancer cells, which can be considered as a predictive risk factor for cancer. Sodium deoxycholate was also found to delay cell migration over time. The results showed that Sodium deoxycholate has an antimetastatic effect in breast cancer cells and is a potential agent for further cancer studies.

Key words: Apoptosis, Breast Cancer, Cytotoxicity, DNA Damage, Sodium Deoxycholate.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| KABUL VE ONAY..... | II |
| ETİK BEYAN..... | III |
| TEŞEKKÜR..... | IV |
| ÖZET..... | V |
| ABSTRACT..... | VI |
| İÇİNDEKİLER..... | VII |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | IX |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | X |
| TABLolar LİSTESİ..... | XII |
| 1.GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. Kanser | 3 |
| 2.2. Meme Kanseri | 3 |
| 2.3. Kemoterapi | 4 |
| 2.4. Apoptoz | 4 |
| 2.5. Sitotoksisite..... | 5 |
| 2.6. Hücre Göçü..... | 6 |
| 2.7. Paraoksonaz ve Arilesteraz..... | 6 |
| 2.8. Oksidatif Stres..... | 7 |
| 2.9. Sodyum Deoksikolat..... | 7 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 9 |
| 3.1. Hücre Kültür..... | 9 |
| 3.2. MTT Hücre Proliferasyon Kiti ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi..... | 9 |
| 3.3. IC ₅₀ Değeri..... | 10 |
| 3.4. Apoptotik Etki ve DNA Hasarın Tespit Edilmesi..... | 10 |
| 3.5. Western Blot Yöntemi..... | 11 |
| 3.5.1. Hücre lizatlarının hazırlanması..... | 11 |
| 3.5.2. Protein miktar tayini (Bradford analizi)..... | 11 |
| 3.5.3. Jelin hazırlanması..... | 12 |
| 3.5.4. Protein lizatlarının hazırlanması..... | 12 |

| | |
|---|----|
| 3.5.5. Örneklerin jele yüklenmesi ve jelde yürütülmesi..... | 13 |
| 3.5.6. Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi..... | 13 |
| 3.5.7. PVDF membranın işaretlenmesi..... | 14 |
| 3.5.8. PVDF membranın görüntülenmesi..... | 14 |
| 3.6. TOS Düzeyi Ölçümü..... | 14 |
| 3.7. TAS Düzeyi Ölçümü..... | 15 |
| 3.8. Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü..... | 15 |
| 3.9. Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Ölçümü..... | 15 |
| 3.10. Arilesteraz Aktivitesi Ölçümü..... | 16 |
| 3.11. Hücre Göçü Testi (Scratch Analizi) | 16 |
| 3.12. İstatistiksel Analizi..... | 17 |
| 4. BULGULAR..... | 18 |
| 4.1. MTT Hücre Proliferasyon Kiti ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi | 18 |
| 4.2. IC ₅₀ Değeri..... | 22 |
| 4.3. Apoptotik Etki ve DNA Hasarın Tespit Edilmesi..... | 23 |
| 4.4. Western Blot Yöntemi..... | 24 |
| 4.4.1. p53..... | 24 |
| 4.4.2. Prokaspaz 3 | 25 |
| 4.4.3. XIAP1 | 26 |
| 4.4.4. Bcl2, Bax..... | 27 |
| 4.4.5. Beta aktin..... | 28 |
| 4.5. Oksidatif Stres Bulguları..... | 29 |
| 4.6. Arilesteraz ve Paraoksonaz Bulguları..... | 31 |
| 4.7. Hücre Göçü Bulguları..... | 33 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 36 |
| KAYNAKLAR..... | 41 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 45 |
| EKLER..... | 46 |
| EK1. Etik Beyan Raporu..... | 46 |
| EK2. Tez Orjinallik Raporu..... | 47 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-----------------------------------|--|
| ABTS | : 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit |
| APS | : Amonyum Persülfat |
| CO₂ | : Karbondioksit |
| Dk | : Dakika |
| DMSO | : Dimetil Sülfoksit |
| DNA | : Deoksiribonükleik Asit |
| EDTA | : Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| FBS | : Fetal Sığır Serum |
| H₂O₂ | : Hidrojen Peroksit |
| IC₅₀ | : Maksimum İnhibitör Konsantrasyonun Yarıısı |
| mg | : Miligram |
| ml | : Millitre |
| Na-Deo | : Sodyum deoksikolat |
| µl | : Mikrolitre |
| µM | : Mikromolar |
| OSİ | : Oksidatif Stres İndeksi |
| PAGE | : Poliakrilamid Jel Elektroforezi |
| PBS | : Fosfat Buffer Saline Solusyonu |
| PON | : Paraoksonaz |
| PVDF | : Poliviniliden Diflorid |
| Rpm | : Dakikadaki Dönüş Sayısı |
| SDS | : Sodyum Dodesil Sülfat |
| TAS | : Total Antioksidan Seviyesi |
| TOS | : Total Oksidatif Stresi |
| TBE | : Tris Borat EDTA |
| TEMED | : N,N,N,N-tetrametiletildiamin |
| °C | : Santigrat Derece (Celcius) |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Programlı hücre ölümünün farklı formları | 5 |
| Şekil 2. Sodyum Deoksikolat moleküler yapısı | 8 |
| Şekil 3. MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi | 19 |
| Şekil 4. CRL- 4010 hücrelerinde 24 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi..... | 19 |
| Şekil 5. MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi | 20 |
| Şekil 6. CRL- 4010 hücrelerinde 48 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi | 20 |
| Şekil 7. MCF-7 hücrelerinde 72 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi | 21 |
| Şekil 8. CRL- 4010 hücrelerinde 72 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi..... | 21 |
| Şekil 9. Sodyum deoksikolat ile muamele edilen MCF-7 ve CRL-4010 hücre hatlarının zamana bağlı IC ₅₀ grafiği..... | 22 |
| Şekil 10. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerindeki DNA hasarı | 22 |
| Şekil 11. MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerin Western Blot sonucu | 24 |
| Şekil 12. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinin p53 Ekspresyon Düzeyi | 25 |
| Şekil 13. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinin Prokaspaz 3 Ekspresyon Düzeyi | 26 |
| Şekil 14. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinin XIAP1 Ekspresyon Düzeyi | 27 |
| Şekil 15. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinin Bcl2 Ekspresyon Düzeyi | 28 |
| Şekil 16. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinin Bax Ekspresyon Düzeyi..... | 28 |

| | |
|--|----|
| Şekil 17. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinde TAS değerlerinin grafiği..... | 29 |
| Şekil 18. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinde TOS değerlerinin grafiği..... | 30 |
| Şekil 19. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinde OSİ değerlerinin grafiği..... | 30 |
| Şekil 20. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinde Arilesteraz aktivitesinin grafiği..... | 31 |
| Şekil 21. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinde Paraoksonaz aktivitesinin grafiği..... | 32 |
| Şekil 22. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş CRL- 4010 hücrelerinde hücre göçü grafiği..... | 33 |
| Şekil 23. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinde hücre göçü grafiği..... | 34 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 1. Western Blot jel hazırlama protokolü..... | 12 |
| Tablo 2. Sodyum Deoksikolat ile muamele edilen MCF-7 ve CRL-4010 hücre hatlarının zamana bağlı IC ₅₀ değerlerinin tablosu..... | 22 |
| Tablo 3. Hücre göçü testinde 0, 24 ve 48 saatlerde CRL-4010 hücrelerin elde edilen görüntüler..... | 33 |
| Tablo 4. Hücre göçü testinde 0, 24 ve 48 saatlerde MCF-7 hücrelerin elde edilen görüntüler..... | 34 |



1.GİRİŞ

Modern hayatta ölümün önde gelen nedenlerinden biri olarak kabul edilen kanser, kardiyovasküler hastalıklar (kalp hastalıkları) sonrasında dünya çapında ölümlere neden olan ikinci önde gelen hastalık olarak kabul edilmektedir. Kötü huylu bir tümör ya da malign neoplazm olarak bilinen kanser, vücudun diğer bölümlerine yayılabilir potansiyeline sahip anormal hücre büyümesini kapsayan bir hastalıktır (Abeloff ve ark., 2008). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 2012 yılında yaklaşık 14 milyon yeni vaka ve 8.2 milyon ölüm olduğunu bildirilmiştir. Dünyadaki kanser vakalarının çoğu gelişmekte olan ülkelerde görülmekte olup yaklaşık %63'lük bir ölüm oranı olduğu belirtilmiştir. Dünya genelinde en sık rastlanan kanserler akciğer (1.61 milyon, toplamın % 12.7'si), meme (1.38 milyon, % 10.9) ve kolorektal kanserlerdir (1.23 milyon, % 9.7) (Ferlay ve ark., 2010). Meme kanseri meme hücrelerinde başlayan malign bir tümör olup bu habis tümörün çevre dokulara veya vücudun uzak bölgelerine yayılan (metastaz) kanser hücrelerinin bir grubudur. Meme kanseri vakalarının neredeyse tamamına yakını kadınlarda görülmektedir, ancak erkeklerde de nadirde olsa görülebilmektedir (Abeloff ve ark., 2008).

Meme kanseri olguların yaklaşık % 5-10'u bir kişinin ebeveynlerinden kalıtımla aldığı BRCA1 ve BRCA2 gibi genlerine bağlıdır. Meme kanseri en sık süt kanallarının astar hücrelerinde ve lobüllerde gelişir. Bu lobüllerde gelişen kanser lobüler karsinom olarak bilinir öte yandan süt kanallarından gelişen kanserler duktal karsinom olarak bilinmektedir (Brinton ve ark., 2008). Birkaç çeşit meme kanseri türü oldukça nadir görülebilir. Bazı durumlarda tek bir meme tümörü bir kombinasyon tipi olabilir veya invaziv ve in situ kanserin bir karışımı olabilir (Girish ve ark., 2014). Buna ek olarak, meme kanserinin 18'den fazla alt türleri bulunmaktadır. Bazı kanserlerde olduğu gibi duktal karsinomada in situ olarak bilinen kanser pre-invaziv lezyonlardan gelişir (Li ve ark., 2000). Meme karsinomalarına ait mevcut bilginin önemli bir kısmı *in vivo* ve meme kanserlerinden türetilmiş hücre hatlarında yapılan *in vitro* çalışmalara dayanmaktadır. Tanımlanan ilk meme kanseri hücre hattı BT-20 hücreleridir (Lacroix ve Leclercq, 2004).

Antikanser ya da antineoplastik ilaçlar maligniteler veya kanserli hücre büyümelerini engellenme tedavisinde kullanılmaktadır. İlaç tedavisi tek başına kullanıldığı gibi cerrahi veya radyasyon terapisi gibi diğer tedaviler ile kombinasyon halinde de olabilir. Kanser tedavisinde bir organın doğasına bağlı olarak ilaçların çeşitli sınıfları kullanılabilir. Örneğin, meme kanseri östrojen tarafından yaygın olarak uyarıldığı için cinsiyet hormonlarını inaktif eden ilaçlar ile tedavi edilebilir. Sodyum deoksikolat bakteriyel reaksiyonlarla kolat prekürsörü kullanılarak oluşturulan bir safra asittir. Genellikle glisin veya taurin ile birleştirilir. Deoksikolik asit deterjan olarak hareket ederek emilir yağın çözündürülmesini sağlar. Böylece bağırsaklardan absorpsiyon için koleretik ve deterjan olarak kullanılır (Streuli ve ark., 1992).

Çalışmamızda Sodyum deoksikolatın meme kanseri hücre hattında apoptozu uyarması nedeniyle tümör hücrelerine karşı kullanmak için daha ileri çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Hücre içi veya hücre dışı uyarılar sonucu oluşan apoptoz yolu inflamatuvar, yanıt yokluğu ile nekrotik hücre ölümünden ayrılır. DNA fragmentasyonu hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu ile karakterize olan (Albert ve ark., 2008) bu uyarı ile tümör hücre sayısının azalması sonucunu vermektedir.

Meme kanser hücre hattında uyguladığımız Sodyum deoksikolatın DNA hasarı ve apoptozu indükleyen bir potansiyel etkisinin tespit edilmesinden dolayı bu tez çalışmamız meme kanserini önlemede hücre sinyal yolağındaki diğer mekanizmaların araştırılmasının gerekliliğini ortaya koyan bir ön araştırma niteliğine sahiptir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser vücudun bir bölümünde kontrolsüz bir anormal hücre bölünmesinin neden olduğu bir hastalık tanımlanabilir. Bu proliferasyon esnasında kanser hücresinin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinde farklılıklar ortaya çıkar. Hücre bazı anormal işlevler göstermeye başlayabilir. Anormal biçimde bölünen hücreler, ortaya çıktıkları dokulara ve organlara yayılır ve bazen vücudun uzak dokularına gider ve daha sonra organların işlevlerine müdahale eder. Kanser oluşum süreci, hücre döngüsünün bozulması ile kanserin hastalık tablosu olarak görülmesi arasındaki süre olarak kabul edilirse, bu periyot kanser türlerine göre değişir. Kaynaklandığı doku ve organlara göre adlandırılan kanser hastalığının tam mekanizması bilinmemektedir. Her ne kadar kanserin genel belirti ve semptomları çok spesifik olmasa da bu özellikler kanserin tipine ve derecesine bağlıdır (Kutluk ve Kars, 2001). Her iki cinsiyette en sık görülen kanser türleri ise akciğer, meme ve kolorektal kanserlerdir (Ferlay ve ark., 2010).

2.2. Meme Kanseri

Dünyada kadınlar arasındaki en yaygın kanser meme kanseridir. Coğrafi bölgelere göre çeşitli kanser risklerinde çarpıcı farklılıklar bulunmaktadır. Uluslararası varyasyonların çoğu, yaşam tarzı ya da çevre ile ilgili bilinen ya da şüpheli risk faktörlerine maruz kalmaktan kaynaklandığı bilinmektedir (Parkin ve ark., 2002). Meme kanserinde yaş en önemli primer risk faktörüdür ve meme kanseri oluşumunda genetik ve çevresel etkenlerin rol oynadığı ön görülmektedir.

Erken menarş ve geç menopoza giren kadınların meme kanseri riski yüksektir. Kadınlarda uzun süreli hormon replasman tedavisi alma, daha kısa laktasyon süresi, beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler, daha az fiziksel aktivite, obezite, batı tipi yaşam biçimi, herediter sendromlar ve günlük yaşantıdaki stres düzeyi meme kanserinin insidans hızını arttıran faktörlerden sayılabilir (Aydoğan ve ark., 2010; McPherson ve ark., 2000).

2.3. Kemoterapi

Kemoterapi, meme kanseri tedavisinde en yaygın ve etkili yöntemdir. Ancak, kemoterapi sırasında, hastalar tedaviye cevap vermezler veya tedaviden sonra kanserin tekrarı yaygın bir durumdur. Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için sıklıkla birden fazla antikanser ilacı kullanılır. Bununla birlikte, sonradan kazanılan veya hastada tedavi öncesi var olan ilaç direnci, kanser kemoterapisindeki başarıyı büyük ölçüde önler (Krishan ve ark., 1997; Ueda ve ark., 1987). Meme kanseri semptomsuz olarak metastaz yapabildiğinden, hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde yeni alternatif ilaçların geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır.

2.4. Apoptoz

Hücre ölümü morfolojik görünümüne göre; apoptotik, nekrotik, otofajik veya mitoz ile ilişkili olabilir (Kroemer ve ark., 2009). Apoptozis, hücrenin kendisini yok etmek için bir dizi metabolik ve fizyolojik süreci aktive ettiği bir olaydır. Apoptozis, inaktif olarak sentezlenen ve daha sonra spesifik proteolitik kesime uğrayarak aktif hale geçen sistein kaspazlar ailesinin aracılık ettiği belirli bir morfolojik ve biyokimyasal değişiktir. Hücrede apoptozun başlamasına neden olan ya fizyolojik ya da patolojik olan iki ana faktör bulunmaktadır. Bu işlem, sonunda hücre ölümüne yol açan bir dizi biyokimyasal ve morfolojik olaya yol açar. Bu olaylar arasında kromatin yoğunlaşması, kromozomal DNA fragmantasyonu, nükleer fragmantasyon, hücre büzülmesi ve kabarcıklaşma şeklinde sıralanabilir (Goldsby ve ark., 2002). Apoptozun ana karakteri, hücre zarı bütünlüğünün kaybına bağlı olarak sitoplazmik içeriğin hücre içi matrikse karışması ve nekrozda görülebilen bir bağışıklık tepkisine neden olmasından kaynaklanan enflamatuvar reaksiyonun olmamasıdır (Alberts ve ark., 2008).

