

2018

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba YALÇINKAYA



T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Ficus carica* BİTKİSİ MEYVE EKSTRAKTININ
MG-63 KEMİK KANSERİ HÜCRE HATTINDA
APOPTOTİK İNDÜKSİYONA ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba YALÇINKAYA

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2018

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Ficus carica* BİTKİSİ MEYVE EKSTRAKTININ
MG-63 KEMİK KANSERİ HÜCRE HATTINDA
APOPTOTİK İNDÜKSİYONA ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba YALÇINKAYA

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2018

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ficus carica Bitkisi Meyve Ekstraktının MG-63 Kemik Kanseri Hücre Hattında
Apoptotik İndüksiyona Etkisi

Tuğba YALÇINKAYA

Yüksek Lisans Tezi

23/11/2018

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN

Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI

Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için
gerekten tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.
23.11.2018

Tuğba YALÇINKAYA



Canım Babama, Anneme, Kardeşlerim Abdulhalim ve Zeynep'e ithaf ediyorum....

TEŞEKKÜR

Bu teze başlarken beni her anlamda özgür bırakan, bilimsel düşünceyi yaşam biçimi olarak algılamamı sağlayan yüksek lisanstan bu yana her zaman beni destekleyen, bilgi birikimini tüm içtenliği ile paylaşan, bana hep güvenen Sayın hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN'a teşekkür gönül borcumdur. Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince her zaman değerli fikir ve önerilerinden yararlandığım, her zaman ilgi, anlayış ve destek gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER ve Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında ve deneysel sonuçları yorumlamamda değerli görüş ve deneyimlerinden yararlandığım, tez çalışmamızda kullanılan kemik kanseri hücre hattı MG-63'ü hediye eden Sayın Hocam Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI'ya ve çok değerli asistanları Betül ÖZBEK ve Gamze AVCIOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmamızın planlanmasında bilgi ve katkıları ile yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR'a, *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraksiyondan sulu fraksiyon hazırlanması, HPLC analizi deneylerinin standardizasyonu ve sonuçlarının yorumlanmasında deneyim ve bilgisini ile büyük bir özveri gösteren Kimyager Mevlana KARAKAYA, Segal Laboratuvar Müdürü Fevzi KARAKAYA ve Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'nde görev yapan Dr. Yasemin GÜREL'e en derin teşekkürlerimi sunarım. MuseTM cihazının kullanımı için her zaman ilgi ve anlayış gösteren Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'mız öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Doğan AŞIK'a, akış sitometrisi yönteminin standardizasyon işlemi ve sonuçlarının değerlendirilmesi için önemli katkılarda bulunan Tamer KAHRAMAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans kariyerim boyunca paylaştığımız, her güzel ve birikim dolu gün için, destek, hoşgörü ve yönlendirilmesiyle her zaman yanımda olan Kanser Biyolojisi Yüksek Lisans ve Doktora Programı'nda yer alan tüm arkadaşlara teşekkür ederim.

Hem yüksek lisans kariyerime başlamam için öncülük eden hem de devam etmem için gösterdikleri özveri ve destek için görev yapmış olduğum T.C. Sağlık Bakanlığı'nda ki Sayın amirlerim Dr. Ercan ÖZGÜL, Yasin YAVUZ ve Av. Erkan ÇAVUŞOĞLU'na, sevgili mesai arkadaşlarım Dilek KAVAK, Buket AYDEMİR, Mustafa ÇATAL ve Osman ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman benim için en iyiyi, en güzeli isteyen ve her koşulda desteğini esirgemeyen sevgili anneme, babama, kardeşlerim Abdulhalim ve Zeynep'e; bu mücadelede sevgisinden güç aldığım canım arkadaşım Büşra DOK DAĞDELEN ve yavrusu Ayyüce'ye; birlikteliğin, şefkatin ve özverinin kaynağı olan tüm aile fertlerime sevgi ve teşekkürlerimi sunarım, iyi ki varsınız.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kanserde Hücre Ölüm Tipleri.....	5
2.3. Apoptoz.....	6
2.3.1. Apoptozun Keşfi.....	7
2.3.2. Apoptoz Sırasında Görülen Biyokimyasal Değişiklikler.....	8
2.3.3. Apoptozun Mekanizmaları.....	10
2.3.3.1. İçsel Yolak.....	10
2.3.3.2. Dışsal Yolak.....	11
2.4. Osteosarkoma.....	13
2.4.1. Osteosarkomanın Tedavi Stratejileri ve Engelleri.....	13
2.4.2. Osteosarkomanın Tedavisinde Apoptosis.....	14
2.5. İncir.....	15
2.6. Protokateşuik Asit.....	16

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyaller	17
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	17
3.2. Yöntemler.....	21
3.2.1. <i>Ficus carica</i> Bitkisi Su Bazlı Meyve Ekstraktından Sulu Fraksiyon Hazırlaması.....	21
3.2.2. HPLC-DAD Analizi.....	22
3.2.3. Hücre Kültürü.....	24
3.2.3.1. Hücre Kültürü Medium Hazırlanışı.....	24
3.2.3.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları.....	24
3.2.3.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	25
3.2.3.4. Hücrelerin Dondurulma ve Saklama İşlemleri.....	25
3.2.3.5. Hücrelerin Çözülme İşlemleri.....	26
3.2.4. Hücre Sayımı.....	26
3.2.5. Sitotoksisite Analizi.....	27
3.2.5.1. MTT Yöntemi.....	27
3.2.5.2. LDH Yöntemi.....	29
3.2.6. TUNEL Yöntemi.....	31
3.2.7. Muse™ Cihazı ile Canlı ve Ölü Hücrelerin Evrenmesi.....	32
3.2.8. Kantitatif RT-PCR Yöntemiyle Apoptotik Gen Düzeylerinin Belirlenmesi.....	33
3.2.8.1. RNA İzolasyonu.....	33

3.2.8.2. cDNA Sentezi.....	34
3.2.8.3. DNA Konsantrasyonun Hesaplanması.....	35
3.2.8.4. qRT-PCR.....	36
3.2.9. Akış Sitometri Yöntemi ile Hücre Döngüsü Evrelerinin Belirlenmesi.....	38
3.2.10. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. <i>Ficus carica</i> Bitkisi Meyve Ekstraktı Sulu Fraksiyonu Hazırlanması.....	40
4.2.HPLC-DAD Analizi ile <i>Ficus carica</i> Bitkisi Meyve Ekstraktı Sulu Fraksiyonunda Bulunan Protokateşuik Asit Tayini.....	40
4.3. <i>Ficus carica</i> Bitkisi Meyve Ekstraktı Sulu Fraksiyonunun Hücre Hatlarında IC ₅₀ Dozajının Belirlenmesi.....	42
4.4. <i>Ficus carica</i> Bitkisi Meyve Ekstraktı Sulu Fraksiyonunun Hücre Hatlarında LDH Düzeylerinin Belirlenmesi.....	45
4.5. TUNEL Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Gözlemlenmesi.....	48
4.6. Muse™ Cihazı ile Canlı ve Ölü Hücrelerin Evrenmesi.....	53
4.7.Kantitatif RT-PCR Yöntemiyle Apoptotik Gen İfadelerinin Belirlenmesi.....	57
4.8. Akış Sitometri Yöntemi İle Hücre Döngüsü Evrelerinin Belirlenmesi.....	61
5. TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
7. KAYNAKLAR.....	74
8. EKLER.....	82

EK-1.Ulusal Bilimsel Toplantıda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özeti Basılan Bildiri.....	81
EK-2. ÖZGEÇMİŞ FORMU.....	82



ÖZET

***Ficus carica* Bitkisi Meyve Ekstraktının MG-63 Kemik Kanseri Hücre Hattında Apoptotik İndüksiyona Etkisi**

Osteosarkoma çocukluk ve ergenlik dönemini etkileyen kemik kanseridir. Osteosarkomanın tedavisinde kemoterapiye direnç büyük bir engeldir. Programlı hücre ölümü ya da apoptoz; kanser gelişiminin inaktivasyonu için önemli bir rol oynamaktadır. *Ficus carica* (*incir*)'in kanser baskılayıcı etkileri son yıllarda yapılan çalışmalarda araştırılmıştır. Çalışmamızda kemik kanseri hücre hattı MG-63 ve sağlıklı kemik hücre hattı hFOB'a *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanarak apoptotik etkisi gözlemlenmiştir. *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının içeriğindeki protokateşuik asit tayini HPLC analizi tespit edilmiştir. MTT yöntemi ile *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının sağlıklı hücrede toksik bir etkisi yokken kanserli hücreyi ölüme götürdüğünü tespit edilmiştir. Hücre hatlarına *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra membran değişimi analiz yöntemi olan LDH yönteminde anlamlı bulunurken ($p=0.030$), Annexin V metodu ile elde edilen değerlerde artış görülmesine rağmen anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir (erken apoptoz evresi $p=0.081$). TUNEL yöntemi uygulamasıyla MG-63'de DNA parçalanması histolojik olarak tespit edilmiştir. Proapoptotik genler ve kaspazların ekspresyonu qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Proapoptotik gen olan *Bak*'ın ($p=0.007$), başlatıcı ve efektör kaspazların ekspresyonundaki değişim anlamlı bulunmuştur (kaspaz-3 $p=0.000$, kaspaz-8 $p=0.028$, kaspaz-9 $p=0.030$). Analiz sonuçları *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının kemik kanseri hücre hattını hem içsel hemde dışsal yolları aktive ederek apoptoza götürdüğünü göstermiştir. Kanser hücrelerinin apoptoz sırasındaki hücre döngüsünü analiz etmek için akış sitometri yöntemi kullanılmıştır. Analiz sonucunda her iki hücre hattı içinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (G_1 evresi $p=0.976$, S evresi $p=0.131$, G_2 evresi $p=0.554$).

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, *ficus carica*, kemik kanseri

ABSTRACT

The Effect of *Ficus carica* Plant Fruit Extract on Apoptotic Induction of MG-63 Bone Cancer Cell Line

Osteosarcoma is a bone cancer that affects childhood and adolescence. Resistance to chemotherapy is a major obstacle in the treatment of osteosarcoma. Programmed cell death or apoptosis; play an important role in the inactivation of cancer development. The suppressor effects of *Ficus carica* (fig) in cancer have been investigated in recent years. In our study, apoptotic effect was observed by applying *Ficus carica* fruit extract to the bone cancer cell line MG-63 and healthy bone cell line hFOB. Protocol analysis of *Ficus carica* plant fruit extract was determined by HPLC analysis. It was found that the fruit extract of *Ficus carica* with MTT method did not have a toxic effect on the healthy cell and it led to the death of the cancer cell. The *Ficus carica* plant were found to be significant in the LDH method after the fruit extract was applied to the cell lines ($p=0.030$). DNA fragmentation in MG-63 was determined histologically by TUNEL method. Expression of proapoptotic genes and caspases were analyzed by qRT-PCR. The change in expression of the proapoptotic gene *Bak* ($p=0.007$), initiator and effector caspases was significant (caspase-3 $p=0.000$, caspase-8 $p=0.028$, caspase-9 $p=0.030$). Analysis results showed that the fruit extract of *Ficus carica* plant leads to apoptosis by activating the bone cancer cell line in both internal and external pathways. Flow cytometry was used to analyze the cell cycle of the cancer cell during apoptosis. As a result of the analysis, no significant change was observed in both cell lines (G1 stage $p=0.976$, S stage $p=0.131$, G2 stage $p=0.554$).

Keywords: Apoptosis, bone cancer, ficus carica

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
<i>Apaf-1</i>	: Apoptotik Proteaz aktive eden faktör
<i>Bcl-2</i>	: B-hücreli Lenfoma 2
CAD	: Kaspaz Aktive Edici DNaz
DMEM	: Hücre Kültürü Medyumu
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DISC	: Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DR	: Ölüm Reseptörü
Endo-G	: Endonukleaz-G
ER	: Endoplazmik Retikulum
FADD	: Fas ile İlişkili Ölüm Alanı Proteini
FBS	: Fötal Sığır Serumumu
g	: Gram
GBM	: Glioblastoma Hücre Hattı
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IC ₅₀ (I ₅₀)	: Hücrelerin Bölünmesini Yarı Yarıya İnhibe Eden Konsantrasyon
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MOMP	: Mitokondriyal Dış Membran Permabilizasyonu
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
ICAD	: İnaktif Kaspaz Aktive Edici DNaz
<i>p53</i>	: Protein 53
PS	: Fosfatidilserin
Smac	: Kaspazın İkinci Mitokondri Türevli Aktivatörü
TNF	: Tümör-nekroz Faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları.....	4
Şekil 2.2. Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Hızları	4
Şekil 2.3. Apoptoz sırasında meydana gelen morfolojik değişiklikler.....	8
Şekil 2.4. Kaspaz kaskatı.....	9
Şekil 2.5. Apoptotik yollar.....	10
Şekil 2.6. <i>Ficus carica</i> (incir).....	15
Şekil 2.7. Protokateşuik asitin moleküler yapısı.....	16
Şekil 3.1. İncir ekstraktı.....	22
Şekil 3.2. Azot altında uçurma evoperatörü.....	22
Şekil 3.3. HPLC-DAD analiz cihazı (Agilent Technologies 1200 Infinity).....	23
Şekil 3.4. Otomatik hücre sayım cihazı (Micro Counter 2100 Mini 11").....	26
Şekil 3.5. Mikroplak okuyucu spektrofotometre (MB-530).....	29
Şekil 3.6. LDH yönteminin mekanizması.....	29
Şekil 3.7. Mikroplak okuyucu spektrofotometre (Varioskan Flash 3001).....	30
Şekil 3.8. Real-Time PCR sistemi (StepOnePlus).....	37
Şekil 3.9. Akış sitometri cihazı (NovoCyte).....	38
Şekil 4.1. Protokateşuik asit standartı için kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 4.2. HPLC analizi için referans madde olarak kullanılan Protokateşuik asit 5ppm, 10ppm, 20ppm, 40ppm, 60ppm ve 100ppm konsantrasyondaki çözeltilerinin HPLC diyagramı.....	41
Şekil 4.3. <i>Ficus carica</i> bitkisi meyve ekstraktı sulu fraksiyonu HPLC diyagramı...42	
Şekil 4.4. hFOB hücre hattına <i>Ficus carica</i> bitkisi meyve ekstraktı uygulamasından önce a.10x oküler mikroskopik görüntüsü ve b. <i>Ficus carica</i> bitkisi meyve ekstraktı uygulanmadan sonra 20x oküler mikroskopik görüntüsü.....	49