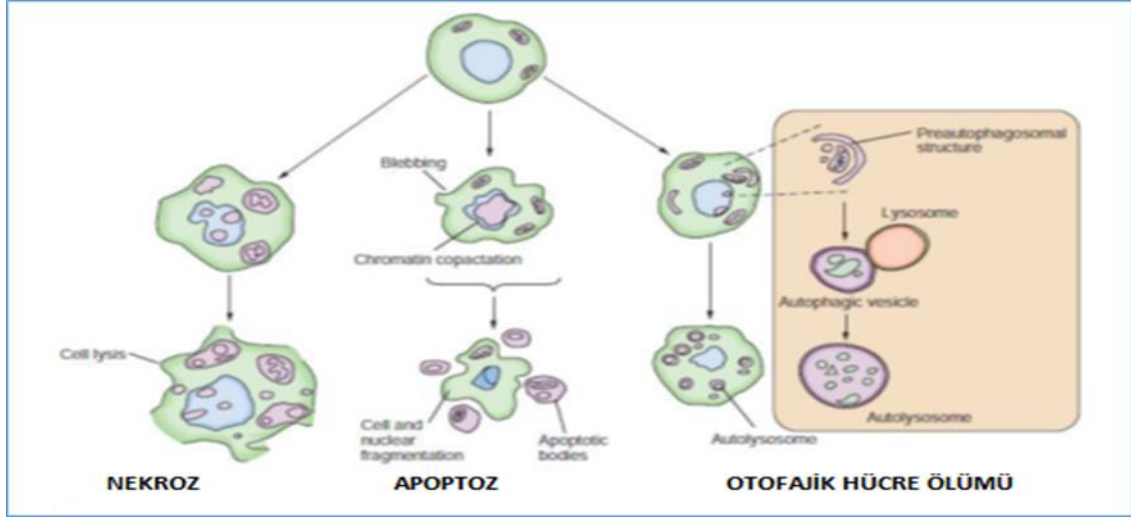
Genel olarak apoptoz, kalsiyum, seramid, p53, kaspazlar, sitokrom-c, proapoptotik Bax, antiapoptotik Bcl-2 gibi proteinler ve mitokondri tarafından düzenlenir. Apoptotik süreçte sitoplazmik zarı yer alan birkaç iyonik kanal sitozole kalsiyum girişine katılabilir. Hücre içine giren Ca^{2+} iyonları, endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz gibi enzimlerin aktivasyonunda, gen düzenlemesinde ve hücre içi protein iskeletinin biçimlendirilmesinde etkindir (Coşkun ve Özgür, 2011).

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemlerinden Biyokimyasal yöntemler;

1. Agaroz Jel Elektroforezi

- DNA fragmentasyonu

2. Western Blotting



Şekil 1. Programlı hücre ölümünün farklı formları.

2.5. Sitotoksisite

Sitotoksisite, in vitro çalışmalarda biyolojik değerlendirme için en önemli göstergelerden biridir. Sitotoksisite ve hücre canlılığı analizleri, çeşitli hücre fonksiyonlarına dayanır. Kültür hücreleri ile yapılan in vitro sitotoksisite analizleri kimyasalların sitotoksisite testleri ve ilaç taraması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu analizler ayrıca onkolojik araştırmalarda, ilaç gelişimi sırasında hem bileşik toksisitesini hem de tümör hücresi büyümesi inhibisyonunu değerlendirmek için yapılmaktadır. Çünkü bunlar hızlı, ucuzdur ve hayvanların kullanılmasını gerektirmez. Ayrıca, çok sayıda örneği test etmek için kullanışlıdır. Sitotoksisite deneyleri, hücre zarı geçirgenliği, enzim aktivitesi, hücre uyumu, ATP üretimi, koenzim üretimi ve nükleotit alım aktivitesi gibi çeşitli hücre fonksiyonlarına dayanmaktadır (Ishiyama ve ark., 1996). Sitotoksisite testi için çeşitli tetrazolyum bileşikleri kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan bileşikler şunlardır: MTT, MTS, XTT ve WST-1. Bu bileşikler iki temel kategoriye ayrılır: 1) pozitif olarak yüklenen ve canlı ökaryotik hücrelere kolayca nüfuz

eden MTT ve 2) negatif olarak yüklenen ve kolayca hücrelere nüfuz etmeyen MTS, XTT ve WST-1 gibi olanlar (Aslantürk, 2017).

2.6. Hücre Göçü

Hücre göçü çeşitli doku onarımı ve yenilenmesi gibi işlemlerin yanı sıra kanser gibi patolojik süreçlerde ve fizyolojik faktörlerle ilişkilidir. Anormal hücre göçü, yaraların iyileşmemesinin yanı sıra tümör hücrelerinin metastaz yapma kabiliyetlerine de etkiler. Bu nedenle, hücre göçte yer alan mekanizmalar, terapötik müdahale için çekici hedeflerdir (Gough ve ark., 2011). Hücre göçü, koordinasyon gerektiren karmaşık bir süreçtir ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, matris tadilatı, hücre-hücre yapışmasının modülasyonu ve kemoatraktanların indüksiyonu gibi süreçleri içeren sayısız hücre olayını barındırır. Boyden tekniği ve fagokinetik tahlil bir hücre göçünün *in vitro* olarak test edilme çalışmalarında uzun zamandır kullanılmaktadır. Birçok hücre göçü çalışmasında genellikle konfluent tek tabakalı hücrelerin mekanik yaralanmalara verdiği tepkiye dayanır. Denuded alanın kapanmasını gözleyebilmek ve ölçülebilmek için bir zaman dilimi boyunca mikroskop veya bilgisayar kullanarak ölçümler yapılır. Elde edilen sonuçları değerlendirilmesi görüntüleme sistemi ile bilgisayarda analiz programları kullanılarak yapılır (Yue ve ark., 2010).

2.7. Paraoksonaz ve Arilesteraz

Paraoksonaz, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile ilişkili olan Ca^{+2} ye bağımlı bir glikoproteindir. Paraoksonaz izoformları böbrek, karaciğer, ince bağırsak ve ayrıca serum gibi birçok hayvan dokusunda yaygın olarak bulunur. Serum paraoksonaz, organofosfor bileşiklerinin ve kanserojen lipidde çözünebilen radikallerin lipid peroksidasyonundan uzaklaştırılmasına katkıda bulunabilmesine rağmen, fizyolojik rolü hala tam olarak bilinmemektedir (Çayır ve ark., 2010). Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde, substrat olarak paraokson gibi organofosfatların enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün spektrofotometrik ölçümü esas alınmaktadır. Arilesteraz ölçümünde ise substrat olarak paraokson yerine fenil asetat kullanılmakta ve oluşan fenol ölçülmektedir (Gülcü ve Gürsu, 2003). Paraoksonaz ve arilesteraz aynı gen tarafından kodlanan ve aktif merkezleri benzer olan esteraz grubundaki enzimlerdir. Paraoksonazın

polimorfik değişim gösterdiği bilinmesine karşın arilesteraz enzimi genetik polimorfik bir değişim göstermemektedir. Bir olgu kontrol çalışmasında, paraoksonaz (PON1) L55M polimorfizmi ile meme kanseri arasında anlamlı bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Antognelli ve ark., 2009).

Yine iki enzimin doğal substratları farklı olmasına karşın paraoksonaz enzimi arilesterazın doğal substratı olan fenil asetatı hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca paraoksonaz ve arilesterazın iyi bilinen ortak özellikleri organofosfatları, aril ve alkil halojenürleri hidroliz etme yeteneğidir. Paraoksonaz enzimi LDL'yi oksidasyondan koruyucu özelliği ve hidrojen peroksit dahil olmak üzere diğer radikalleri nötralize etme kapasitesi nedeniyle antioksidan işlevde bulunmaktadır. Arilesteraz ise, Paraoksonazdaki değişimlerden etkilenmeyen asıl proteinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Gürsu ve Özdin, 2002).

2.8. Oksidatif Stres

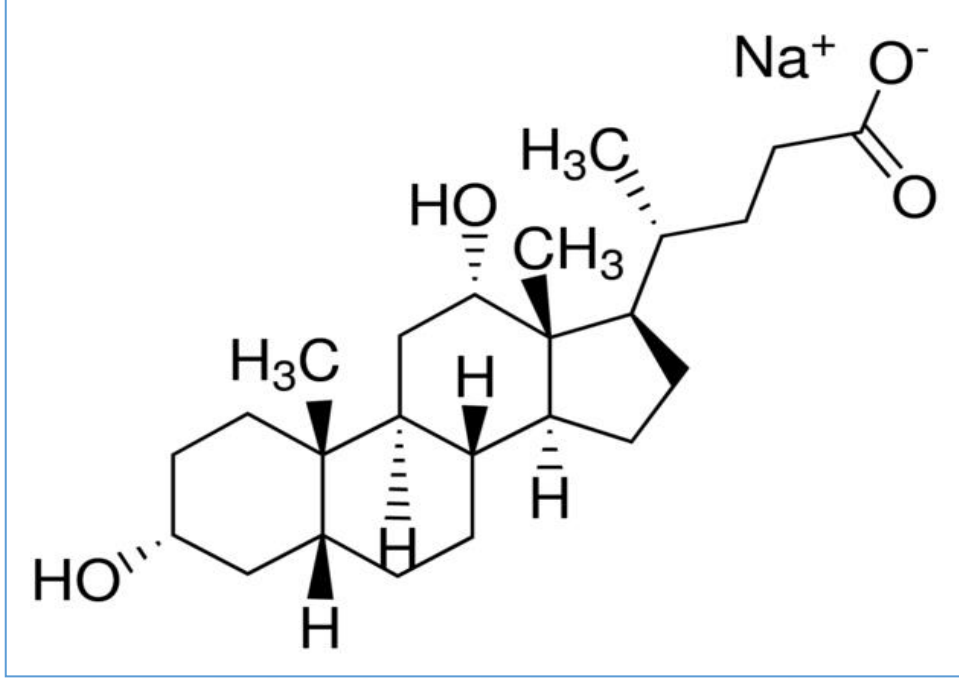
Total oksidan seviyelerinin, total antioksidan seviyelerine bölünmesiyle oksidatif stres indeksi elde edilir. Deęerin yüksek olması oksidatif stresin arttığını gösterir (Erel, 2004; Ghiselli ve ark., 2000). Oksidanlar normal bir aerobik metabolizma ürünü olarak oluşur, ancak patofizyolojik koşullar altında yüksek oranlarda üretilebilir. Antioksidan savunma hem enzimatik hem de enzimatik olmayan çeşitli stratejiler içerir. Potansiyel olarak zarar verebilecek oksidanlar ve oksidanlar lehine antioksidanlar arasındaki bir dengesizliğe 'oksidatif stres' denir (Sies ve ark., 1997).

Oksidatif stres insanlarda çeşitli hastalıkların gelişiminden ve yaşlanmadan sorumlu tutulmaktadır. Bu hastalıklar arasında çeşitli kanserler, kalp ve damar hastalıkları, Parkinson ve Alzheimer sayılabilir. Ancak reaktif oksijen bileşikleri immün sistemde patojenlere karşı savunma yolağında yararlıdır (Kim ve ark., 2002).

2.9. Sodyum Deoksikolat (C₂₄H₃₉NaO₄)

Sodyum deoksikolat bakteriyel reaksiyonlarla kolat prekürsörü kullanılarak oluşturulan bir safra asittir. Safra asitleri iki amaca hizmet eder. Bu amaçlardan ilki istenmeyen kolesterolü vücuttan çıkarmak ikincisi ise bağırsakta lipit sindirimine

yardımcı olmaktır. Genellikle glisin veya taurin ile birleştirilir. Deoksikolik asit deterjan olarak hareket ederek emilir yağ çözüldürülmesini sağlar. Böylece bağırsaklardan absorpsiyon için koleretik ve deterjan olarak kullanılır (Streuli ve ark., 1992). Ampirik Formül $C_{24}H_{39}NaO_4$, Moleküler ağırlık 414.55.



Şekil 2. Sodyum deoksikolatın moleküler yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullanılmış olan stok hücre hatları daha önce Anabilim dalımızda mevcut olup ATCC (American Type Culture Collection)'den önceki yıllarda ticari olarak temin edilmiştir. Mevcut olan meme kanser hücreleri MCF-7 ile sağlıklı normal meme hücreleri (CRL-4010) kullanıldı. Hücre hatları %10 FBS ve %1 glutamin ile desteklenmiş DMEM: F12, RPMI-1640, DMEM besi yerinde çoğaltıldı. Bütün hücreler %5 CO₂'li atmosferde 37 °C'de inkübe edildi. ATCC'nin tavsiye ettiği şekilde hücreler %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp 1:3 oranında olacak şekilde pasajlanarak, kullanılmayan hücreler %95 besiyeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan hücre dondurma solüsyonu içerisinde önce -80 °C'lik derin dondurucuda kısa süreli veya uzun süreli olarak sıvı azota alınarak saklanır.

Hücre sayımı için hematositometre metodu kullanıldı. Bunun için; besiyeri uzaklaştırılan hücreler 1XPBS ile yıkandı. Üzerine tripsin ilave edilerek hücrelerin petri tabanından ayrılması sağlandı. Petri tabanından ayrılan bu hücreler içerisinde 5 ml besiyeri bulunan 15 ml'lik bir falkon tüpe aktarılıp karıştırıldı. Stoktan alınan hücreler 1/10 oranında besiyeriyle dilüe edildi. Buradan 100 µl alınarak thoma lamı üzerine bırakıldı. İverted mikroskopta incelenen ve merkez alana düşen hücreler sayılarak toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle belirlendi.

Hücreler / ml = her kare X ortalama seyreltme faktörü X 10

Eşit hacimlerde hücre süspansiyonu uygun yoğunluklarda yeni platelere aktarıldı.

3.2. MTT Hücre Proliferasyon Kiti ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

MTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak Sodyum deoksikolat maddesinin sitotoksik etkileri incelendi. MTT testi canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığı ile MTT parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturması prensibine dayanarak yapılmaktadır. Hücreler stoktan açılarak 25 cm³ flasklara ekilip, %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara eklendi. 24 saatlik süre

ardından besi yerleri uzaklaştırılarak ve sodyum deoksikolat maddesi için (0,1-9 μ M) farklı konsantrasyonları uygulandı ve sitotoksik doz bulunmaya çalışıldı. Sodyum deoksikolat maddesi her bir kuyucuğa 200 μ l olacak şekilde eklendi ve ardından 24, 48, 72 saatlik inkübasyon süresince %5 CO₂'li atmosferde 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırılarak 20 μ l serumsuz besiyeri üzerine 90 μ l MTT solüsyonu eklendi ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklardaki besiyeri uzaklaştırıldı, formazon kristalleri 100 μ l DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 540-690 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi (Mosmann, 1983; Urgan, 2010).

3.3. IC₅₀ Değeri

Sodyum deoksikolatın doza bağımlı cevap eğrisi, GraphPad Prism yazılımı (GraphPad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) kullanılarak konsantrasyonlara karşı inhibisyon yüzdesi çizilerek elde edildi. Doğrusal olmayan regresyon analizi yapıldı ve bu çalışmada kullanılan MCF-7 ve CRL-4010 hücre tiplerinde sodyum deoksikolatın IC₅₀ değerleri benzer işlemler yapılarak hesaplandı (Tülüce ve ark., 2019).

3.4. Apoptotik Etki ve DNA Hasarının Tespit Edilmesi

Apoptotik DNA ladder (DNA Fragmentasyonu) yöntemi ile apoptozun ve DNA hasarının tespiti için, apoptotik DNA ladder kit prosedürüne uygun olarak hücre sayısı 2x10⁶ olacak şekilde, sitotoksik testi ile belirlenen 5 μ M'lık etkin doz kullanılarak kültür kaplarına ekim yapıldı. Sodyum deoksikolat maddesi uygulama sürelerinin bitiminde farklı doz Sodyum deoksikolat maddesi uygulanmış olan hücreler, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 2.500 μ l Tissue Lysis Buffer eklendi ve vorteks yardımı ile homojen olana kadar karıştırıldı. 3.20 μ l proteinaz k ve 200 μ l solüsyon DS eklendi. Vorteks yardımı ile karıştırıldı. 65 °C'de 45 dk inkübe edilerek homojen bir solüsyon elde edildi. Örnek üzerine 220 μ l Binding Buffer ve 400 μ l etanol (96-100%) eklenerek

vorteks ile karıştırıldı. Örnek ve etanolün iyice karışması önemlidir. Karışımın tamamı pipet yardımı ile 2 ml toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan spin kolona aktarıldı.

Süspansiyon kolona konup 12000 rpm de 1 dk santrifüj edildi. Alttağı sıvı döküldükten sonra 500 µl yıkama tamponu eklenip tekrar 12000 rpm de 1 dk santrifüj edildi. İkinci defa alttağı sıvı döküldükten sonra 500 µl yıkama tamponu eklenip tekrar 12000 rpm de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü süzülen sıvı ile birlikte atıldı. Bundan sonra elüsyon adımına geçildi. Santrifüjden sonra kolon toplama tüplerinden çıkarılırken dikkat edilmesi gerekir. Toplama tüpüne süzülen etanol bulunduran sıvı kolon ile temas ederse 12000 rpm de 1 dk santrifüj edilmelidir. Spin kolon temiz 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı ve direk membran üzerine 50 µl Elution Buffer TE (60 °C'ye ısıtılmış) eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi ve 12000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Pürifiye edilmiş DNA tüplerdedir.