- Şekil 4.5.** a.hFOB hücre hattına IC₅₀ doz ve saat aralığına uygun olarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonraki 10x oküler mikroskopik görüntüsü. b.hFOB hücre hattının TUNEL uygulamasından sonraki 10x oküler mikroskopik görüntüsü.....50
- Şekil 4.6.** a.MG-63 hücre hattına *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanmadan önce 10x oküler mikroskopik görüntüsü. b. MG-63 hücre hattına IC₅₀ doz ve saat aralığına uygun olarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonraki 10x oküler mikroskopik görüntüsü.....51
- Şekil 4.7.** MG-63 hücre hattının TUNEL uygulamasından sonraki a. 20x oküler mikroskopik görüntüsü, b. 20x floresans mikroskopik görüntüsü.....52
- Şekil 4.8.** Kontrol hücre hattı olan hFOB'un 48. Saat ve 1/100 *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonraki apoptoz düzeyinin MuseTM nokta dağılım grafikleri.....53
- Şekil 4.9.** Kanser hücre hattı olan MG-63'e 48. Saat ve 1/100 konsantrasyon *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonraki apoptoz düzeyinin MuseTM nokta dağılım grafikleri.....54
- Şekil 4.10.** Kontrol hücre hattı olan hFOB'un kontrol grubu için DNA hücre döngüsü analizi akış sitometri sonuçları.....61
- Şekil 4.11.** Kanser hücre hattı olan MG-63'ün kontrol grubu için DNA hücre döngüsü analizi akış sitometri sonuçları.....62
- Şekil 4.12.** Kontrol hücre hattı olan hFOB'un meyve ekstraktı grubu için DNA hücre döngüsü analizi akış sitometri sonuçları.....63
- Şekil 4.13.** Kanser hücre hattı olan MG-63'ün meyve ekstraktı grubu için DNA hücre döngüsü analizi akış sitometri sonuçları.....64

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Çalışmamızda kullanılan cam ve plastik sarfların listesi.....	17
Tablo 3.2. Çalışmamızda kullanılan cihazların listesi.....	18
Tablo 3.3. Çalışmamızda kullanılan kimyasalların listesi.....	19
Tablo 3.4. Kalibrasyon için stok çözeltiden hazırlanan çözeltiler.....	23
Tablo 3.5. MTT çalışması için hazırlanan plate düzeni.....	28
Tablo 3.6. LDH ve Bradford yöntemi için plate düzeni.....	30
Tablo 3.7. gDNA uzaklaştırmak için reaksiyon hazırlanması.....	34
Tablo 3.8. cDNA sentezi için kullanılan karışımın içeriği.....	35
Tablo 3.9. Çalışmada kullanılan primerler.....	36
Tablo 3.10. qRT-PCR için miks içeriği.....	37
Tablo 3.11. Toplam 20µl olarak hazırlanmış olan qRT-PCR reaksiyonu koşulları...37	
Tablo 4.1. MG-63 için zamana ve doza bağlı MTT ve IC ₅₀ değerleri.....	43
Tablo 4.2. hFOB için zamana ve doza bağlı MTT ve IC ₅₀ değerleri.....	43
Tablo 4.3. MG-63 için zamana ve doza bağlı IC ₅₀ değerleri.....	44
Tablo 4.4. hFOB için zamana ve doza bağlı IC ₅₀ değerleri.....	44
Tablo 4.5. Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63 için LDH/BRADFORD mean değerleri.....	45
Tablo 4.6. Kontrol hücre hattı hFOB hücre hattına IC ₅₀ doz ve zaman aralığına uygun olarak <i>Ficus carica</i> bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra LDH/BRADFORD mean değerleri.....	46
Tablo 4.7. Kanser hücre hattı MG-63 hücre hattına IC ₅₀ doz ve zaman aralığına uygun olarak <i>Ficus carica</i> bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra LDH/BRADFORD mean değerleri.....	47
Tablo 4.8. Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63 için Annexin V deneyine göre % apoptoz değerleri.....	53

Tablo 4.9.	hFOB'un 48.saat ve 1/100 konsantrasyonda erken apoptoz ve toplam apoptoz düzeyi ortalaması.....	54
Tablo 4.10.	MG-63'ün 48.saat ve 1/100 konsantrasyonda erken apoptoz ve total apoptoz düzeyi ortalaması.....	55
Tablo 4.11.	Muse™ cihazı ile canlı ve ölü hücrelerin evrenmesi sonucunda kanser hücre hattı ile kontrol hücre hattının grup ortalamalarının kat değişimi.....	55
Tablo 4.12.	Muse™ cihazı ile canlı ve ölü hücrelerin evrenmesi sonucunda kanser hücre hattı ile kontrol hücre hattının erken apoptotik ve toplam apoptotik grup ortalamalarının kat değişimi.....	56
Tablo 4.13.	Kontrol hücre hattı hFOB hücresinde IC ₅₀ doz ve zaman aralığına uygun olarak <i>Ficus carica</i> bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra qRT-PCR ile ölçülen apoptotik genlerin ve <i>GAPDH</i> geninin ekspresyonu.....	57
Tablo 4.14.	Kanser hücre hattı MG-63 hücresinde IC ₅₀ doz ve zaman aralığına uygun olarak <i>Ficus carica</i> bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra qRT-PCR ile ölçülen apoptotik genlerin ve <i>GAPDH</i> geninin ekspresyonu.....	58
Tablo 4.15.	Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı MG-63 hücresinde IC ₅₀ doz ve zaman aralığına uygun olarak <i>Ficus carica</i> bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra qRT-PCR ile ölçülen a.KASPAZ-3, b.KASPAZ-8, c.KASPAZ-9, d.BAD, e.BAX, f.BIM, g.BAK genlerinin ekspresyon düzeyleri.....	59
Tablo 4.16.	Kontrol hücre hattı olan hFOB'un kontrol grubu için DNA hücre döngüsü faz yüzdeleri.....	61
Tablo 4.17.	Kanser hücre hattı olan MG-63'ün kontrol grubu için DNA hücre döngüsü faz yüzdeleri.....	62

- Tablo 4.18.** Kontrol hücre hattı olan hFOB'un meyve ekstraktı grubu için DNA hücre döngüsü faz yüzdeleri.....63
- Tablo 4.19.** Kanser hücre hattı olan MG-63'ün meyve ekstraktı grubu için DNA hücre döngüsü faz yüzdeleri.....64
- Tablo 4.20.** Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63 ün meyve ekstraktı uygulanan ve uygulanmayan grup ortalamalarının akış sitometri ile hücre döngüsü analizi.....65
- Tablo 4.21.** Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63 ün grup ortalamalarının akış sitometri ile hücre döngüsü analizi.....65



1. GİRİŞ

“Kanser” vücudun herhangi bir yerinde kontrolsüz ve hızlı anormal hücre çoğlaması ile karakterizedir (1). Kanser, çağımızda mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerinden biridir (2). Osteosarkoma, ergen ve genç erişkin hasta popülasyonunun içerisinde primer kemik kanserinin en yaygın şeklidir (3). Bu durum herhangi bir kemikte gelişebilir (4) ve olgunlaşmamış kemik üretir (5). Osteosarkoma %75’i diz çevresinde ortaya çıkar (6), sıklıkla zengin kan kaynaklarına sahip distal femur (%43), proksimal tibia (%23), humerusta (%10) oluşur (7, 8). Mevcut osteosarkoma tedavi rejimi cerrahi ve yoğun çok ajanlı kemoterapi kombinasyonundan oluşur (9). Mevcut tedavi sayesinde 1970’lerden bugüne 5 yıllık sağkalım oranı %65-75’e ulaşmıştır ancak metastazik osteosarkoma hastalarının %10-30’u hayatta kalabilmektedir (10, 11).

Kemoterapi ilaçlarına direnç ve zayıf klinik sonuç osteosarkoma hastalarının yaklaşık %50’inde karşılaşılan bir durumdur (12). Ayrıca yüksek doz kemoterapi çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır ve tümör rekürensisi oluşur (3, 9). Bu nedenle osteosarkomanın temel biyolojisini, prognostik belirteçlerini ve terapötik hedeflerini belirlemek daha iyi bir tedavi anlayışı geliştirmek için gerekmektedir (12).

Sentetik ilaçlara / kemoterapiye dayanan mevcut tedavi seçenekleri kanserde sınırlı terapötik başarı sunar; çünkü bunlar son derece toksik etkiye sahiptir, pahalıdır ve hücre sinyal yolağının işleyişini değiştirmektedir (1). Doğal bileşikler, özellikle fitokimyasallar, mineraller ve vitaminler kanser yükünü azaltmak için umut verici ve pragmatik bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (1).

Bitkilerin anti-kanser özellikleri olduğu ve hatta kemoterapinin etkinliğinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (13). *Ficus carica*’nın hipoglisemik, hipokolesterolemik, hipotrigliseridemik, ve antihelmintik etkilerinin yanı sıra, kanser baskılayıcı etkileri hücre kültürü hatlarında gösterilmiştir (14-16). Gelişmiş prognoza rağmen, kemoterapiye direnç osteosarkoma tedavisinde engel teşkil

etmektedir. Hücresinin ölümünü teşvik eden sinyallerin ve etkili ajanların belirlenmesi, kemorezistant gösteren osteosarkoma hücreleri için yeni terapötik stratejiler geliştirmenin ipuçlarını sağlayabilir (13).

Kemik kanserli hücre hatları üzerinde *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının apoptotik induksiyona etkisi ile ilgili literatürde bir bilgi yoktur. Çalışmamızda kanser hücre hattının apoptotik süreçlerini belirleme amacıyla biyokimyasal ve morfolojik değişiklikleri tespit ederek *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının apoptotik induksiyona etkisini hakkında öngörü elde edilmesi amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser kelimesi ilk olarak Yunanlı hekim Hipokrates tarafından kullanılmış, mide ülserini oluşturan tümörlere “carcinoma” adı vermiştir. Yine Antik Yunan çağında kullanılan “carcinoma” kelimesi de aynı anlamı ifade eden ve kanseri tanımlayan bir başka kelimedir (17).

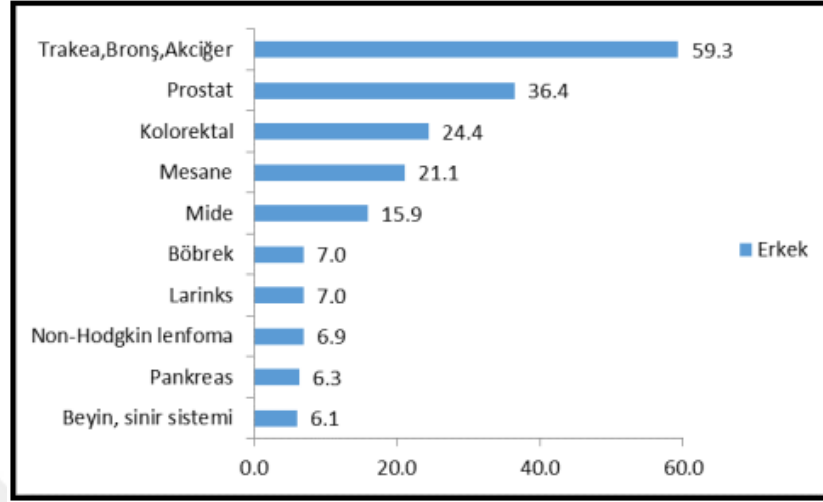
“Kanser”, hızla ve kontrolsüz anormal hücreler oluşumu ile karakterize edilen malign hastalıklar için kullanılan genel bir terimdir. Kanseri hücreler vücutta bir büyüme veya çoğalma oluşturmak için bir araya gelebilir ve ölümle sonuçlanabilir (1). Kanseri, hücrelerdeki bazı mutasyonlardan ve duyarlı hücrelerdeki diğer kalıtsal değişikliklerden kaynaklanmaktadır (18).

Kanseri, çağımızda mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerinden biridir (2). Epidemiyolojik olarak kanseri, dünya çapındaki ölümlerin sekizinden birinde sorumludur (18). Dünyadaki insanların dörtte biri yaşamının herhangi bir aşamasında kansere yakalanma riski taşımaktadır (19). Bilim adamları gerek kanseri önlemek gerekse kanseri hastaları tedavi etmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapmaktadırlar.

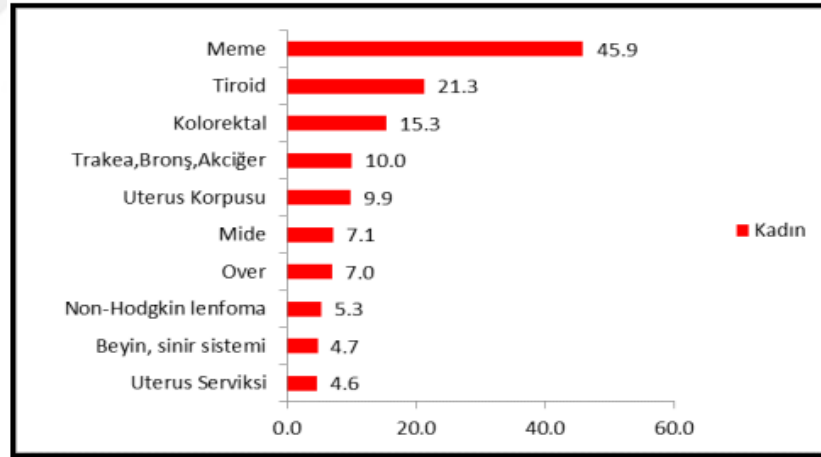
Kanseri, önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunudur. Ayrıca dünya genelinde ölümlerin nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. (20). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) paylaştığı rapora göre, 2015 yılında küresel çapta 8.8 milyon kişinin ölüm nedeni kanseri. 2014 Yılı Dünya Kanseri Kongresi'nde sunulan veriler ise hastalığın global olarak büyük boyutlara ulaştığını ortaya koymuştur (14). Kanseri; yaygınlığı, ölüm ve sakatlıklara neden olması ve ulusal ekonomiye getirdiği yük ile Türkiye'de de önemli ve öncelikli bir halk sağlığı sorunudur (20).

Ülkemizde kanseri verileri Sağlık Bakanlığı'na bağlı Kanseri Savaşı Dairesi Başkanlığı'nın 2016 yılı verilerine dayanır. En sık görülen kanseri türleri erkeklerde

akciğer, prostat, kolon, rektum, mide ve pankreas (Şekil 2.1); kadınlarda ise meme, tirod, kolorektal kanserleri (Şekil 2.2) olarak sıralanır (15).



Şekil 2.1. Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide) (15).



Şekil 2.2. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide) (15).

2.2. Kanserde Hücre Ölüm Tipleri

Hücre ölümü, hücrede oluşan aşırı hasarın bir sonucudur (1). Bu durum belirli sinyal yollarının aktifleşmesiyle gerçekleşir. Genellikle ölen hücrenin görünümü ile tanımlanan üç tip hücre ölümü vardır: apoptoz (tip I), otofajik hücre ölümü (tip II) ve nekroz (tip III) (16).

Apoptoz normal gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin sürekliliğini sağlayan bir mekanizma olabileceği gibi, aynı zamanda hastalıklı ve zararlı ajanlar tarafından hücrelerin bir çeşit savunma mekanizması olarak da karşımıza çıkabilir (16). Apoptoz; hücre küçülmesi, zardan çıkıntı oluşması ve kromatin yoğunlaşması (pyknosis) ile karakterizedir. Ayrıca, kaspaz proteazlarının aktivasyonu eşliğinde hücre ölümü olarak da tanımlanabilir. İki ana sinyal yolu apoptotik hücre ölümünü tetikler: mitokondriyal (içsel) yol ve ölüm reseptörü (dışsal) yol. İkincisi klasik bir ligand-hücre yüzeyi-reseptör etkileşimini içerir. Genel olarak ölüm reseptörleri kaynaklı hücre ölümü, bağışıklık sistemi fonksiyonu ve homeostaz için kritik önem taşır. Buna karşılık, mitokondriyal apoptotik yolunu genellikle hücre, otonom bir şekilde başlatılır. DNA hasarı veya ER stresi gibi hücresel stresler ile hücreler onarımın ötesinde hasar gördüğünde aktif olarak apoptozise girer (21).