Apoptotik DNA ladder kiti ile izole edilen DNA örneklerinden 5 er µl alınıp, üzerine 1 µl 6X boyama tamponundan eklenerek pipetaj yapıp ve hazırlanan jel kuyucuklarına aktarıldı. DNA örneklerinin boyutlarının belirlenebilmesi amacıyla, ağırlıkları bilinen bir DNA markırı (100 bp- 3 kb) ile birlikte jele yüklenir. Elektrotlar güç kaynağına bağlanarak, 100 V'a ayarlanıp, yürümeye bırakıldı. Bu süre içinde, DNA içeriğinin agaroz jelde elektroforetik olarak ayrılmaları sağlanır. Bromfenol mavisi, jelin 2/3'lük bölümüne ulaştığında güç kaynağı kapatılarak, jel UV transillüminatörde incelendi.

3.5. Western Blot Yöntemi

3.5.1. Hücre lizatlarının hazırlanması

Lizis tamponu -20 °C'den çıkarılarak buz üzerinde erimeye bırakıldı. Steril ependorf tüplere hücrelerin isimleri yazıldı. Sodyum deoksikolatın 5 µM etkin dozu ile muamele edilen hücrelerin 6'lı plakası etüvden çıkarıldı ve içindeki besiyeri boşaltıldı. Her bir kuyucuğa 1'er ml 1X PBS eklenerek yıkandı. Daha sonra kuyucuklardan her birine 250 µl lizis tamponu eklendi. Kazıyıcı ile kazıma yapılarak tabana yapışmış olan hücreler kaldırıldı ve iyice pipetaj yapıldıktan sonra ependorf tüpe aktarıldı. Lizatların

bulunduğu ependorf tüpler parafilmlelenerek Bradford analizi yapılmak üzere -80 °C’de saklandı.

3.5.2. Protein miktar tayini (Bradford analizi)

Hücre lizatları -80°C’den çıkarılarak buzda erimeye bırakıldı. Eridikten sonra iyice vortekslenerek soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm’de 1 dk. boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonucunda proteinlerin bulunduğu üst sıvı başka bir ependorf tüpe aktarıldı. 10 mg/ml stok BSA solüsyonundan 1 mg/ml olacak şekilde solüsyon hazırlandı.

96 kuyucuklu kaplara 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 11 µl konsantrasyonlarında BSA üçer tekrarlı olacak şekilde eklendi. Aynı şekilde protein lizatları da vortekslendikten sonra 1’er µl alınarak üçerli tekrar olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Bunun üzerine de Bradford ayırıcından çoklu pipetle 100’er µl alınarak eklendi. 96 kuyucuklu kap 5 dk kadar karıştırıldı. Ardından multiple reader cihazında 595 nm dalga boyunda okutulularak sonuçlar elde edildi. Alınan sonuçlar standart formül göre değerlendirilmek örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

Kullanılan solüsyonlar: Resolving (Ayrıştırma) Tamponu, Stacking (Yükleme) Tamponu, Running Buffer (10X), Running Buffer (1X), 10XPBS (pH 7.4), 1XPBST, SDS Yüklemeye Tamponu, %10 Amonyum persülfat (APS), Transfer Tamponu ve Akrilamid/Bisakrilamid (100 ml için 29/0.8).

3.5.3. Jelin hazırlanması

Aşağıdaki tabloda %10’luk jel hazırlama protokolü uygulandı.

Tablo 1. Western Blot jel hazırlama protokolü

| Resolving | %7 | %10 | %12 | %15 | Stacking | 5ml'lik | 10ml'lik |
|------------------|--------|---------|--------|--------|-----------------|---------|----------|
| Su | 15ml | 11.55ml | 10.5ml | 7.05ml | Su | 3ml | 6ml |
| Resolving Buffer | 7.5ml | 7.5ml | 7.5ml | 7.5ml | Stacking Buffer | 1.25ml | 2.5ml |
| Acr(29:08) | 7.05ml | 10.5ml | 12ml | 15ml | Acr(29:08) | 0.625ml | 1.25ml |
| %10SDS | 0.3ml | 0.3ml | 0.3ml | 0.3ml | %10SDS | 50µl | 100µl |
| %APS | 0.3ml | 0.3ml | 0.3ml | 0.3ml | %APS | 50µl | 100µl |
| Temed | 30µl | 30µl | 30µl | 30µl | Temed | 5µl | 10µl |
| Toplam | 30ml | 30ml | 30ml | 30ml | Toplam | 5ml | 10ml |

3.5.4. Protein lizatlarının hazırlanması

Stacking Jel donmaya bırakıldığı sırada protein lizatları hazırlanmaya başlandı. -20 °C'de muhafaza edilen ve daha önce miktar tayini yapılmış proteinler -20 °C'den çıkarıldıktan sonra buz üzerinde erimeye bırakıldı. Bu arada ısıtıcı 95 °C'ye ayarlandı. Buzda eriyen örnekler vorteksledi. İlgili tüplere daha önce Bradford analizi ile belirlenen miktarlarda örnek ve öncesinde bu miktarların yarısı kadar β-merkaptolanol içeren SDS yükleme tamponu konularak tekrar vorteksledi. Örneklerin bulunduğu tüpler daha önce 95 °C'ye ayarlanmış ısıtıcıya alındı ve burada 5 dk bekletildi. Isıtıcıda bulunan bu örnekler bu süre zarfında 1-2 kez vortekslenerek tekrar ısıtıcıya alındı. Süre sonunda ısıtıcıdan alınan örneklere mikrosantrifüj cihazında kısa süreli bir spin yapıldı ve ardından örnekler buz üzerine alındı.

3.5.5. Örneklerin jele yüklenmesi ve jelde yürütülmesi

Örneklerin poliakrilamid jele yüklenmesi için öncelikle jele yerleştirilmiş olan taraflar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Oluşan kuyucuklarda var olan kabarcıklar, bu kuyucuklara distile su eklenip hızlı bir şekilde silkelemek suretiyle uzaklaştırıldı. Jel, yürütme tankına alınarak üzerine yürütme solüsyonu eklendi. Yükleme pipet uçları aracılığıyla ilk kuyucuğa 6 µl marker, sonraki kuyucuklara ise Bradford Assay ile belirlenen miktarlarda örnek yüklendi. Jele yüklenen örnekler stacking jeli geçene kadar 60 voltta, resolving jelde ise 80 voltta yürütüldü (Biorad Power Supply). Yürütme işlemi sonrası proteinlerin PVDF membrana transfer aşamasına geçildi.

3.5.6. Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi

Örnekler yürütüldükten sonra transfer aşaması için transfer solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon içerisine transfer için kullanılacak olan sünger, whatman kâğıdı, PVDF membran konularak ıslatıldı. Yürütme işlemi sonucu örneklerin bulunduğu camlar yürütme tankından çıkarıldı. Bir miktar musluk suyuyla muamele edildi. Ardından cam, düz bir zemin üzerine alınarak bir ayırıcı yardımıyla kalın ve ince camlar birbirinden ayrıldı. Bu camlar arasında bulunan jelin stacking kısmı kesilerek atıldı. Transfer aparatının siyah kısmına sırasıyla transfer tamponunda ıslatılmış bir sünger, whatman kağıdı (Sigma Z691011), örneklerin yürütüldüğü jel, saf metanolde ıslatılmış PVDF membran (Millipore IPVH00010) yerleştirildi. Bunun üzerine tekrar bir whatman kağıdı ve bir sünger yerleştirildi. Bu işlemler esnasında her seferinde oluşan hava kabarcıkları silindir bir çubuk yardımı ile uzaklaştırıldı. Ardından bu kaset transfer cihazına yerleştirildi. Üzerine transfer solüsyonu eklendi. Transfer cihazı, içerisine buz eklenmiş bir kutuya konularak gece boyu 40 voltta transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.5.7. PVDF membranın işaretlenmesi

Gece boyu transferde bekletilen örneklerin bulunduğu kaset, sonraki gün transfer cihazından çıkarıldı. Blotlama işlemi için membran jelden ayrıldı. Metanol içerisine konuldu. Metanolden çıkarılan ve örneklerin bulunduğu membranın ön yüzü işaretlendi. Sonrasında PBST-BSA (1X PBS, %0.1 Tween-20, %1 BSA) solüsyonunda 1.5 saat bloklandı. Ardından bu solüsyon atıldı ve membran üzerindeki markır referans alınarak protein büyüklüğüne göre kesildi. Bunun ardından, PBST-BSA içinde hazırlanan primer antikorunun 1/1000 dilüsyonu ile gece boyu +4 °C'de karıştırıcıda karıştırıldı. Ertesi gün primer antikor uzaklaştırıldı ve blot, PBST (1X PBS, %0.1 Tween-20) ile 15'er dk aralıklarla 2 kez oda sıcaklığında yıkandı. Ardından, PBST-BSA içinde hazırlanmış uygun anti-mouse veya anti-rabbit sekonder antikorunun 1/2000 dilüsyonu ilave edildi ve işaretleme 1,5 saat oda sıcaklığında yapıldı. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasının ardından blot PBST ile 15'er dk aralıklarla iki kez yıkandı.

3.5.8. PVDF membranın görüntülenmesi

15 ml'lik bir falkon tüpe 3 ml distile su kondu. Bunun üzerine sırasıyla solüsyon 1'den (DAB Substrat) 3 damla, solüsyon 2'den (DAB Kromojen) 3 damla ve solüsyon 3'den (Hidrojen peroksit) 3 damla damlatılarak iyice vortekslendi. Membran düz bir zemin üzerine alındı. Bunun üzerine hazırlanan solüsyon pipet ile membranın her tarafını kaplayacak şekilde döküldü. Bantlar görünmediğinde ise membranın üzeri bir kartonla kapatılarak karanlık bir ortam oluşturuldu ve 5 dk bu şekilde bekletilerek bantlar gözlemlendi.

3.6. Total Oksidan Statüs (TOS) Düzeyi Ölçümü

Sodyum deoksikolatın 5 μM 'lık etkin dozunun kullanıldığı hücre hatlarında total oksidan statüs (TOS) düzeyi, Rel Assay marka ticari kiti kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm kitinin çalışma protokolünde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyona kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/ g olarak ifade edildi (Erel, 2005).

3.7. Total Antioksidan Statüs (TAS) Düzeyi Ölçümü

Sodyum deoksikolatın 5 μM 'lık etkin dozunun kullanıldığı hücre hatlarında total antioksidan statüs (TAS) düzeyi, Rel Assay marka ticari kiti kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin total konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/g olarak ifade edildi (Erel, 2004).

3.8. Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü

Oksidatif stresin bir göstergesi olarak gösterilen oksidatif stres indeksi (OSİ), total oksidan status düzeylerinin total antioksidan düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. Örneklerin OSİ hesaplanırken TAS düzeyleri 10 ile çarpılarak TOS düzeyleri ile birimler eşitlenir (Aycicek ve ark., 2011; Hussein, 2017; Tülüce ve ark., 2017).

Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi. OSİ değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{OSİ} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / g}}{\text{TAS, } \mu\text{mol trolox Equiv. / g}} \times 10$$

3.9. Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

HDL-Kolesterole bağlı lipofilik, hidrofobik yapılı antioksidan bir enzim olan paraoksonaz aktivitesi Sodyum deoksikolatın 5 μM 'lık etkin dozunun kullanıldığı hücre hatlarında ticari Rel Assay marka kit ile ölçüldü. Yöntemde paraoksonaz enzimi paraokson (dietyl (4-nitrofenil) fosfat) substratını hidroliz ederek renkli p- nitrofenol ürününün oluşmasına yol açar. Oluşan ürünün absorbansı 412 nm de kinetik okumalar izlenerek enzim aktivitesi U/L olarak ifade edilir (Eckerson ve Wyte, 1983).

3.10. Arilesteraz Aktivitesi Ölçümü

Antioksidan bir enzim olan PON1 enziminin arilesteraz aktivitesi de Sodyum deoksikolatın 5 μM 'lık etkin dozunun kullanıldığı hücre hatlarında ticari Rel Assay marka kit ile ölçüldü. Bu test, örneğin içerdiği enzim tarafından fenilasetat substratından enzimatik aktiviteyle açığa çıkarılan fenolün, kolorimetrik olarak absorbansının (548 nm / 700 nm) ölçülmesi esasına dayanır (Haagen ve Brock, 1992). Enzim aktivitesi U/L olarak ifade edilir.

3.11. Hücre Göçü Testi (Scratch Analizi)

Hücreler stoktan açılarak 25 cm^3 flasklara ekilip, %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekilerek hücrelerin tek tabaka halinde tüm petri yüzeyini kaplayıncaya kadar %5 CO_2 'li atmosferde 37 $^\circ\text{C}$ 'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücrelerin yüzeyini kapladığı plateler steril 200 μl 'lik pipet ucu ile bir çizgi şeklinde kazındı. Kalıntıları gidermek için ve çizik kenarını düzeltmek için hücreler bir kez 1 ml büyüme

ortamıyla yıkandı. Sonra bu yıkama için kullanılan besiyeri uzaklaştırılarak *in vitro* hücre göçü testi için spesifik olan 5 ml besiyeri ortam ile değiştirildi. Hücre göçlerinin görüntüsü alınırken aynı alanı elde etmek için referans noktaları olarak kullanılacak işaretler oluşturuldu. Bunun için tabağın dış tabanında bir ultra ince uç işaretçisi ile hafifçe aşındırma yapıldı. Referans noktaları yapıldıktan sonra, tabak inverted mikroskobunun altına yerleştirildi ve referans işaretleri kontrol edildi. Platelere 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresince %5 CO₂'li atmosferde 37 °C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Platelere periyodik olarak incelenmek üzere inkübatörden çıkarılarak kontrol edildi.

İnkübasyondan sonra, platelere inverted mikroskobunun altına yerleştirilerek, referans noktaları ile belirlenen alanda fotoğraflanarak görüntü elde edildi. Her örnek için elde edilen görüntüler, bilgisayar ortamında imaj değerlendirme yazılımı (Image Pro-Plus computer software) kullanılarak kantitatif olarak analiz edildi (Liang ve ark., 2007).

3.12. İstatistiksel Analiz

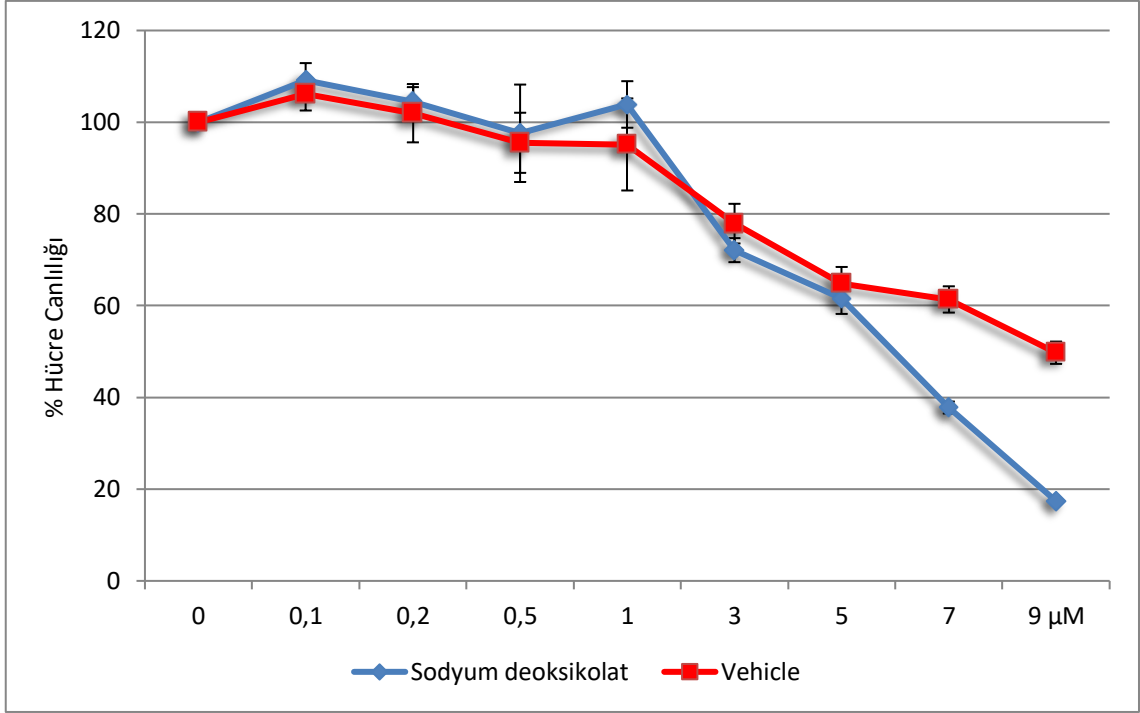
Ölçülen TAS, TOS, OSİ, PON1 ve arilesteraz bulguları dahil tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi ve bulgular ortalama \pm SD olarak ifade edildi. Sonuçlar üç tekrar halinde sunulmuştur. Deneylelerdeki veriler, varyans analizleri (tek yönlü ANOVA) kullanılarak analiz edildi. P <0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler, Windows için MINITAB 14® paket programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