Tersine, büyüme faktörleri tarafından aktive edilenler sinyallerin eksikliği, hücre ölümüne yol açabilir. “Sinyal kaybı” ile indüklenen hücre ölümünün bir başka örneği, epitelyal veya endotelyal hücrelerin hücre dışı matristen ayrılmasıyla ortaya çıkan, anoikis adı verilen apoptosisin özel formudur. Bu mekanizma, orijinal konumlarından ayrılan hücrelerin başka bir yerde kolonileşmesini önler (21).

Son olarak, apoptoz, kanser gelişimine karşı bir koruma mekanizması olarak onkogenler tarafından indüklenebilir. Bu işlem kısmen, onkogenin aşırı ekspresyonundan veya mutasyonundan kaynaklanan anormal mitojenik sinyallere yanıt olarak aktive edilen *p53*-bağımlı apoptotik bir yolla kontrol edilir. Sonuç olarak, apoptotik hücre ölümünün kaçırılması genellikle onkogen dönüşümünü sürdürmek için bir zorunluluktur (21).

Otofajik hücre ölümü; büyük hücre içi keseciklerin ortaya çıkması ile karakterizedir. Otofaji esas olarak bir metabolik krize yanıt veren veya hasarlı organelleri ve protein agregatlarını gideren bir hayatta kalma sürecidir. Bir stres

cevabı olarak otofaji, çoğu senaryoda hücre ölümünü teşvik etmek yerine eşlik eder ve sadece başarısız bir hayatta kalma girişimini temsil eder (21).

Nekroz hücre şişmesi ve plazma membranının bütünlüğünün bozulması ve kromatin yoğunlaşması olmadan organel yapısının kaybı ile karakterizedir. Nekroz, hücre bütünlüğünün bozulduğu gibi büyük hasarların bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Bu gibi durumlarda, hücre ölümü pasiftir ve herhangi bir belirli sinyal yolunun aktivasyonunu gerektirmez. Nekrotik morfoloji; ölü hücrelerin fagositozla sistemden temizlenemediği durumlarda, apoptotik veya otofajik bir hücre ölüm programının geç aşamalarında da görülebilir (21).

2.3. Apoptoz

Programlı hücre ölümü yani apoptoz; insan vücudundaki her hücrede bulunan temel bir hücre programıdır (22). Apoptoz, farklı morfolojik özellikleri ve enerji bağımlı biyokimyasal mekanizması ile karakterizedir (23).

Apoptoz; hücre yüzeyinde çıkıntı oluşması, hücre küçülmesi, çekirdek parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve kromozomal DNA'nın parçalanması ile karakterizedir (13, 24). Bir apoptotik hücre, yavaş yavaş apoptotik cisimlere bölünür ve enflamatuar tepkilere neden olmadan makrofajlar tarafından yutulur (13). Bu yüzden apoptotik hücreler, hücresel bileşenlerini kendilerini çevreleyen dokuya salmazlar, çevredeki hücreler tarafından hızlı bir şekilde fagosite edilirler ve fagosite edilen hücreler anti-enflamatuar sitokinler üretemezler (23).

Apoptoz; normal hücrelerin yenilenmesi, bağışıklık sisteminin düzgün gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli hücresel olayların hayati bir bileşeni kabul edilir (23). Doku homeostazı hücre ölümü ve hücre proliferasyonunun arasındaki dengenin korunmasına bağlıdır ve bu parametrelerden herhangi birinde meydana gelen değişiklikler insan hastalıklar için temel oluşturabilir (15).

Bir hücrenin yaşamını veya ölümünü modüle etme yeteneği ile apoptoz, önemli bir terapötik potansiyel olarak tanınır (19). Kanser hücreleri, karakteristik bir özellik olarak önleyici bir mekanizma olan apoptozdan kaçır. Apoptozdan kaçış sadece

kanser oluşumunu değil, aynı zamanda kanserin ilerleyişini ve tedaviye direnci sağlar (22).

Apoptozisin düzenlenmesinde rol oynayan mekanizmaların ve kanser hücrelerindeki apoptotik düzensizliklerin daha iyi anlaşılmasıyla bu hücrel programın kanser tedavisinde kullanılması için yeni fırsatlar sunabileceği düşünülmektedir (22).

2.3.1. Apoptozun Keşfi

Apoptoz (a-po-toe-sis) terimi ilk olarak 1972'de, Kerp, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır ve morfolojik olarak farklı bir hücre ölüm formunu tanımlamaktadır (23, 25, 26). Apoptoz terimi, kontrollü olarak hücrenin kendi kendine yıkımına yol açan morfolojik süreçleri tanımlamak için kullanılmıştır (26).

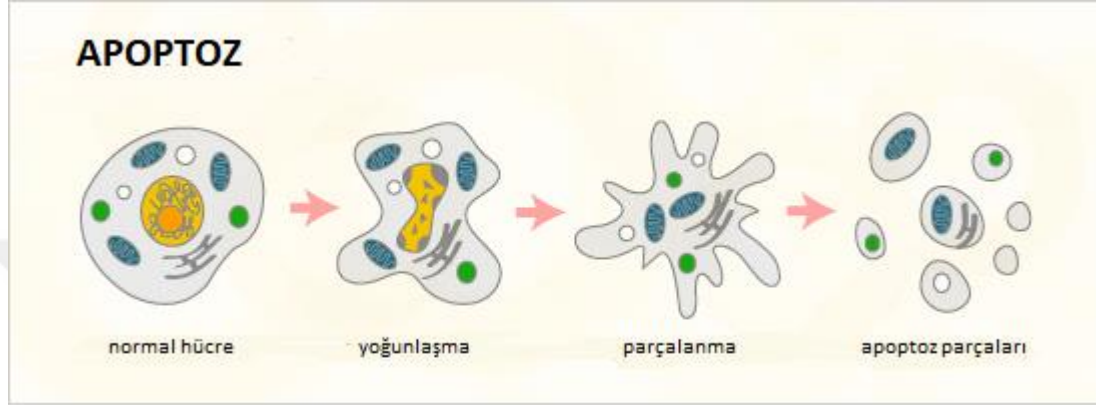
Apoptoz, çiçeklerden veya ağaçlardan düşen yapraklara benzetilerek "düşen veya düşme" anlamına gelen Yunanca kökenli bir kelime ile isimlendirilmiştir. Bu benzetme, canlı maddenin ölümünün, organizmaların yaşam döngüsünün ayrılmaz ve gerekli bir parçası olduğunu vurgular. Adı bir hücrede "apoptotik cisimlerin oluşumunun morfolojik özelliğine" atıfta bulunmaktadır (26).

Memeli hücrelerinde apoptoz sürecine dahil olan mekanizmaların anlaşılması, nematod *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimi sırasında ortaya çıkan programlanmış hücre ölümlerinin araştırılmasından doğmuştur. Bu organizmada, 1090 somatik hücre yetişkin solucanının oluşumunda üretilir, bu hücrelerin 131'i apoptoza veya "programlanmış hücre ölümü" ne maruz kalır. Bu 131 hücre, bu sistemde kayda değer doğruluk ve kontrol sergileyen, solucanlar arasında değişmez olan gelişim süreci sırasında belirli noktalarda ölmektedir. Böylece apoptoz, hücrelerin genetik olarak belirlenmiş eliminasyonunu içeren, ayırt edici ve önemli bir "programlanmış" hücre ölümü olarak kabul edilmiştir. (23).