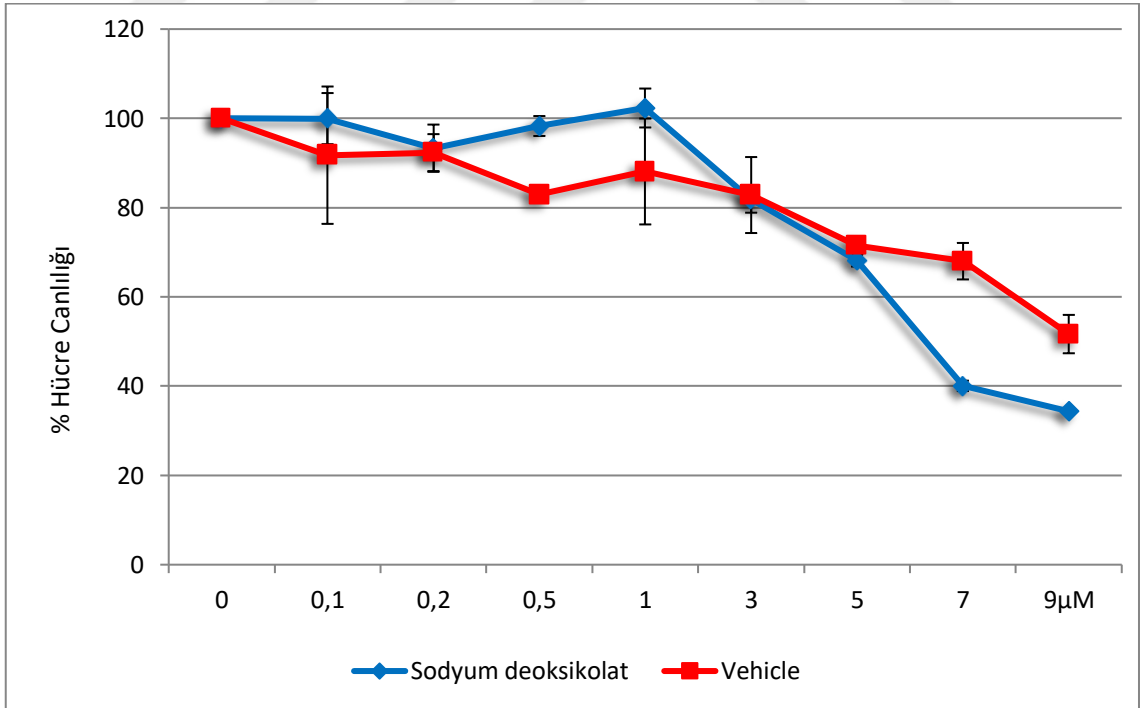
Çalışmamızda kullanılan hücre hatları daha önce Anabilim dalımızda mevcut olup ATCC (American Type Culture Collection)'den önceki yıllarda ticari olarak temin edilmiştir. MCF-7 meme kanser hücreleri ile sağlıklı normal meme hücreleri (CRL-4010) kullandık. Hücre hatları %10 FBS ve %1 glutamin ile desteklenmiş DMEM besi yerinde çoğaltıldı. Bütün hücreler %5 CO₂'li atmosferde 37 °C'de inkübe edildi. ATCC'nin tavsiye ettiği şekilde hücreler %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp 1:3 oranında olacak şekilde pasajlanarak, kullanılmayan hücreler %95 besi yeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan hücre dondurma solüsyonu içerisinde önce -80 °C'lik derin dondurucuda kısa süreli veya uzun süreli olarak sıvı azota alınarak saklandı.

4.1. MTT Hücre Proliferasyon Kiti ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

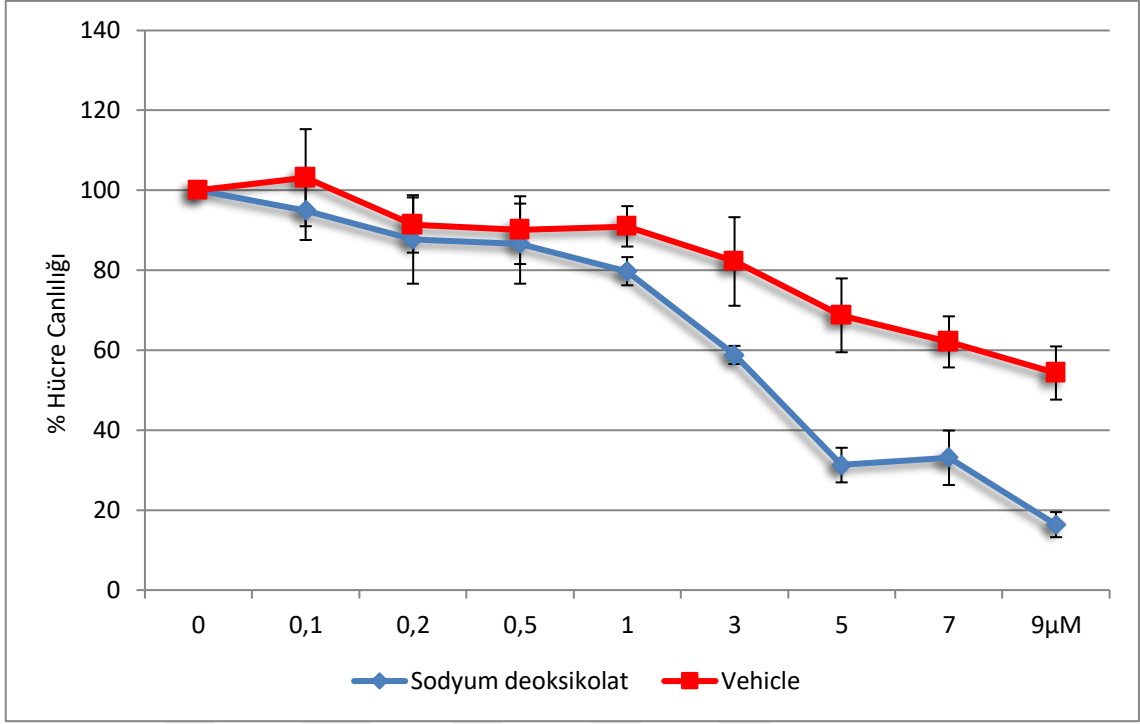
Sodyum deoksikolatın sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle belirlendi. Sodyum deoksikolat maddesi için (0,1-9 µM) farklı konsantrasyonları uygulandı ve ardından 24, 48, 72 saatlik inkübe edilerek sitotoksik doz bulunmaya çalışıldı. MTT analizine göre Sodyum deoksikolatın hem MCF-7 hem de CRL-4010 için sitotoksik olduğu görüldü. 24 saatlik inkübe edilen her iki hücre hattında 7 µM dozun sitotoksik etkiyi belirgin bir şekilde artırmaya başladığı tespit edildi (Şekil 3, Şekil 4). 48 saat inkübasyon sonrasında hem MCF-7 hem de CRL-4010 hücre hatlarında 3 µM konsantrasyondan itibaren hücre proliferasyon sayısı azalmaya başlamış (Şekil 5, Şekil 6). Ayrıca 72 saatlik inkübe edilen hücre hatlarında da 3 µM konsantrasyondan itibaren hücre proliferasyon sayısında anlamlı derecede azalmanın başladığı belirlenmiştir (Şekil 7, Şekil 8). Genel olarak, hücre canlılığı yüzdesi hem doz ve hem de inkübasyon süresine bağlı olarak azalmıştır.



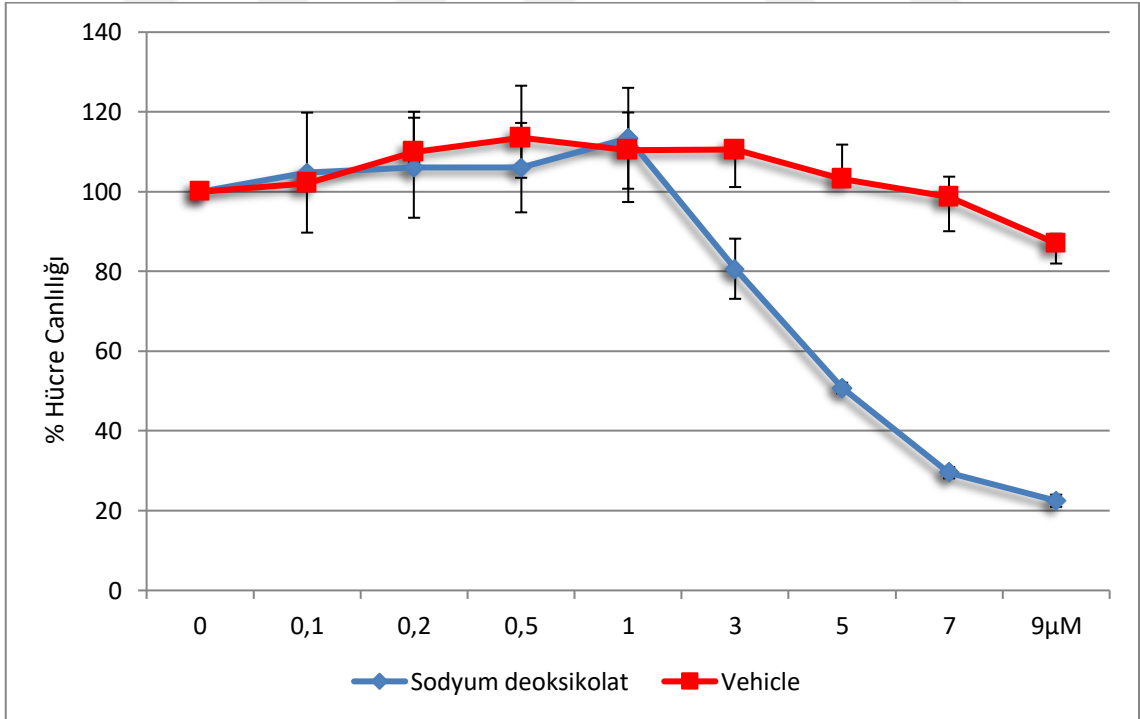
Şekil 3. MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



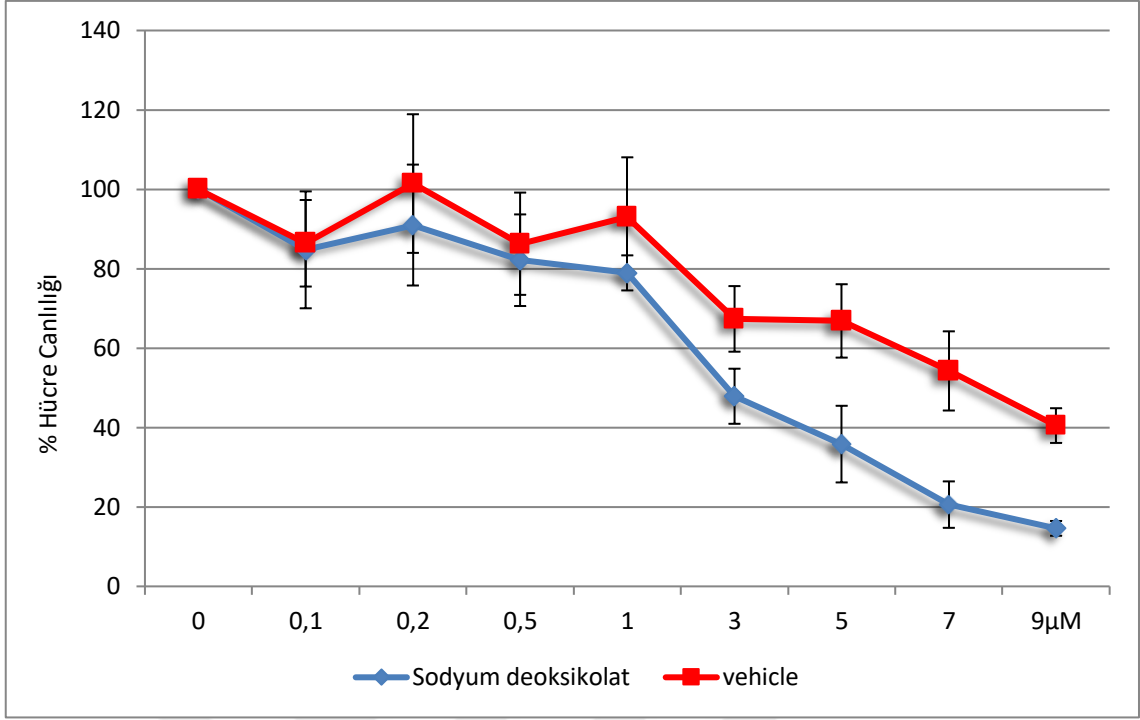
Şekil 4. CRL-4010 hücrelerinde 24 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



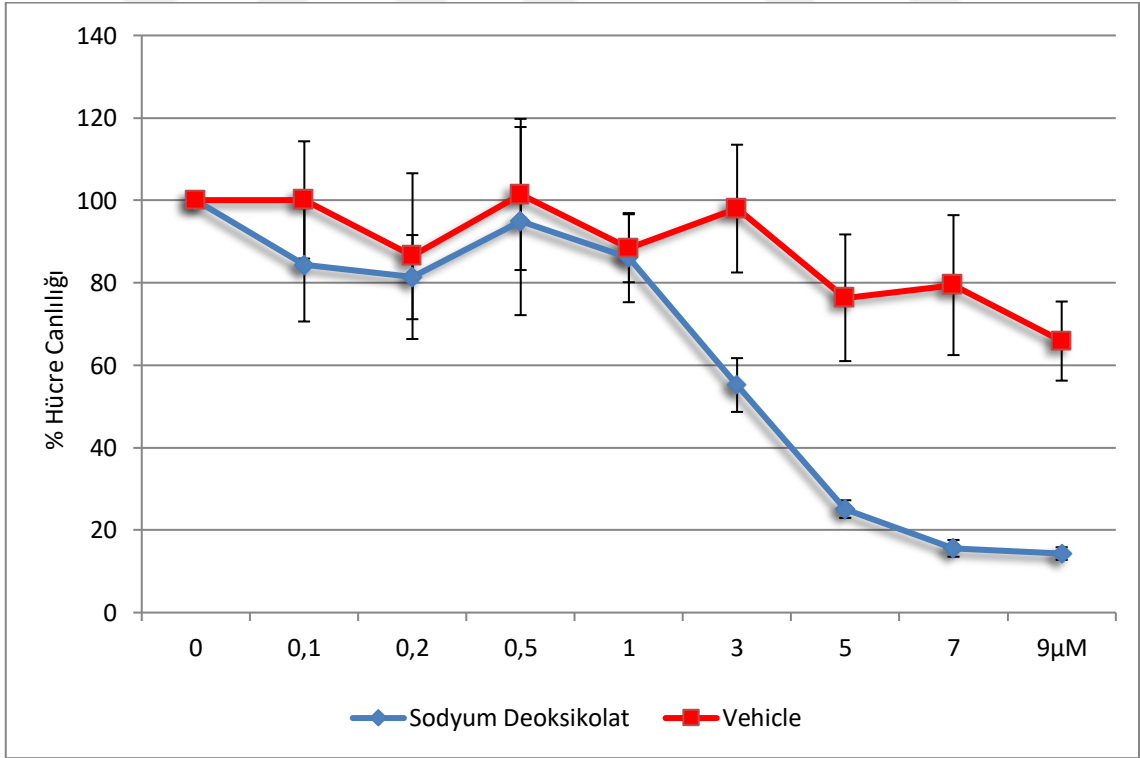
Şekil 5. MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



Şekil 6. CRL-4010 hücrelerinde 48 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.



Şekil 7. MCF-7 hücrelerinde 72 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.

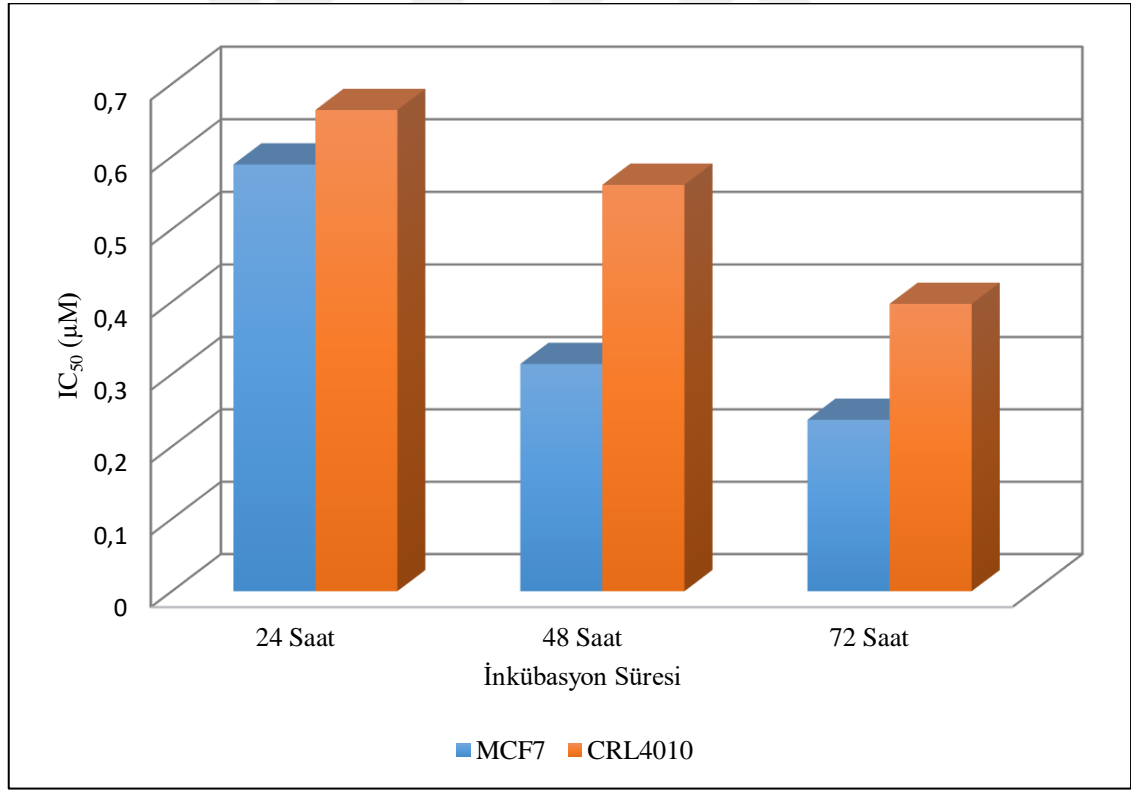


Şekil 8. CRL-4010 hücrelerinde 72 saatlik Sodyum deoksikolat uygulamasının hücre proliferasyonuna etkisi.

4.2. IC₅₀ Değeri

Tablo 2. Sodyum deoksikolat ile muamele edilem MCF-7 ve CRL-4010 hücre hatlarına ait IC₅₀ değerleri.

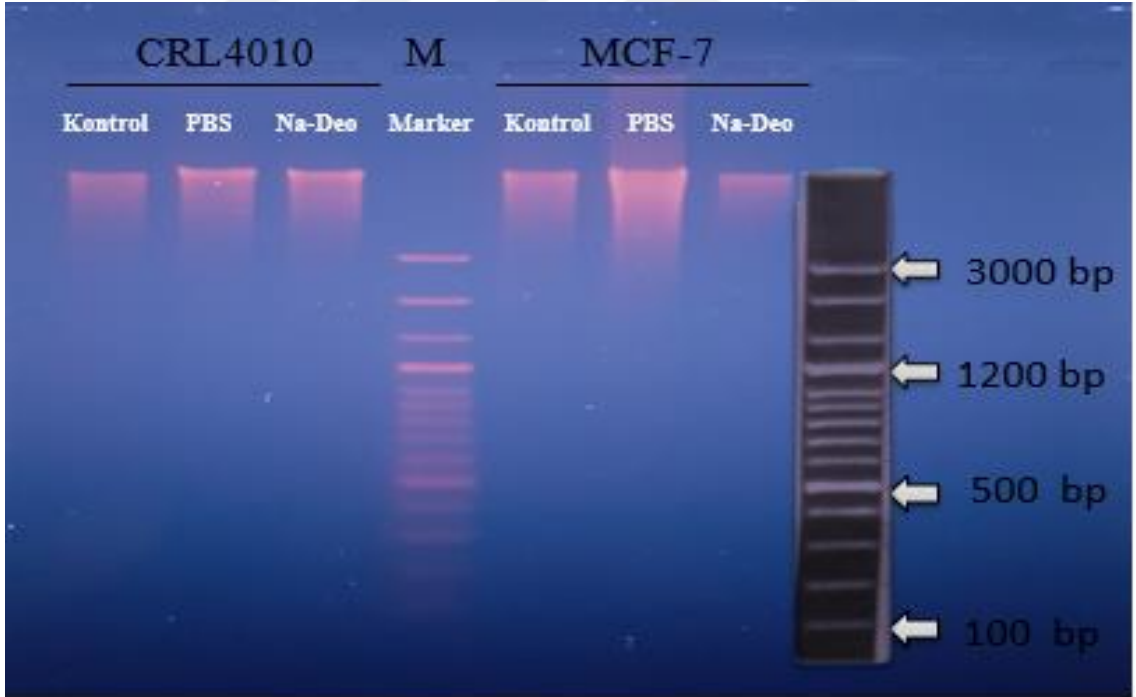
| İnkübasyon süresi | IC ₅₀ (µM) | |
|-------------------|-----------------------|---------|
| | MCF7 | CRL4010 |
| 24 Saat | 0,589 | 0,664 |
| 48 Saat | 0,314 | 0,561 |
| 72 Saat | 0,237 | 0,397 |



Şekil 9. Sodyum deoksikolat ile muamele edilen MCF-7 ve CRL-4010 hücre hatlarının zamana bağlı IC₅₀ grafiği.

4.3. Apoptotik Etki ve DNA Hasarının Tespit Edilmesi

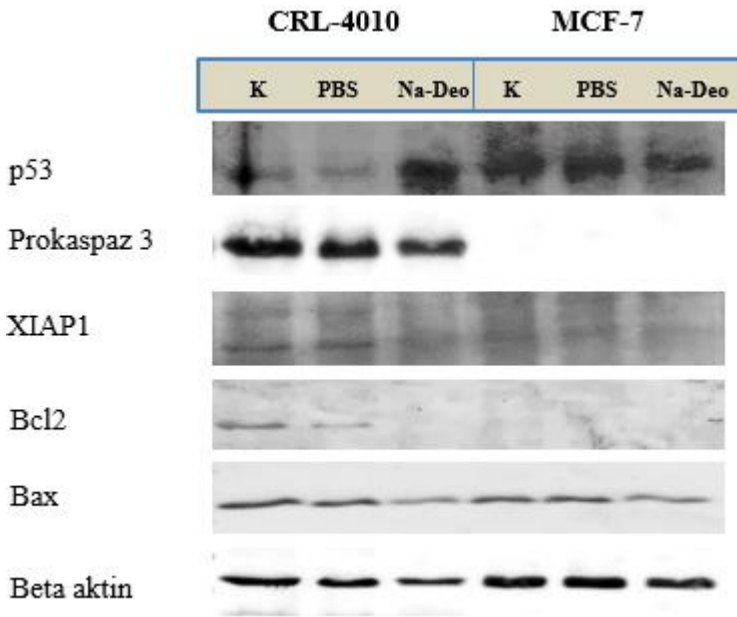
Sodyum deoksikolat maddesinin etkin konsantrasyonu kullanılarak, gösterilen sitotoksik etkinin apoptotik olup olmadığı ve DNA hasarı ise, apoptotik DNA ladder metodu ile incelendi. DNA hasarı, kaspazla aktive olan DNaz (CAD) tarafından DNA yıkımının karakteristik bir özelliğidir ve apoptoz sırasında önemli bir olay olan daha küçük baz çiftlerinin (bp) fragmanlarını oluşturur. CAD, internükleozomal bağlayıcı bölgelerdeki genomik DNA'yı böler ve bu, 180-185 baz çiftinin katları olan DNA fragmanları ile sonuçlanır. Parçacıkların düşük erime noktalı agaroz jel elektroforezi ile ayrılması ve ardından görselleştirme, örneğin etidyum bromür boyaması ile belirgin bir "merdiven" paternine yol açar, başlıca ölçüm birimleri DNA Fragmantasyonu İndeksidir (DFI) (Speyer ve ark., 2010). Sodyum deoksikolatın etkili dozunun 48 saat uygulandığı MCF-7 hem de CRL-4010 hücrelerinde DNA parçalanmasının göstergesi olan uzamaya başlayan merdiven oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 10. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerindeki DNA hasarı.

4.4. Western Blot Yöntemi

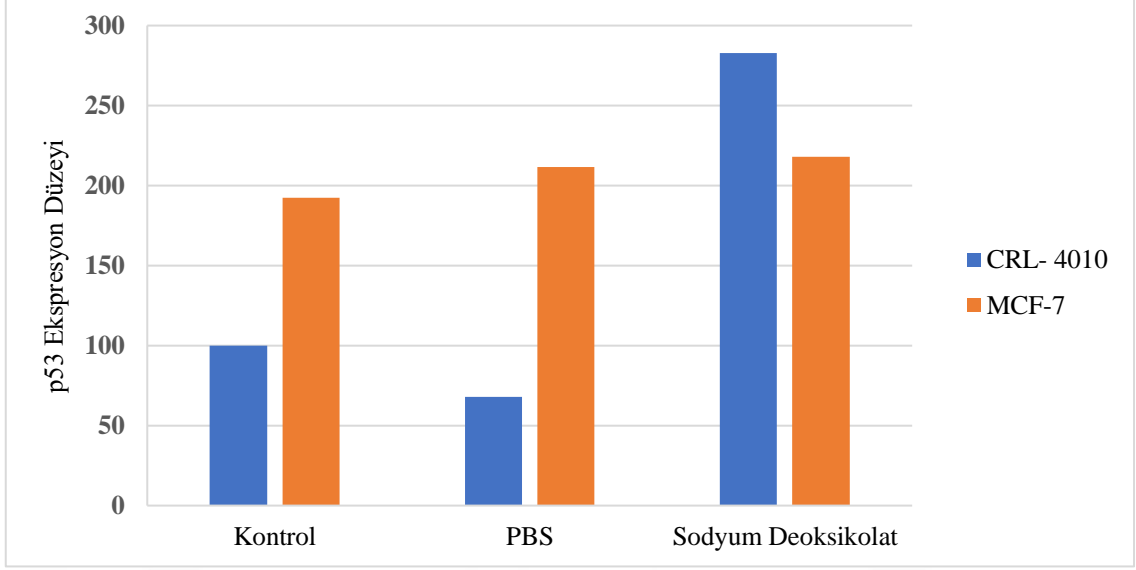
Apoptozun tespit edilmesi için biyokimyasal yöntemlerinden biri Western Blot yöntemidir. Bu yöntem ile apoptozis sırasında rol alan proteinler bulunabilir. Sodyum deoksikolat ile muamele edilen hücrelerin lizatı toplandı. Protein miktar tayini (Bradford analizi) yapıldı. Bradford analizi sonucu elde edilen proteinler jelde yürütüldü. Western Blot yöntemi ile apoptozis proteinlerinin (p53, prokaspaz 3, XIAP1, Bcl2, Bax, Beta Aktin) varlığı incelendi (Şekil 11).



Şekil 11. MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerinin Western Blot sonucu.

4.4.1. p53

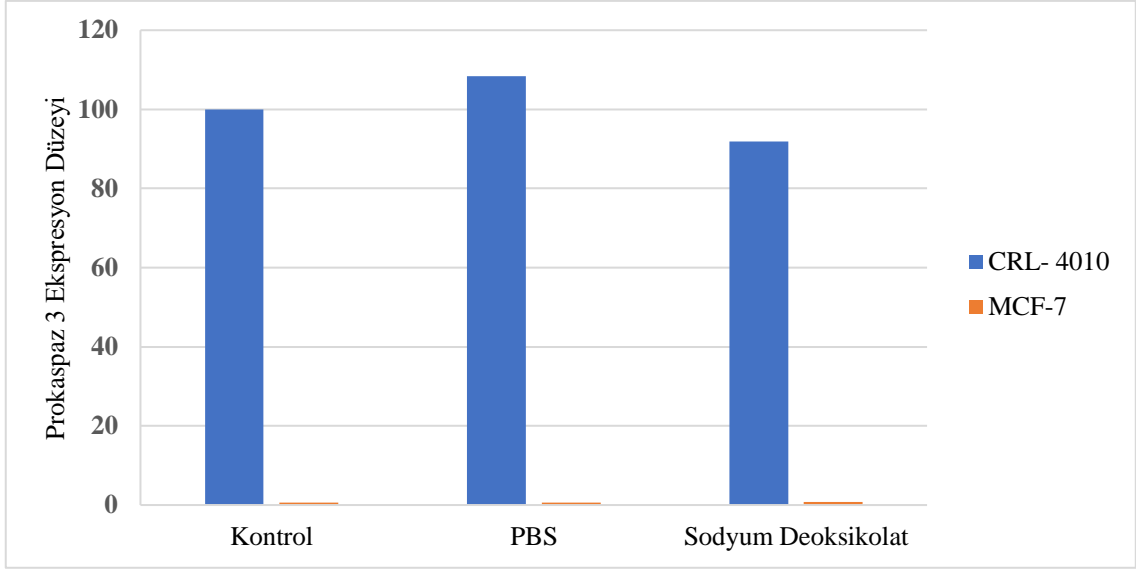
DNA üzerinde çok çalışılan genlerde biri olan tümör baskılayıcı gen tarafından kodlanan p53 proteini bir transkripsiyon faktörüdür. Aktif p53, tetramer oluşturan ve hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA'da belli genlerin aktivasyonuna neden olmaktadır. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş her iki hücre hattında (MCF-7 ve CRL-4010) p53 ekspresyonu artmış, ancak kontrol hücrelerinde ekspresyon düzeyini daha da arttırmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerinin p53 ekspresyon düzeyi.

4.4.2. Prokaspaz 3

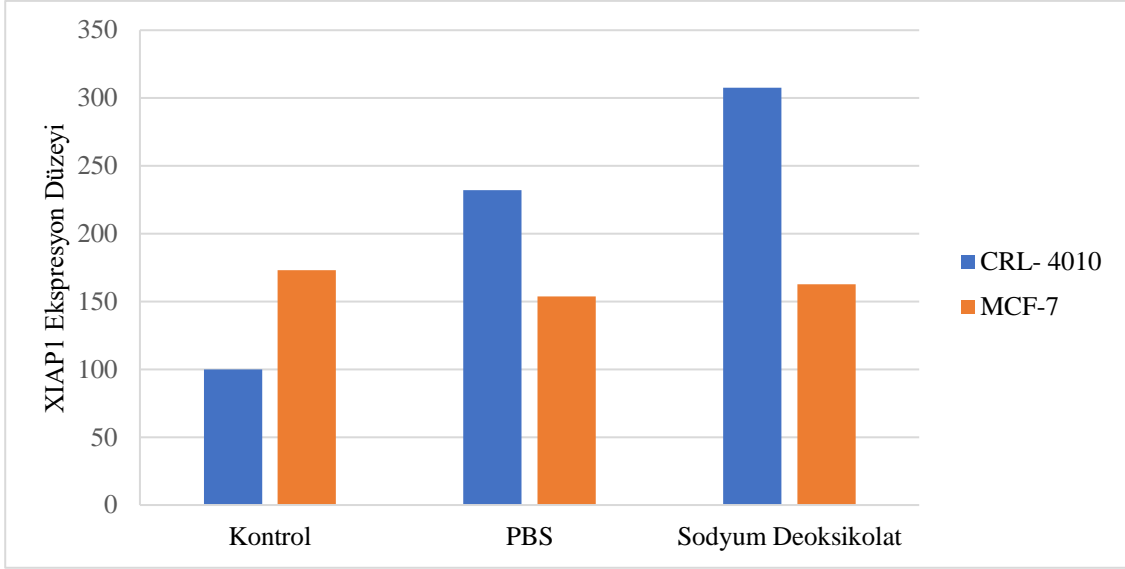
Kaspazlar göreceli olarak biyokimyasal ve yapısal karakterizasyona dayanarak sentezlenir. Aktif olmayan zimojen halindeki prokaspaz 3 efektör kaspazlardan biri olup aktivite kazanması için bir eylem sürecinden geçmeleri gerekir. Bir efektör efektör kaspazın, zincir içi aktivasyon ayrılmasından önce ve sonra hem homo-dimer olarak var olduğu bilinmektedir (Shi, 2004). Bu tez çalışmasında Sodyum deoksikolat uyguladıktan sonra incelenen CRL-4010 hücre hatlarında prokaspaz 3 bantlar çıktı ancak kanserli MCF-7 hücrelerinde hiç bant tespit edilemedi (Şekil 13).



Şekil 13. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerinin Prokaspaz 3 ekspresyon düzeyi.