Son yıllarda apoptoz ile ilgili yapılan yayınlarda artış olmuştur. Apoptoza bu büyük ilgi, birçok hastalığın az yada çok apoptoz içerdiğinin kabul edilmesiyle ortaya çıkmıştır. Birçok toksin ve diğer hücrel stresler de apoptozu tetikleyebilir (26).

2.3.2. Apoptoz Sırasında Görülen Biyokimyasal Değişiklikler

Apoptozda gözlenen üç ana biyokimyasal değişiklik vardır: 1) Kaspazların aktivasyonu, 2) DNA ve proteinin parçalanması ve 3) Membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınması (22).



Şekil 2.3. Apoptoz sırasında meydana gelen morfolojik değişiklikler (27).

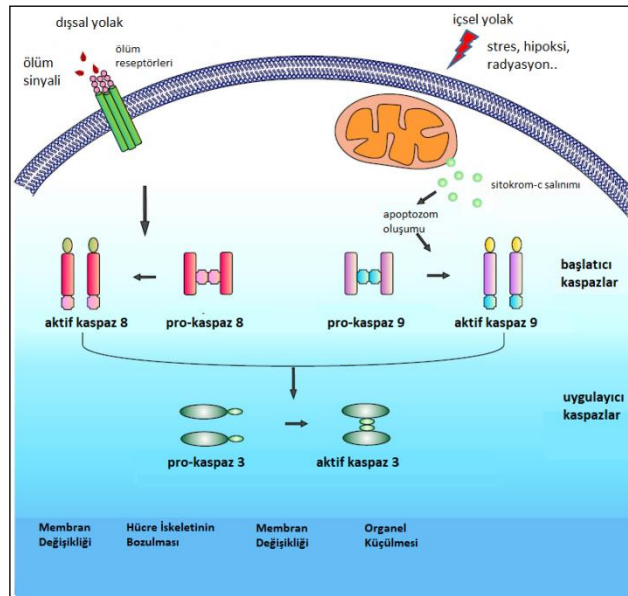
Apoptozun erken evresi sırasında, hücre ve çekirdek büzülmesi (pyknosis) görülür. Hücre büzülme ile hücreler daha küçülür, sitoplazma yoğun ve organeller daha sıkı bir şekilde paketlenmiştir. Pyknosis, kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve bu, apoptozun en karakteristik özelliğidir. Yapılan histolojik incelemelerde, apoptoz sırasında tek hücreler veya küçük hücre kümeleri görülmüştür (23).

Apoptozun erken döneminde, hücre zarının dış katmanlarında iç tabakalardan "dışarı doğru çevrilmiş" fosfatidilserin (PS) ifadesi vardır (22). PS'nin dışa doğru geçmesi, ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken tanınmasını sağlar ve pro-inflamatuar hücresel bileşenlerin salınması olmadan fagositoz ile sonuçlanır (23, 26). Bu değişim Annexin V testi ile net bir şekilde ortaya konmakta ve primer apoptozu temsil etmektedir.

Fosfatidilserin dışa doğru geçmesini, DNA'nın 50 ila 300 kilobaz büyüklüğünde parçalara ayırması izler. Daha sonra, endonükleazlar tarafından 180 ila 200 baz çiftinin katları halinde DNA'nın oligonükleozomlara inter nükleosomal bölünmesi vardır (26).

Apoptozun ileri safhasında, kaspaz adı verilen sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktivasyonu gerçekleşir (26). Kaspazlar, çoğu hücrede aktif olmayan bir proenzim formunda yaygın bir şekilde eksprese edilir ve aktive edildikten sonra bir proteaz kaskadının başlatılmasına izin vererek diğer pro-kaspazları aktive edebilir. Bu proteolitik kaskatta, bir kaspazın diğer kaspazları aktive ederek apoptotik sinyal yolunu güçlendirir ve böylece hızlı hücre ölümüne yol açar (19). Aktif kaspazlar, birçok hayati hücre proteinleri parçalamakta ve nükleer iskele ve hücre iskeletini parçalamaktadır. Ayrıca, nükleer DNA'yı daha da bozan DNaz'ı da aktive ederler. (22).

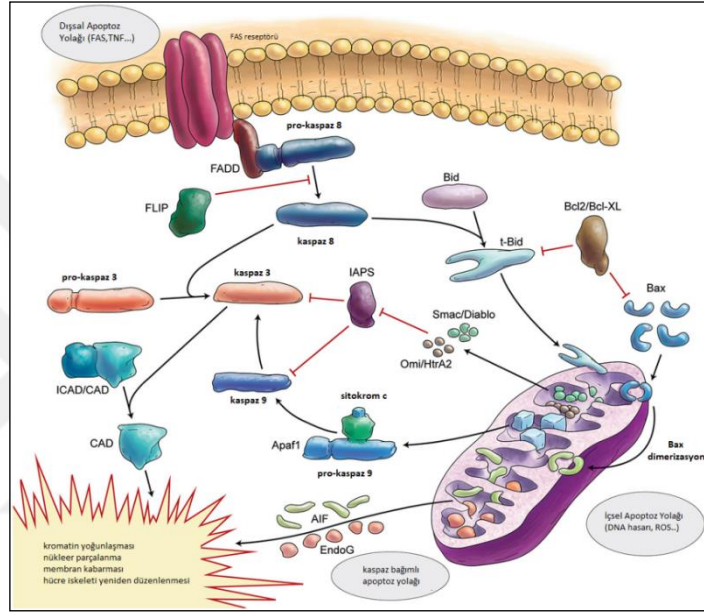
Kaspazlar proteolitik aktiviteye sahiptir ve farklı kaspazlar komşu amino asitlerin tanınmasını içeren farklı özelliklere sahip olmasına rağmen aspartik asit kalıntılarındaki proteinleri parçalayabilirler. Kaspazlar başlangıçta aktive edildiğinde, hücre ölümüne karşı geri dönüşü olmayan bir taahhüt oluşur. Bugüne kadar, başlıca büyük kaspazlar tanımlanmış ve geniş ölçüde başlatıcı kaspazlar (kaspaz -2, -8, -9, -10), efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5) olarak kategorize edilmiştir (23).



Şekil 2.4. Kaspaz kaskadı. Ekstrinsik veya intrinsik yolların birleşmesi, başlatıcı pro-kaspazları aktive eder. Aktif başlatıcı kaspazlar daha sonra efektör prokaspazları aktive eder. Efektör kaspazlar, biyokimyasal apoptotik programa aracılık etmek için çok sayıda ölüm substratı ayırır (28).

2.3.3. Apoptozun Mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları, son derece karmaşık, enerji bağımlı bir moleküler olaylar dizisini içermektedir. Bugüne kadar yapılan araştırma dışsal (ölüm reseptör) yol ve içsel (mitokondriyal) yol olmak üzere iki ana apoptotik yol olduğunu göstermektedir. Yanlız iki yolun birbirine bağılı olduğuna ve bir yoldaki moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair çalışmalar mevcuttur (13).



Şekil 2.5. Apoptotik yollar 2. Genel olarak apoptoz dışsal ve içsel yola ayrılır. Ölüm reseptörleri (FAS gibi) daha sonra kaspaz-8'i aktive edebilen dışsal yollarda yer alır. Kaspaz-8, kaspaz-3'ü iki ayrı yolla aktive eder (kaspaz-9 yoluyla direkt aktivasyon veya aktivasyon). Stres sinyalleri ve DNA hasarı mitokondri yoluyla intrinsik apoptoz yolunu tetikler. İntrinsik apoptoz (mitokondriyal apoptoz) kaspaz bağımlı veya kaspazdan bağımsız yollara ayrılır (29).

2.3.3.1. İçsel Yolak

Adından da anlaşılacağı gibi içsel (intrinsik) yol hücre içinde başlatılır (22, 30). İntrinsik apoptoz, mitokondriyal apoptoz olarak da adlandırılır çünkü mitokondriden salınan faktörlere bağılıdır (31). Apoptozu başlatan intrinsik sinyalleme yolları, hücre içindeki hedefler üzerinde doğrudan etki eden ve mitokondriyal olaylara neden olan hücre içi sinyaller üreten çeşitli bir nonreseptör aracılı uyarıcı dizisini içerir (23).

Hipoksi, genetik hasar, yüksek konsantrasyonda sitozolik Ca^{+2} iyonları, aşırı oksidatif stres, büyüme faktörlerinin yoksunluğu, hücre iskeletinin bozulması, katlanmış proteinlerin birikmesi gibi hücresel stresler mitokondriyal yolu tetikleyerek mitokondri zarının geçirgenliğini artırır (13, 23-26, 30, 31). Bu uyarıların tümü mitokondriyal geçirgenlik geçiş (MPT) gözeneklerinin açılması, transmembran potansiyelinin kaybı ve intermembran boşluktan ayrılmış proapoptotik proteinlerin mitokondriyal intermembran boşluğundan sitoplazmaya geçmesine yol açar (13).

Bcl-2 süperailesinin 2 ana grubu vardır; proapoptotik proteinler (örn; *Bax*, *Bak*, *Bad*, *Bcl-Xs*, *Bid*, *Bik*, *Bim*) ve antiapoptotik proteinler (örn; *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-W*). Mitokondriyal yol *Bcl-2* süperailesi proteinlerini proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin dengesiyle sıkı bir şekilde düzenlenir (13, 25, 30).

Bcl-2 ailesinin ana etki mekanizması, mitokondriyal dış membran permabilizasyonunu (MOMP) düzenleyerek sitokrom-c salınımını kontrol etmektir (24, 25, 30). Hücre stres sinyalleri tarafından aktive edilen mitokondriyal yolun *Bad*, *Bid*, *Bim* gibi proapoptotik proteinleri aktifleştirmesiyle mitokondriyal membranda por oluşumu indüklenir (26). Böylelikle mitokondriyon membranındaki porlardan sitokrom-c, *Smac*, *Endo-G*, Ca^{++} ve *AIF* salınımını uyarır (24, 26, 30). Sitokrom-c, oksidatif fosforilasyon için elektron taşıyıcı (23). *SMAC*, *IAF*'ı inhibe eder ve apoptozu hızlandırır (30). *IAF*'nin ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller (21). *IAF*, çekirdeğe transloke olur ve parçalara ayırır. *Endo-G* de DNA'yı parçalar (13). Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, *Apaf-1* ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur (13, 24, 26, 31). Apoptozom, kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir (26). Aktif kaspaz-3 de *ICAD*'ı inaktifleştirerek *CAD*'ı serbestleştirir (13, 19, 24). *CAD* ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (31).

2.3.3.2. Dışsal Yolak

Dışsal (ekstrinsik) apoptoz yolu, ölüm ligandlarının ve ölüm reseptörlerinin (DR) bağlanmasıyla başlatılır (13, 31). Ölüm ligandlarının hücre dışından getirdiği

sinyaller, transmembran reseptörleri aracılığıyla hücre içine iletilir (22, 23). Apoptotik sinyallerin iletimi ligandların ligasyon işlemi sonucunda aktive edilmesiyle başlar (22, 26).

DR; TNF reseptör süperailesi üyeleridir (30). Reseptör süperailesi;

- TNF-R1
- Fas/APO-1
- DR3
- TNF-1 (TRAIL-R1,DR4)
- TNF-2 (TRAIL-R2,DR5)
- DR6 (30).

Proapoptotik ligandlar, reseptörlerine özgüdür; APO2L/TRAIL (DR4,DR5), FasL (Fas,APO1,CD95), TNF (TNF-R1) (30). Ekstrinsik yolu en iyi tanımlayan olaylar dizisi, FasL/FasR ve TNF α /TNF-R1 modelleriyle karakterizedir (23). Bu modellerde reseptör kümelenmesi ve homolog trimerik ligand bağlanması olur (7, 32, 33). Bu kümelenmenin apoptotik cevabı arttırdığı düşünülmektedir (30).

TNF reseptör ailesinin üyeleri sistein bakımından zengin hücre dışı bölgeler taşıyor ve “ölüm domaini” olarak adlandırılan yaklaşık 80 aminoasitli sahip sitoplazmik bir alana sahiptir (23). Bu ölüm alanı, ölüm sinyallerinin hücre yüzeyinden hücre içine iletilmesinde önemli rol oynar (23, 25, 30).

FasL ile FasR bağlanması, adaptör protein FADD’ın ve TNF- α ile TNF reseptörünün bağlanmasıyla sağlanır (23). Sonrasında adaptör protein FADD, prokaspazlar -8 ve -10 ile birleşir ve DISC oluşturarak reseptörün intrasitoplazmik kuyruğuna eklenir (13, 23, 30). Böylece adaptör molekülleri hücre içine alınmış olur (20) ve başlatıcı kaspazlar, efektör (yürütücü) kaspazları (-3, -6, -7) aktive ederek apoptozun uygulama aşamalarını tetikler (13, 25, 26, 30).

Aktive olan kaspaz-8 ayrıca apoptozun mitokondriyal yolunu da aktive eder. *tBid*’in kaspaz-8 tarafından aktive edilmesinden sonra *tBid* mitokondriyal dış zar permabilizasyonunu başlatmak için mitokondriyal membrana translokasyon yapar. Böylece mitokondriyal zar üzerindeki diğer *Bcl-2* ailesi etkileşim yoluna girer (22, 24).

2.4. Osteosarkoma

Osteosarkoma (OS) primer kemik kanseridir (9). OS çocuklarda ve genç erişkinlerde kansere bağlı olan ölümler için ikinci sırada yer alır (3). Yıllık insidansı 1.000.000 kişide 1-3, vakaların %70-80'i yaş arasındadır. İskelet sistemindeki en yaygın malign tümör olan OS, mezenkimal dokudan kaynaklanır (7). Bu durum herhangi bir kemikte gelişebilir (6) ve olgunlaşmamış kemik üretir (32). OS %75'i diz çevresinde ortaya çıkar (6), sıklıkla zengin kan kaynaklarına sahip distal femur (%43), proksimal tibia (%23), humerusta (%10) oluşur (7,8). Tipik olarak hastalarda kemikte ağrı ve şişlik, hatta patolojik kırıklar (8). Ağrının en belirgin özelliği hastayı uykudan uyandıracak kadar yoğun olmasıdır (8). OS kadınlara oranla (4.0 milyon/yıl) erkeklerde (5.4 milyon/yıl) biraz daha sık görülen sekizinci lider pediatrik kanser olarak bilinir (5).

Etiyolojisi halen bilinmemekle birlikte oluşumu ve ilerlemesi için yaş, cinsiyet, ailesel ve genetik faktörlerin etkili olabileceği düşünülmektedir (1, 32). OS için risk faktörleri; önceki radyasyon tedavileri, Paget hastalığı, Li-Fraumeni gibi germline anormallikleri, Werner sendromu, Rothmund-Thomson sendromu, Bloom sendromu ve herediter retinoblastoması olabilir (6, 34).

2.4.1. Osteosarkomanın Tedavi Stratejileri ve Engelleri

OS tedavisi 19. yy ortalarında tıbbi literatürde tanımlanmıştır (8). 1950'lerde osteosarkomlu hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %20'den azdı (35). Bu hastaların çoğu ekstremitte amputasyonu ile tedavi edildi ve çoğu akciğer metastazı nedeniyle öldü (35). 1970'lerden bu yana, çok ajanlı kemoterapinin ortaya çıkışı OS'un tedavisi üzerine yeni bir ışık tutmuştur (35). Mevcut OS tedavi rejimi cerrahi ve yoğun çok ajanlı kemoterapi kombinasyonundan oluşur (9). Mevcut tedavi sayesinde 1970'lerden bugüne 5 yıllık sağkalım oranı %65-75'e ulaşmıştır ancak metastazik OS hastalarının %10-30'u hayatta kalabilmektedir (10, 11).