4.4.3. XIAP1

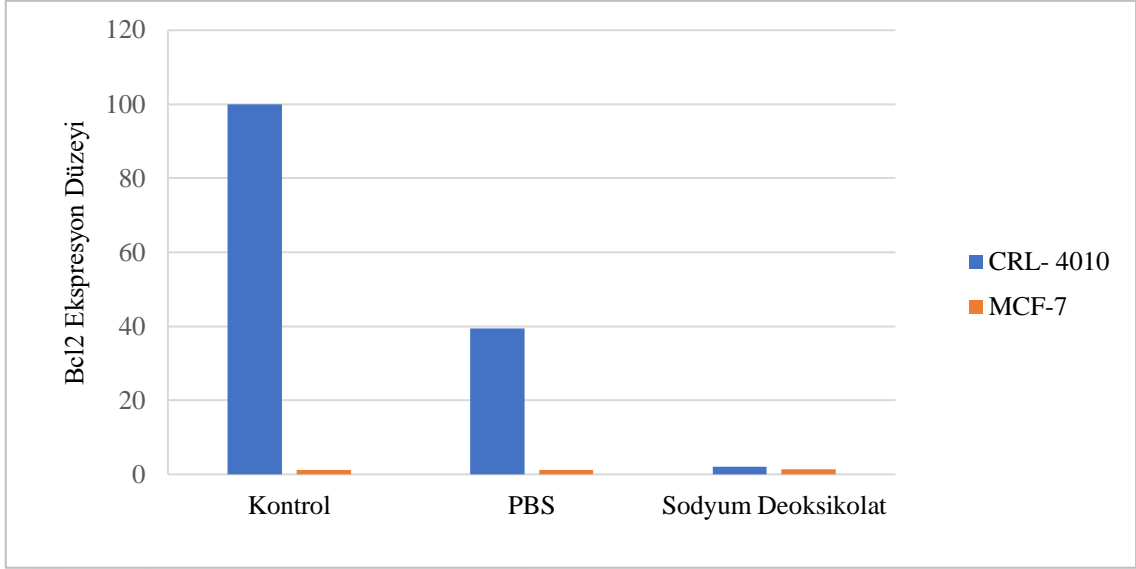
Bugüne kadar 8 adet insan apoptoz proteini inhibitörü (IAP) aile üyelerinin [X'e bağlı IAP (XIAP), cIAP1, cIAP2, IAP benzeri protein 2, melanom IAP, nöronal apoptoz inhibe edici protein, survivin ve bakulovirüs IAP tekrarları yineleyen ubiquitin konjuge enzim] var olduğu tespit edilmiştir. IAP ailesinin bir üyesi olan XIAP, hem apoptozu hem de hücre çoğalmasını düzenlemede önemli bir rol oynar (Jiang ve ark., 2012). Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL-4010 hücreleri Western Blot yöntem ile incelediğinde her iki hücre hattında XIAP1 bantları çıkmıştır (Şekil 11). Ancak bu sonucun analizinde kontrol hücrelerinin XIAP1 oranı kanserli hücrelerine göre daha fazla artmıştır (Şekil 14).



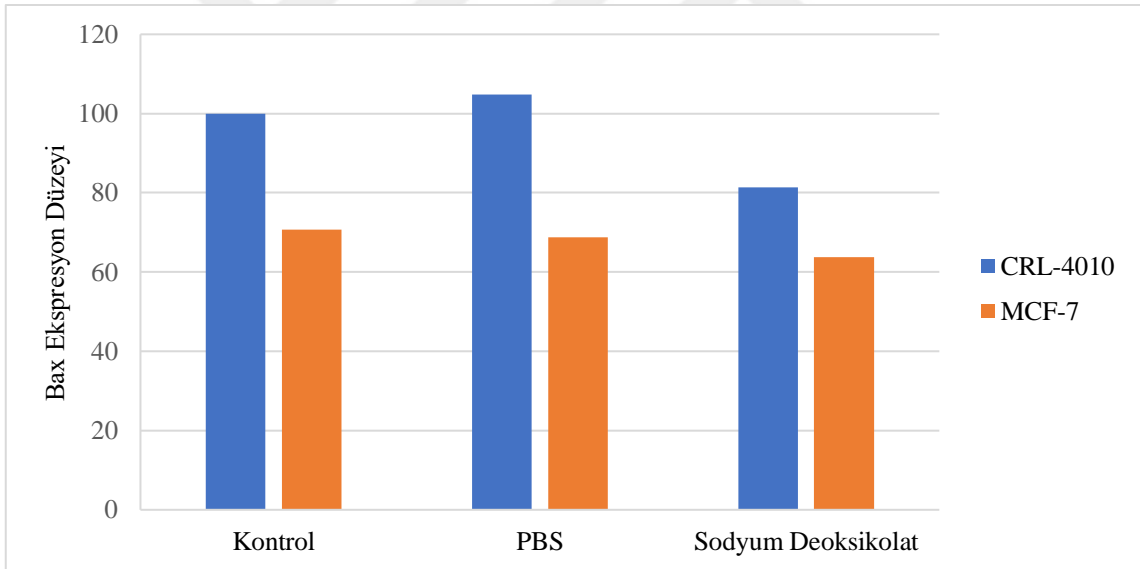
Şekil 14. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinin XIAP1 ekspresyon düzeyi.

4.4.4. Bcl2, Bax

Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve Bfl-1'i içeren antiapoptotik proteinler BH1-4 bölgelerine sahiptir ve bunlar doğrudan iki sınıf provaya bağlanarak hücre ölümünü önler. Apoptotik proteinler: Bax / Bak proteinleri ve sadece BH3 proteinleri. Bax ve Bak, antiapoptotik proteinler gibi BH1-4 etki alanlarına sahiptir. Bu proteinler apoptozun temel araçlarıdır, proapoptotik proteinlerdir (Coşkun ve Özgür, 2011). Bizim çalışmamızda Sodyum deoksikolata maruz bırakılan MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerinin incelemesinde Bcl2 proteinleri sadece CRL-4010 hücrelerinin kontrol ve PBS gruplarında bantlar elde ettik, ancak Sodyum deoksikolat ile muamele edilen CRL-4010 ve MCF-7 hücrelerinin hiçbir grubunda bant gözlenmedi. Ayrıca iki hücre hattında Bax protein bantları tespit edildi (Şekil 11). Bu sonuçlara göre analizi yapıldı ve proteinlerin oranları gösterildi (Şekil 15, Şekil 16).



Şekil 15. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinin Bcl2 ekspresyon düzeyi.



Şekil 16. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinin Bax ekspresyon düzeyi.

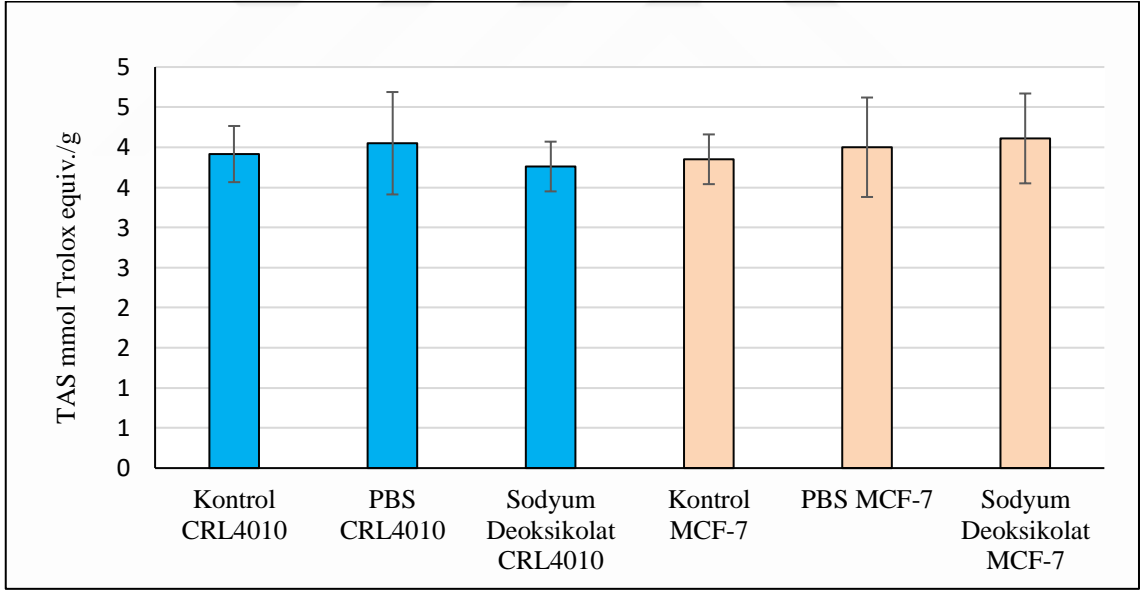
4.4.5. Beta aktin

Beta aktin Western Blot sonuçları doğrulamak için bir kontrol proteindir. Western Blot kullanarak proteinlerin yarı miktarları tipik olarak β -aktin gibi housekeeping genlerine karşı normalizasyonu içerir (Gilda ve Gomes, 2013).

Western Blot, spesifik antikorlarla boyamaya dayalı ilgili proteinlerin nispi konsantrasyonlarını tahmin etmek amacı ile kullanılır. Kantitatif ölçümler, genellikle yükleme kontrolünün aşırı yüklenmesi ve normalleşmeye aşırı güvenme nedeniyle hata oluşturur. Normalde ilgilenilen en düşük yoğunluğa sahip proteinleri ölçmek için kullanılan protein konsantrasyonlarında, gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) ve β -aktin gibi sıklıkla kullanılan tek proteinli yükleme kontrollerinin protein içindeki farklılıkları tam olarak yansıtmadığı bildirilmiştir (Aldridge ve ark., 2008).

4.5. Oksidatif Stres Bulguları

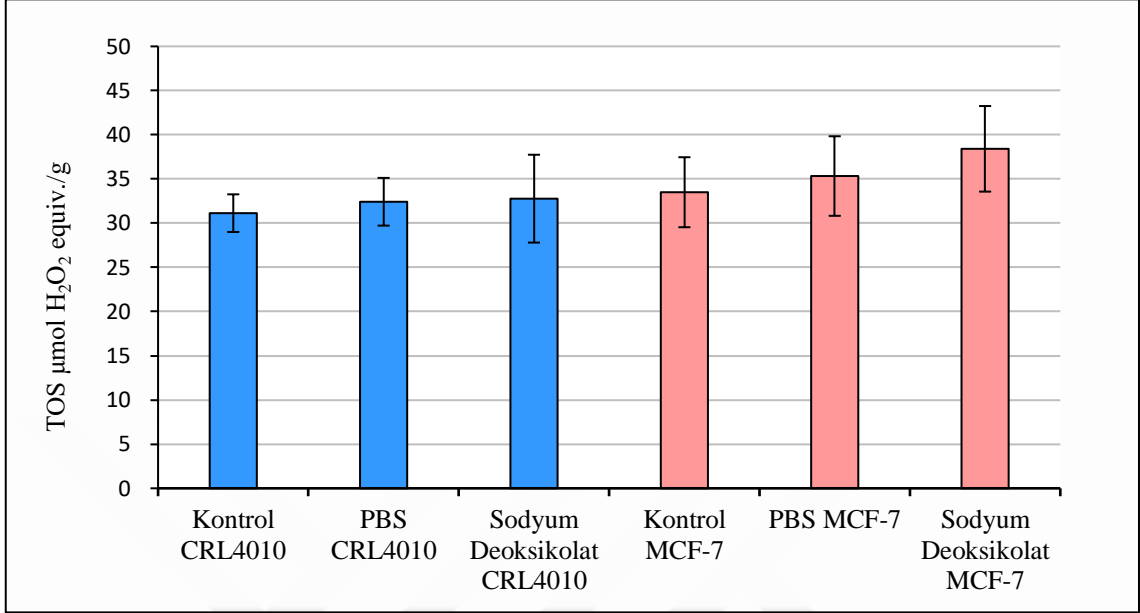
Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerinde total antioksidan statüs parametresi çalışıldı. CRL-4010 ve MCF-7 hücrelerinde kontrole kıyasla PBS ile Sodyum deoksikolat gruplarına ait TAS değerlerinde anlamlı fark görülmedi (Şekil 17).



Şekil 17. Şekil 17. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerinde TAS değerlerinin grafiği.

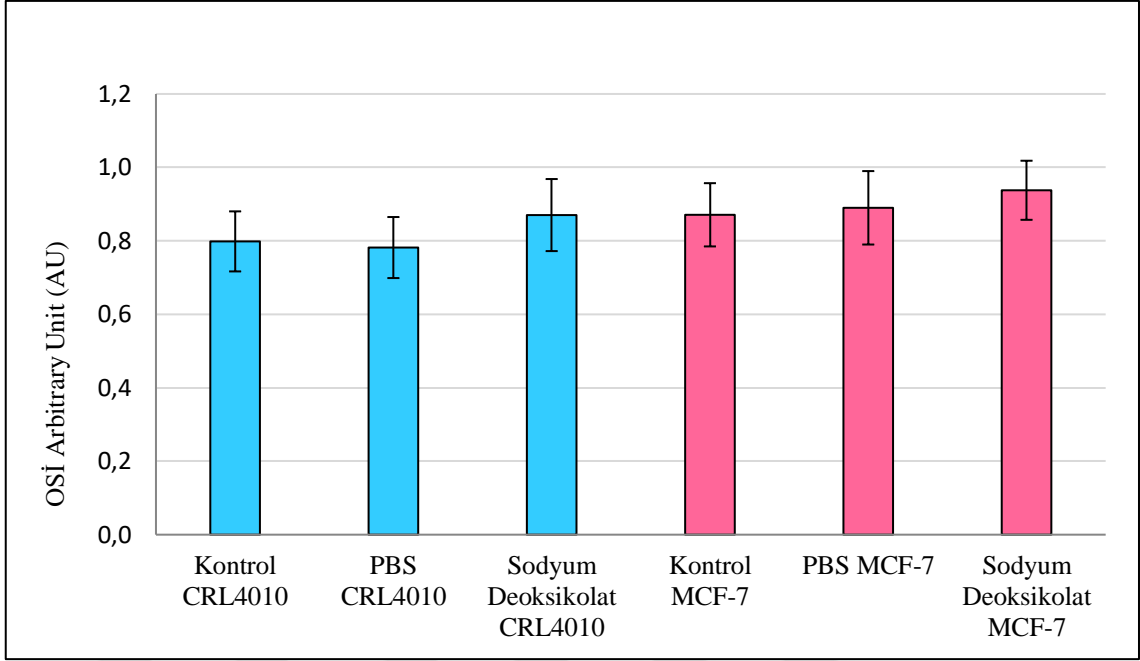
Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerinde total oksidan statüs parametresi çalışıldı. CRL-4010 hücrelerindeki grupların arasında TOS değerleri açısından anlamlı bir fark gözlenmedi. MCF-7 hücrelerinde kontrole kıyasla

PBS ile Sodyum deoksikolat grubunda görülen TOS değerlerindeki artış istatistiki olarak anlamlı görülmedi (Şekil 18).



Şekil 18. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinde TOS değerlerinin grafiği.

OSİ değeri ise MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerinde oksidatif stres parametresi olarak analiz edildi. CRL-4010 ve MCF-7 hücrelerinde hem kontrole hem de PBS ile kıyasla bütün hücre gruplarına ait OSİ değerlerinde istatistiki açıdan anlamlı farklar gözlenmedi (Şekil 19).

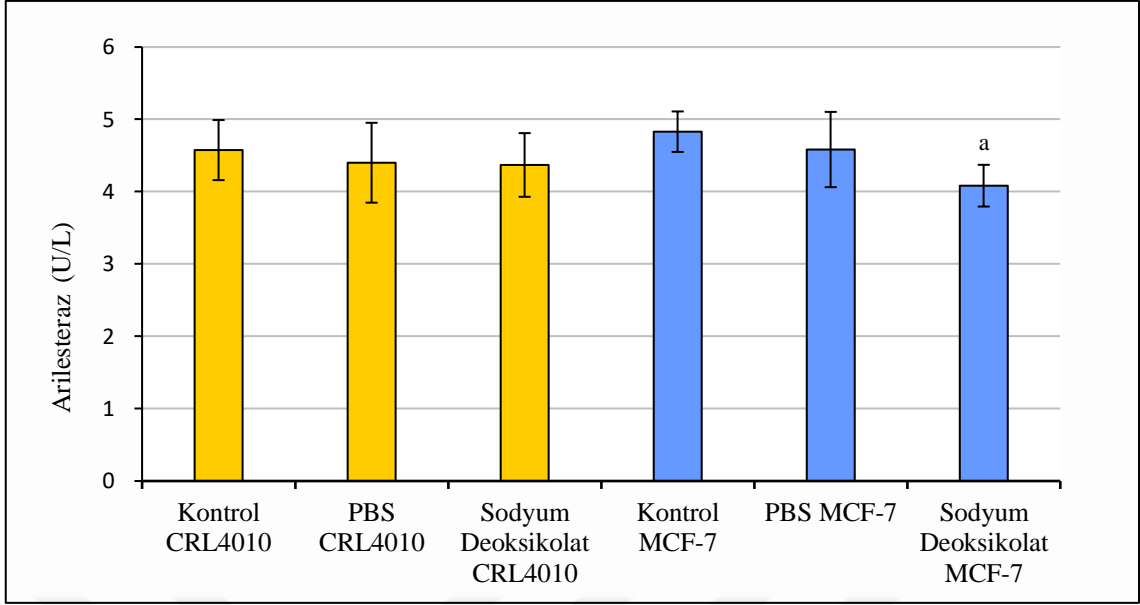


Şekil 19. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinde OSİ değerlerinin grafiği.

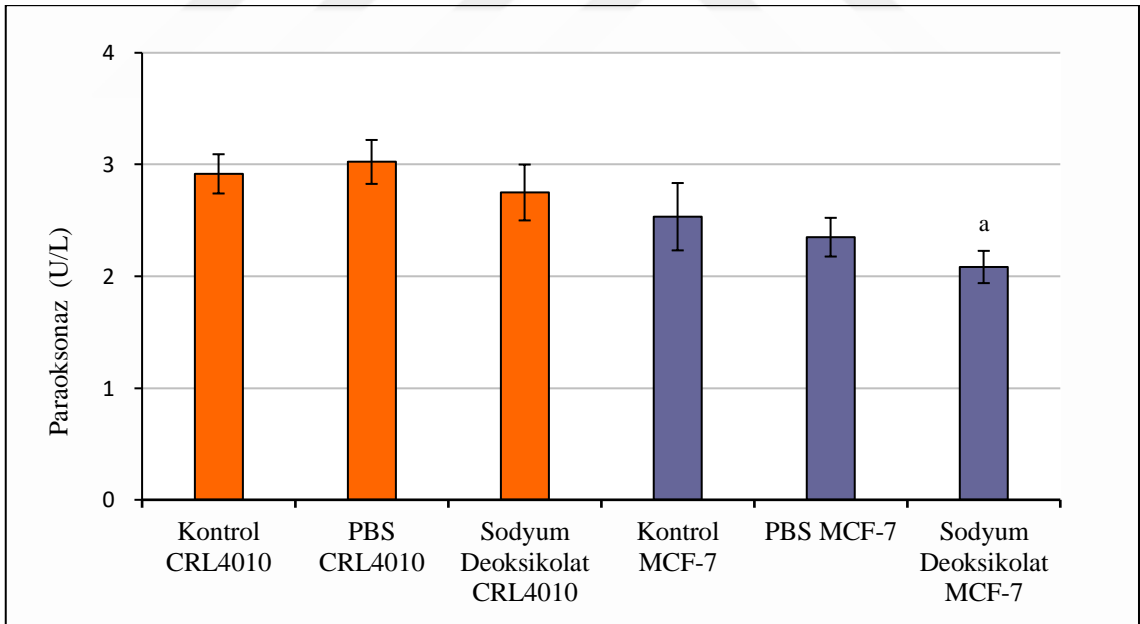
4.6. Arilesteraz ve Paraoksonaz Bulguları

Arilesteraz aktivitesi ölçülen CRL-4010 hücre hattının kontrol, PBS ve Sodyum deoksikolat grupları arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. Ancak kanserli meme hücreleri olan MCF-7 hücre hattında kontrol grubuna göre PBS ve Sodyum deoksikolat gruplarında düşüş olduğu tespit edildi. Kontrol grubuna kıyasla Sodyum deoksikolat grubunda gözlemlenen arilesteraz enzim aktivitesindeki azalmanın istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 20).

Paraoksonaz enzim aktivitesi bakımından CRL-4010 hücre hattında kontrol, PBS ve Sodyum deoksikolat gruplarında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Ancak MCF-7 meme kanseri hücre hattının kontrol grubuna göre PBS ve Sodyum deoksikolat gruplarında düşüş gözlemlendi. Kontrol ile kıyaslandığında Sodyum deoksikolat grubundaki azalışın istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 21).



Şekil 20. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL- 4010 hücrelerinde Arilesteraz aktivitesinin grafiği (a: Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı $p < 0.05$).

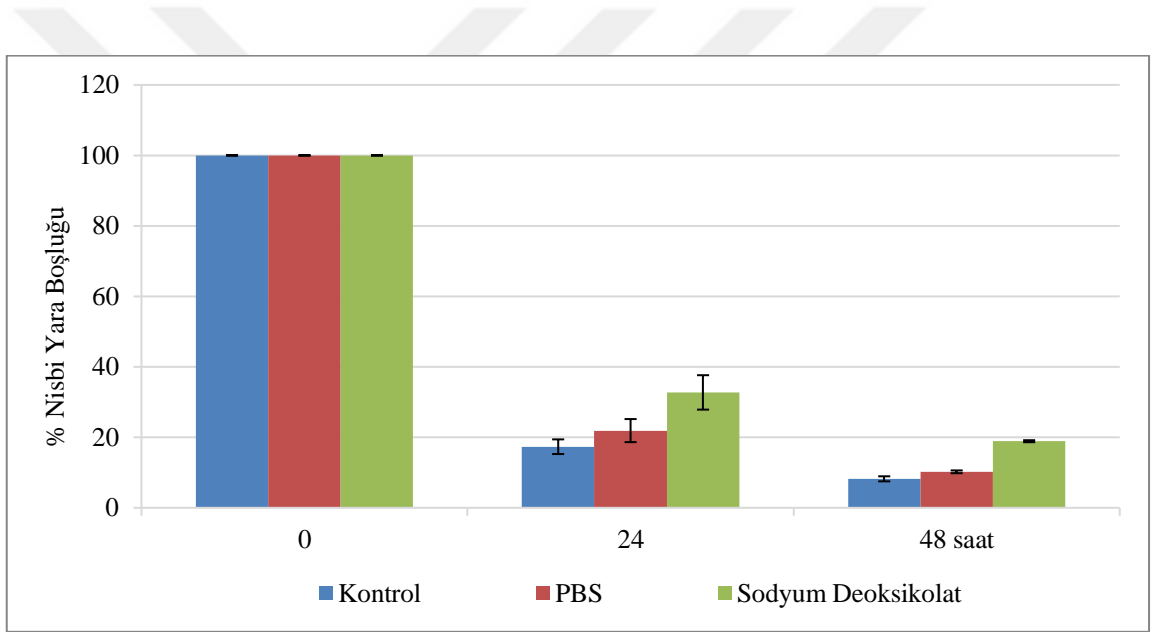


Şekil 21. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerinde Paraoksonaz aktivitesinin grafiği (a: Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı $p < 0.05$).

4.7. Hücre Göçü Bulguları






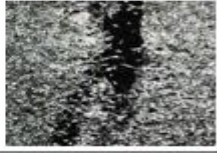


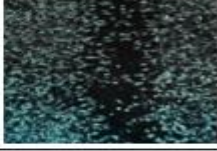
Hücre göçü testi (scratch analizi) *in vitro* olarak hücresel migrasyonları ölçmek için kullanılan kolay, düşük maliyetli ve iyi geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu analiz tek katmanlı hücre tabakasında bir "çizik" oluşturarak belirli zaman aralıklarında alınan görüntülerin karşılaştırılması esasına dayanır (Liang ve ark., 2007).

CRL-4010 hücrelerinin tüm gruplarında hücre göçünün zamana bağlı olarak (24 ve 48 saat) artış gösterdiği ve başlangıç saatinde (0 saat) oluşturulan boşluğu doldurduğu gözlenmiştir (Şekil 22), (Tablo 3).

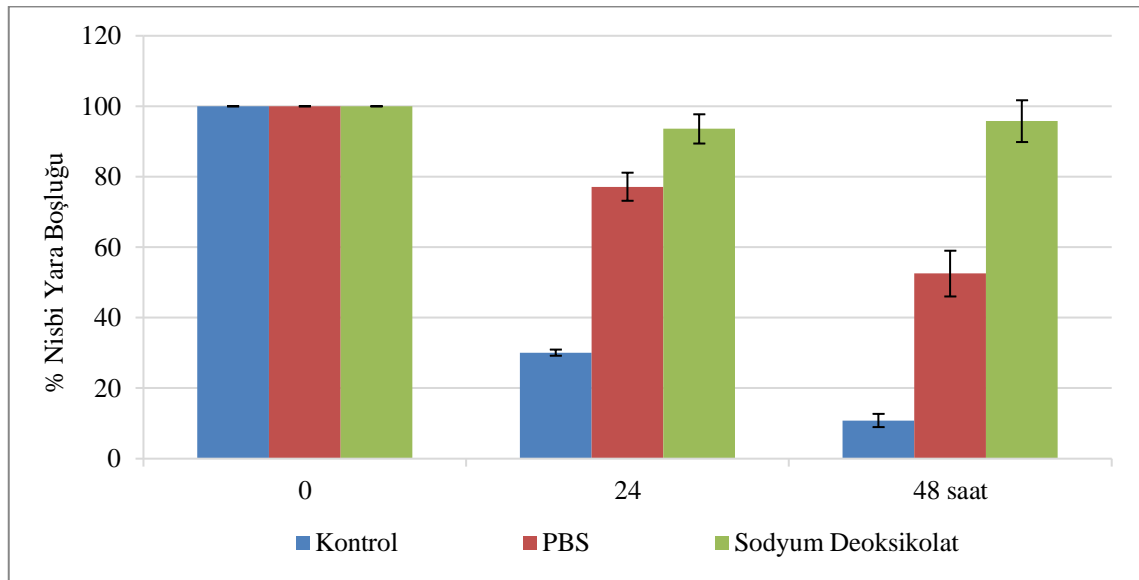


Şekil 22. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş CRL- 4010 hücrelerinde hücre göçü grafiği.

Tablo 3. Hücre göçü testinde 0, 24 ve 48. saatlerde CRL-4010 hücrelerinden elde edilen görüntüler.





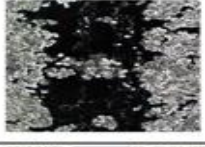
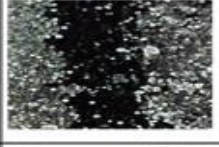


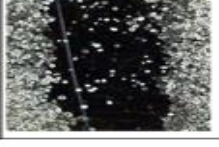
| Hücre Tipi İnkübe saatleri | CRL4010 / KONTROL | CRL4010 / PBS | CRL4010 / Sodyum deoksikolat |
|-------------------------------|--|--|--|
| 0 Saat |  |  |  |
| 24 Saat |  |  |  |
| 48 Saat |  |  |  |

Sodyum deoksikolatın 24 ve 48 saatlik uygulamalarının MCF-7 hücre hattına ait hücre göçünü kuvvetli bir şekilde engellediği tespit edilmiştir (Şekil 23), (Tablo 4).



Şekil 23. Sodyum deoksikolat ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinde hücre göçü grafiği.

Tablo 4. Hücre göçü testinde 0, 24 ve 48. saatlerde MCF-7 hücrelerinden elde edilen görüntüler.

| <i>Hücre Tipi</i> <i>İnkübe saatleri</i> | MCF-7/KONTROL | MCF-7/PBS | MCF-7/ Sodyum deoksikolat |
|---|---|---|--|
| 0 Saat |  |  |  |
| 24 Saat |  |  |  |
| 48 Saat |  |  |  |

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser çevresel ve genetik koşulların etkileri nedeniyle kompleks bir hastalık olup hücrenin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması olarak tanımlanabilir. Günümüzde 100'den fazla kanser türü bilinmektedir. Kanser tedavisi için standart tedavi metotları geliştirilmiş olmasına rağmen, hiçbir insanın DNA'sının birbirine benzememesinden dolayı kanser kişisel bir hastalık olarak düşünülmektedir. Bu sebepten ötürü kanserde kişisel tedavilere verilen tepkiler de farklı olmaktadır. Teknolojinin gelişmesi ve ilerlemesi her alanda olduğu gibi kanser tedavi teknolojilerini de etkilemiş ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini mümkün kılmıştır. Kanser tedavisinde standart olarak kabul edilen ve bilinen kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlere alternatif olarak kanser aşılı, biyolojik aşılı, hormonal tedavi, hedeflenmiş ve gen terapiler de etkin şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Kanser ve tedavisi hakkında farklı yaklaşımlar ve zengin bir bilimsel makale kaynağı vardır (Baykara, 2016). Kemoterapinin asıl amacı kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlar kullanarak öldürmek olup, sitotoksik anti-neoplastik ajanlar bu tip tedavide başordedir.

Bu çalışmada Sodyum deoksikolatın anti kanser özelliği olup olmadığı meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve sağlıklı CRL-4010 hücreleri üzerinde uygulanarak test edildi. MTT testinin sonuçlarına göre Sodyum deoksikolatın hem MCF-7 hem de CRL-4010 için sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Sodyum deoksikolatın doz ve zamana bağlı olarak yapılan sitotoksikite testlerinden IC_{50} değerleri elde edilmiştir. Buna göre CRL-4010 hücrelerine kıyasla MCF-7 hücrelerine ait olan IC_{50} değerlerinin daha düşük olması nedeniyle Sodyum deoksikolatın meme kanseri hücrelerinde daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 2 ve Şekil 9).

Bu tez çalışmasıyla elde edilen veriler, daha önce yapılan bazı araştırmaların sonuçları ile desteklenmiştir. Bununla birlikte deoksikolik asitin türevleri olan bazı bileşiklerin biyoaktiviteleri, üç tümör hücre hattı A549 (insan akciğer kanseri hücre hattı), MCF-7 (insan meme kanseri hücre hattı) ve HeLa (insan rahim ağzı kanseri hücre hattı) üzerinde MTT yöntemi ve Western Blot analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu bileşiklerin antiproliferatif etki göstererek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2007).

Apoptotik DNA ladder kiti ile Sodyum deoksikolatın hücre hatlarında DNA hasarı test edildi. Bu maddenin etkili dozu ile 48 saat muamele edilen MCF-7 ve CRL-4010 hücrelerinde band uzaması görünse bile, DNA parçalanmasının göstergesi olan merdiven oluşumu tespit edilmemiştir (Şekil 10). Prasad ve arkadaşlarının yaptığı bir *in vivo* çalışmada deoksikolatın fare bağırsak epitelinde, DNA hasarının seviyesini gösteren 8-okso-dG'i arttırdığı bildirilmiştir. Deoksikolat kaynaklı DNA hasarının seviyesi yüksek olduğu zaman, DNA onarım enzimlerinin DNA hasarını onarmaları mümkün olmayabilir (Prasad ve ark., 2014). Apoptotik DNA ladder nükleozomal DNA fragmentasyonu analizi için yapılırken 8-okso-dG deneyi ise DNA baz oksitlenmesinin ölçümü için yapılan bir analizdir. Bu durum yukarıdaki çalışmanın bulguları ile araştırmamızın sonuçları arasındaki farklılığın temel sebebidir. Öte yandan değişik canlı türü ile farklı doz ve deney modellerinin kullanılması da etkili olabilir. Bununla birlikte, internükleozomal DNA fragmentasyonu, apoptoz sırasında her zaman olamayacağından evrensel değildir (Vinatier ve ark., 1996).

Bu tez çalışmasında Western Blot yöntemi kullanılarak apoptoz mekanizmasında rol alan proteinler tespit edildi. Tümör baskılayıcı p53, öncelikle apoptozu indüklemekle yeteneği sayesinde tümör büyümesini inhibe eder (Bykov ve ark., 2002). Sodyum deoksikolat uygulanmış her iki hücre hattında (MCF-7 ve CRL-4010) p53 ekspresyonu artmış, ancak sağlıklı meme hücre hattı olan CRL-4010 hücrelerinde ekspresyon düzeyinin daha çok arttığı tespit edilmiştir (Şekil 11, Şekil 12). Artan miktarda p53 proteini çekirdeğine geçerek hücreyi apoptoz sokmak için ilgili genlerin ekspresyonunu değiştirir (Pyrzynska ve ark., 2002). Bunun yanı sıra prokaspaz-3 bantları CRL-4010 hücre hattının tüm gruplarında belirlenmişken MCF-7 hücre hattının hiçbir grubunda bu bant tespit edilmemiştir (Şekil 11). Daha önceki çalışmalarda MCF-7 hücrelerindeki prokaspaz-3 kaybının nedenini araştırmak için Northern Blot analizi yapılmıştır. MCF-7, HeLa D98 ve H21 hücrelerinin toplam RNA'sının yanı sıra fonksiyonel CASP-3'ü eksprese ettiği gösterilmiştir. İnceledikleri tüm hücre hatlarında CASP-3 mRNA için benzer ekspresyon oranı belirlenirken aralarında hiçbir belirgin boyut farkı gözlenmemiştir. Bu nedenle, MCF-7 hücrelerinde prokaspaz-3'ün eksikliği, CASP-3'ün kopyalanamamasından kaynaklanmamaktadır (Reiner ve ark., 1998).

Sodyum deoksikolat uygulanmış MCF-7 ve CRL-4010 hücreleri Western Blot yöntemi ile incelendiğinde her iki hücre hattında XIAP1 bantları elde edildi (Şekil.11). Ancak bu verilerin analizine bakıldığında özellikle sodyum deoksikolat uygulanan kontrol hücrelerinin XIAP1 oranının kanserli hücrelerine göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür (Şekil 14). Bir apoptoz inhibitörü olarak kontrol hücrelerinde artan seviyelerde tespit edilen XIAP1, bu özelliği ile CRL-4010 hücrelerini programlı hücre ölümünden nispeten uzak tutmuş olabilir.

Bcl2 protein bantları sadece CRL-4010 hücre hattının kontrol ve PBS gruplarında görülmüştür, ancak CRL-4010 Sodyum deoksikolat grubu ve MCF-7 hücrelerinde hiç bant belirlenmemiştir. Ayrıca iki hücre hattında da proapoptotik Bax protein bantları tespit edildi (Şekil 11). Bu sonuçlara göre bantların analizi yapılarak proteinlerin oranları gösterildi (Şekil 15 ve Şekil 16). Bu tez çalışmasında elde edilen sonuca benzer şekilde daha önce yapılan çalışmada deoksikolik asitin türevleri olan Ursodeoksikolik asit (UDCA), chenodeoksikolik asitin (CDCA) MCF-7 (Yabanıl tipli p53) ve MDA-MB-231 (mutant p53) hücrelerinde anti-proliferatif etkileri karşılaştırılmıştır. UDCA ve CDCA türevlerinin, her iki hücre hattının proliferasyonunu konsantrasyona bağlı olarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra apoptotik nükleer değişikliklerle birlikte ve bir alt G1 popülasyonunun artışı ve DNA parçalanması belirlenmiştir (Im ve ark., 2001). Tezimizde ayrıca pro-apoptotik protein Bax'ın anti-apoptotik protein Bcl-2'ye oranının arttığı da gözlenmiştir.

Oksidatif stres, apoptozisi indükleyen faktörlerden birisidir. Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı olarak ölümüdür (Cohen, 1998).

Oksidatif stresin ve serbest oksijen radikallerinin artması, çeşitli kanser türlerinin riskinin artmasıyla ilişkilidir. Reaktif oksijen türlerinin reaktivitesi yüksektir ve hemen hemen tüm hücre komponentlerine saldırarak dokularda hasara yol açabilirler. Bu tez çalışmasında Sodyum deoksikolat uygulanan CRL-4010 ve MCF-7 hücre hatlarında oksidatif stres testleri (TAS, TOS, OSI) incelendi. Fakat elde edilen sonuçlar gruplar arasında görülen farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığını işaret etmiştir. Her ne kadar

MCF-7 hücreleri üzerinde Sodyum deoksikolat TOS ve OSİ artışına neden olsa bile bu istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 17; Şekil 18 ve Şekil 19).

Lipid peroksidasyonu son ürünleri ve radikal süpürücü sistem elemanlarının onkogeneze için başlatıcı role sahip olduğu düşünülmektedir (Valko ve ark., 2006; Dreher ve Junod, 1996). Lipid peroksidasyonu sonucunda karsinogenik yağda çözünen radikaller oluşur ve PON1, bu radikallerle bağlanır. PON1'in, yağda çözünen radikalleri metabolize etme özelliğine sahip olduğu düşünülmektedir ve PON1 aktivitesinin serumda ve makrofajlarda oksidatif stres ile ters orantılı olduğu öne sürülmektedir (Rozenberg ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda genellikle kanser türlerinde ve özelde meme kanserinde serum arilesteraz ve PON1 düzeyi düşük bulunmuştur (Antognelli ve ark., 2009; Elkiran ve ark., 2007; Kaya, 2009). Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna göre oksidatif stres nispi olarak yüksek ancak arilesteraz ve PON1 düzeyleri ise istatistiki açıdan anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Şekil 20, Şekil 21). Bu durum MCF-7 kanser hücrelerinde paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitelerinin azalmasının risk faktörü olabileceği kanaatini güçlendirmektedir.

Hücre göçü testi sonuçlarına göre 24 ve 48 saat uygulanan Sodyum deoksikolat MCF-7 hücre hattında hücre göçünü anlamlı derecede azaltmıştır. Farklı bulgulara ulaşan başka çalışmalar olsa bile (Raju ve ark., 1990), hücre göçündeki azalma, Sodyum deoksikolatın, hücre göçünün çeşitli yönlerinde yer alan bir transmembran glikoprotein ailesi olan integrinleri etkilemesinden kaynaklanabilir (Lee ve ark., 2010).

Bu tez çalışmasında Sodyum deoksikolatın anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunda azalma yoluyla meme kanser hücrelerinde hücre apoptozunu indüklemeye yeteneği olduğu belirlendi. Ayrıca Sodyum deoksikolatın proapoptotik proteinlerin ekspresyonunun artmasına neden olduğu tespit edildi. MCF-7 meme kanser hücrelerinde, prediktif risk belirteci olarak kullanılabilir önemi olan paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivite ölçümleri belirlenmiştir. Öte yandan MCF-7 hücre göçünü Sodyum deoksikolatın engellemesi dikkate değer bir sonuçtur. Bununla birlikte, *in vitro* araştırmalardan oluşan bu tez çalışması potansiyel olarak, ileride yapılacak olan diğer bazı *in vivo* kanser modelleri için ön inceleme niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abeloff MD, Wolff AC, Weber BL ve ark. In:Abeloff MD, Armitage JO, Lichter AS ve ark. Cancer of the breast .eds. Clinical Oncology. 4. Baskı. Philadelphia: 2008.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5. Baskı. New York: Taylor and Francis Group;2008.
- Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. J Neurosci Methods. 2008;172(2):250-4.
- Antognelli C, Del Buono C, Ludovini V, et al. CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case control study. BMC Cancer. 2009;9:115.
- Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. IntechOpen. 2017;1-17.
- Aycicek A, Varma M, Ahmet K, Abdurrahim K, Erel O. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in placental tissue. Eur J Pediatr. 2011;170(5):645-51.
- Aydoğan T, Cakcak E, Şimşek O, Erginöz E, Aydoğan F, Hatipoğlu S ve ark. Güncel çevresel risk faktörlerinin meme kanserine etkisi. Bakırköy Tıp Dergisi. 2013;9:176-82.
- Baykara O. Current modalities in treatment of cancer. Balıkesir Sağlık Bil Derg. 2016;5(3):154-65.
- Bhattarai A, Shah SK, Yadav AK, Adhikari, J. Effect of solvent composition on the critical micelle concentration of sodium deoxycholate in ethanol-water mixed solvent media. Bibechana. 2012;63-68.
- Boatright KM, Salvesen GS. Caspase activation. Biochem Soc Symp. 2003;(70):233-42.
- Brinton LA, Sherman ME, Carreon JD, Anderson WF. Recent trends in breast cancer among younger women in the United States. J Natl Cancer Inst. 2008;100(22):1643-8.
- Bykov VJN, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P ve ark. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. Nat Med. 2002;8(3):282-8.
- Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. postgraduate syllabus. 1998;1:1-19.
- Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. 2011;20:145.
- Çayır K, Bilici M, Tekin SB, Kara F, Turkyılmaz A, Yıldırım A. Serum Paraoxonase and Arylesterase activities in esophageal cancer. Eur J Gen Med. 2010;7(4):398-403.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem. 2005;38(12):1103-11.

- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277–85.
- Erel OA. Noval automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004;37:112-9.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* 2010;127(12):2893-917.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:1106-14.
- Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. *Anal Biochem.* 2013;15:440(2):186-8.
- Girish Ch, Vijayalakshmi P, Mentham R, Rao Cb, Nama S. A Review on breast cancer. *Int J Pharm Bio Sci.* 2014;47-54.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA. *Kuby Immunology.* 5. Baskı. New York: 2002.
- Gough W, Hulkower KI, Lynch R, McGlynn P, Uhlik M, Yan L, ve ark. A Quantitative, Facile, and High-Throughput Image-based cell migration method is a robust alternative to the scratch assay. *J Biomol Screen.* 2011;16(2):155-63.
- Gursu MF, Ozdın M. Sigara içenlerde serum paraoksonaz (PON1) aktiviteleri ile malondialdehit düzeylerinin araştırılması. *Fırat Tıp Dergisi.* 2002;7:32-737.
- Gülcü F, Gürsu MF. Paraoksonaz ve Aril Esteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu. *Turk J Biochem.* 2003;28(2):45-9.
- Haagen L, Brock A. A new automated method for phenotyping arylesterase (E.C.3.1.1.2.) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate by phenyl acetate. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1992;30:391–5.
- Hussein AI. The effect of bis structured schiff base materials on apoptosis, cytotoxic and dna damage of breast cancer cell line [Yüksek lisans tezi]. Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi; 2017.
- Im EO, Choi YH, Paik KJ, Suh H, Jin Y, Kim KW ve ark. Novel bile acid derivatives induce apoptosis via a p53-independent pathway in human breast carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2001; 163(1): 83-93.
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Okhura Y, Ueno KA. Combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull.* 1996;19(11):1518-1520.

- Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem.* 1998;273(16):9357–60.
- Jiang C, Yi XP, Shen H, Li YX. Targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits pancreatic cancer cell growth through p-Akt depletion. *World J Gastroenterol.* 2012;18(23):2956–65.
- Kim JW, No JK, Ikeno Y, Yu BP, Choi JS, Yokozawa T, Chung HY. Age-related changes in redox status of rat serum. *Arch Gerontol Geriatr.* 2002; 34: 9-17.
- Krishan A, Fitz CM, Andritsch I. Drug retention, efflux, and resistance in tumor cells. *Cytometry.* 1997;29(4):279-85.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, et al. Classification of cell death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3–11.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;(16): 3-11.
- Kutluk T, Kars A. *Kanser konusunda genel bilgiler.* Ankara: 1992.
- Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;83(3):249-89.
- Lewis J, Raff M, Roberts K. *Molecular Biology of the Cell.* *J Biol Edu.* 2011;37(1):45-7.
- Li CI, Anderson BO, Porter P, Holt SK, Daling JR, Moe RE. Changing incidence rate of invasive lobular breast carcinoma among older women. *Cancer.* 2000;88(11):2561-9.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 2000;321(7261):624-8.
- Menthem R, Rao CB, Nama S. Review on breast cancer. Review Article. *Pharm Sci.* 2014;4(2):47-54.
- Moela P, Motadi LR. Apoptotic molecular advances in breast cancer management. *Cell Death.* 2015;181-93.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63.
- Prasad AR. Novel diet-related mouse model of colon cancer parallels human colon cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2014;6(7):225-43.
- Raju U, Levitz M, Javitt NB. Bile acids in human breast cyst fluid: the identification of lithocholic acid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;70:1030-34.

- Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih DM, Aviram M. Actions of melatonin in oxygen dical pathophysiology. *Life Sci.* 2003;60(25):2255-71.
- Shi Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell.* 2004; 117(7):855-8.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291-5.
- Pyrzynska B, Serrano M, Martínez-A C, Kaminska B. Tumor suppressor p53 mediates apoptotic cell death triggered by cyclosporin A. *J Biol Chem.* 2002;277(16):14102-8.
- Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JDA, Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2010;25(7):1609–18.
- Streuli H. SLMB - Schweizer Lebensmittelbuch. Chapter. 1992; 58: 4/3.
- Tülüce Y, Lak PT, Koyuncu İ, Kilic A, Durgun M, Özkol H. The apoptotic, cytotoxic and genotoxic effect of novel binuclear boron-fluoride complex on endometrial cancer *BioMetals.* 2017;30:933-944.
- Tülüce Y, Masseh HDI, Koyuncu İ, Kiliç A, Durgun M, Özkol H. Novel fluorine boron hybrid complex as potential antiproliferative drugs on colorectal cancer cell line. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019;19:627-637
- Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(9):3004-8.
- Urgen M, Kocabaş F, Nalbantsoy A, Hames-Kocabas E, Uzel A, Bedir E. Bioassay-guided isolation of antibacterial and cytotoxic compounds from the mesophilic actinomycete M-33-5. *Nat Prod Commun.* 2010; 5(2):249-52.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxiradative stres induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160:1-40.
- Villejuif F, Levine, B. Autophagic cell death: the story of misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(12):1004–10.
- Wang S, He M, Li L, Liang Z, Zou Z, Tao A. Cell-in-cell death is not restricted by caspase-3 deficiency in MCF-7 Cells. *J Breast Cancer.* 2016;19(3):231-41.
- Yue PY, Leung EP, Mak NK, Wong RN. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *J Biomol Screen.* 2010;15(4):427-33.
- Zhao C, Zhao P, Feng B, Hou X, Zhao L. Discovery and synthesis of amino acids modified deoxycholic acid derivatives and in vitro antiproliferative evaluation. *Chem Pharm Bull.* 2017;65(3):276–83.
- Zuo J, Schmitt SM, Zhang Z, Parakash J, Fan Y, Bi C ve ark. Novel polypyridyl chelators deplete cellular zinc and destabilize the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) prior to induction of apoptosis in human prostate and breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 2012;113(8):2567-75.

ÖZGEÇMİŞ

08.03.1989 tarihinde Halep'ta doğan Huda ALHAMMUD, ilk öğrenimini 1996-2002 yılları arasında Selym Malko Curbaka İlköğretim Okulunda, orta öğrenimini 2002-2004 yılları arasında Alhayderiya Ortaokulunda, Lise Öğrenimini ise 2005-2007 yılları arası Ez Ettin Alkassam Lise Okulunda tamamlayarak mezun olmuştur. Lisans Öğrenimini 2007-2011 yılları arası Halep Üniversitesi Fen Fakültesinde Biyoloji Bölümünde tamamlayarak mezun olmuştur. 2016 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. Evli ve üç çocuk annesidir.



EKLER

EK 1. Etik Kurul Belgesi



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
KARAR FORMU



| | | |
|--|--|--------------------------|
| KARAR BİLGİLERİ | Karar No: 04 | Tarih: 09.05.2018 |
| | Prof.Dr. Yasin TULUCE sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen “Sodyum Deoksikolat Maddesinin Meme Kanser Hücre Hattında Apoptotik, Sitotoksik ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi” isimli bilimsel araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir. Araştırmacıların Yüzüncü Yıl Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun Çalışma Esasları Hakkında Yönergesinde belirtilen hususları yerine getirdikleri belirlenmiş olup, çalışmalarını ile ilgili tüm sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere, söz konusu çalışmanın gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığına, toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu/oy birliği ile karar verilmiştir. | |
| GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU | | |
| ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI | Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu | |
| BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: | Prof.Dr. Oğuz TUNCER | |

| Unvanı/Adı/Soyadı | Uzmanlık Alanı | Kurumu | Cinsiyet | | Araştırma ile ilişki | | Katılım * | | İmza |
|-------------------------------------|------------------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------|
| | | | E | K | E | H | E | H | |
| Prof.Dr. Oğuz TUNCER | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Dr. Öğr. Üyesi Şükran SEVİMLİ | Tıp Tarihi ve Etik | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Prof.Dr. Sıddık KESKİN | İstatistik Uzmanı | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Prof.Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU | Tıbbi Mikrobiyoloji | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Prof.Dr.A.Faruk KIROĞLU | KBB | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Dr. Öğr. Üyesi Abbas ARAS | Genel Cerrahi | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Dr. Öğr. Üyesi Celaleddin SOYALP | Anesteziyoloji ve Reanimasyon | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Dr. Öğr. Üyesi Numan ÇİM | Kadın Hastalıkları ve Doğum | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| Dr. Öğr. Üyesi Ramazan ÜSTÜN | Fizyoloji | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Dr. Öğr. Üyesi Oruc ALLAHVERDİYEYEV | Tıbbi Farmakoloji | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Lütfü POLAT | Eczacı | Van Polat Eczanesi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Nazlı AKTAŞ | Avukat | Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hukuk Müşavirliği | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Özge Burak DEĞER | Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye | Van Sanayici ve İş Kadınları Derneği | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Adnan SELÇUK | Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye | Van İş Geliştirme Merkezi | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Sayfa 2

| |
|---|
| Adres : Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü Van |
| Tel : 432- 2150470 |
| Faks : 432-2168352 |

EK 2. Tez Orjinallik Raporu

| | | |
|---|--|---|
|  | <p style="text-align: center;">T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü</p> |  |
| LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU | | |

| |
|--|
| Tarih: 02/08/2019 |
| <p>Tez Başlığı / Konusu: SODYUM DEOKSİKOLAT MADDESİNİN MEME KANSER HÜCRE HATTINDA APOPTOTİK, SİTOTOKSİK VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ</p> <p>Yukarıda başlığı belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 33 sayfalık kısmına ilişkin, 17/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %7 (yüzde yedi) dir.</p> <p><u>Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:</u></p> <ul style="list-style-type: none">- Kabul ve onay sayfası hariç,- Teşekkür hariç,- İçindekiler hariç,- Simge ve kısaltmalar hariç,- Gereç ve yöntemler hariç,- Kaynakça hariç,- Alıntılar hariç,- Tezden çıkan yayınlar hariç,- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) <p>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.</p> <p style="text-align: center;">Gereğini bilgilerinize arz ederim.</p> <p style="text-align: right;">HUDA ALHAMMUD Öğrencinin Adı Soyadı İmza</p> |

| | |
|---|--|
| Öğrencinin Adı Soyadı | Huda Alhammud |
| Anabilim Dalı | : Tıbbi Biyoloji |
| Öğrenci No | 159302022 |
| Programı | : <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora |
| DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Prof. Dr. Yasin Tülüçe | ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR Doç. Dr. Hasan Hüseyin ALP Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Yardımcısı |