OS lokal invazyon ve yüksek metastatik potansiyeli ile karakterizedir. Metastaz için en olası bölgeler akciğerler ve diğer kemiklerdir (5). Hastaların yaklaşık %10-25'inde görülen akciğer metastazı aslında OS'dan ölümlerin en önemli nedenidir (8, 34). Hematojen metastaz erken ortaya çıkma eğilimi gösterir ve hızla ilerler (7).

Kemoterapi tedavisi sisplatin, doksorubisin ve metotreksattan oluşur (5, 36). Bu kemoterapötiklerin son 10 yıldaki çalışmalarda OS için en etkili tedavi olduğu tespit edilmesine rağmen, OS hastaları antitümör etki ve toksik yan etkilere duyarlılık açısından bu ilaçlara duyarlılık değişkenlik göstermektedir (36). Tedaviyle ilgili toksisite ve mortalite nedeniyle daha ileri tedavilere yoğunlaşmamaktadır (36). Dahası, son yıllarda dozlamayı yoğunlaştırarak, zamanlamayı değiştirerek ve çok kombinasyonel kemoterapi kullanmak suretiyle tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır fakat sağkalım oranında önemli bir iyileşme sağlanamamıştır (9). Kemoterapi ilaçlarına direnç ve zayıf klinik sonuç OS hastalarının yaklaşık %50'sinde karşılaşılan bir durumdur (37). Ayrıca yüksek doz kemoterapi çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır ve tümör rekürensisi oluşur (1, 31). Cerrahi, adjuvan kemoterapi ve radyoterpi gibi tedavi stratejilerine rağmen OS'un prognozu hala zayıftır (37). Bu nedenle OS'un temel biyolojisini, prognostik belirteçlerini ve terapötik hedeflerini belirlemek daha iyi bir tedavi anlayışı geliştirmek için gerekmektedir (12).

2.4.2. Osteosarkomanın Tedavisinde Apoptoz

Kemoterapiye direnç osteosarkom tedavisinde bir engel oluşturur. Bu nedenle, hücre ölümünü etkin bir şekilde artırmak ve kemoterapiye direncin üstesinden gelmek için bir yöntem belirlemek, osteosarkomun tedavisinde önemlidir (13).

Başarılı bir kanser terapisi, osteosarkoma kanseri hücrelerinin seçici olarak yok edilmesini gerektirir. Osteosarkoma terapilerinde hücre apoptozisini indüklemek ve dirençli osteosarkoma hücreleri duyarlı hale getirmek önemlidir. Son zamanlarda, yeni ajanlar kademeli olarak farklı araştırmacı grupları tarafından rapor edilmiştir. Gelişmiş prognoza rağmen, kemoterapiye direnç osteosarkoma tedavisinde engel teşkil etmektedir. Hücrenin ölümünü teşvik eden sinyallerin ve etkili ajanların belirlenmesi, kemorezistant gösteren osteosarkom hücreleri için yeni terapötik stratejiler geliştirmenin ipuçlarını sağlayabilir (13).

2.5. İncir

Ficus (Moraceae), dünya çapında tropik ve alttropik bölgelerde 800'den fazla ağaç, çalı, hemiepifit, dağcı ve sürüngen bulunan en büyük anjiyospermalardan birini içermektedir. Bu cins, yüksek ekonomik ve besinsel değerleri ve ayrıca yağmur ormanı ekosistemindeki biyolojik çeşitliliğin önemli bir parçası olması nedeniyle önemli bir genetik kaynaktır. Ayrıca, tropik bölgelerdeki meyve yiyen hayvanlar için iyi bir besin kaynağıdır. *F. carica*, *Ficus* cinsinin önemli bir üyesidir. Genellikle yapraksar olup genelde "incir" olarak anılır (38).

İncir (*Ficus carica*), Moraceae'nin yapraklaşmış bir ağac olup, elma ve üzüm ile birlikte en eski meyvelerden biri olarak kabul edilmektedir (9). İncir (*Ficus carica*, *Moraceae*) ürünleri Orta Doğu'da hem gıda hem de ilaç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (1, 38-41). Dünyanın pek çok yerinde subtropikal iklimlerle yetiştirilmektedir (40). İncirlerin meyveleri çiğ yenir ve kuru meyve ve reçel gibi bazı ürünlere işlenirken, incir yaprakları halk arasında tıbbi malzemeleri olarak kullanılmıştır (9).

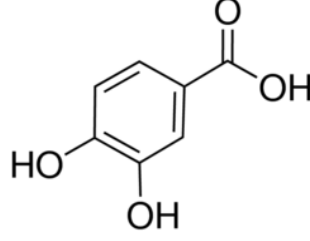
F. carica'nın kurutulmuş meyveleri önemli bir vitamin, mineral, karbonhidrat, şeker, organik asit ve fenolik bileşikler kaynağı olarak bildirilmiştir. Taze ve kurutulmuş incirler ayrıca çok miktarda lif ve polifenol içerir. Meyve, kök ve yaprakları gastrointestinal (kolik, hazımsızlık, iştahsızlık ve diyare), solunum (boğaz ağrısı, öksürük ve bronş problemleri) ve kardiyovasküler bozukluklar gibi çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek için geleneksel tıpta kullanılmaktadır (38).



Şekil 2.6. *Ficus carica* (incir) (33).

2.6. Protokateşuik Asit

Protokateşuik asit (PA), (3,4-dihidroksibenzoik asit, $C_7H_6O_4$, Moleküler Ağırlık:154.12g/mol, Erime Noktası: 205^0C) nutrasötiklerde bulunan polifenollerin geniş sınıfında bir fenolik asittir. Yağ, sebze, meyve ve çayda yaygın olarak bulunur (1).



Şekil 2.7. Protokateşuik asitin moleküler yapısı (44).

PA, *Ficus carica*'nın içeriğinde bulunan bir güçlü antioksidandır (1). Aynı zamanda farmasötik olarak antikanserojen ve kimyasal ajan olarak bilinir (42).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan cam ve plastik sarflar Tablo 3.1’de, cihazlar Tablo 3.2’de ve kimyasallar Tablo 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmamızda kullanılan cam ve plastik sarfların listesi.

Adı	Üretici Firma
Falkon Tüp (15 mL , 50 mL)	BIOLOGIX, Jinan, Çin.
Serolojik Pipet (5 mL, 10 mL)	BIOLOGIX, Jinan, Çin.
Pipet ucu (10µL, 200µL, 1000µL)	ISOLAB, Wertheim, Almanya.
Kuyucuklu plak (6, 24, 96 kuyucuk)	ISOLAB, Wertheim, Almanya.
Chamber slide	ISOLAB, Wertheim, Almanya.
Flask (T-25,T-75) Biologix, Çin.	ISOLAB, Wertheim, Almanya.
PCR plate	AXYGEN, Tewksbury, ABD.
Ependorf tüpler	BIOLOGIX, Jinan, Çin.
PCR tüpleri (0.5 mL)	AXYGEN, Tewksbury, ABD.
PCR rack (10µL, 200µL 1000µL)	BIOLOGIX, Jinan, Çin.
Sealing Film	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya.

Tablo 3.2. Çalışmamızda kullanılan cihazların listesi.

Adı	Markası ve Modeli
Azot Altında Uçurma Evoperatörü	FMS/SuperVap 6 Concentrators
Azot Üreten Azot Jeneratörü	PEAK/ LC-MS Grade
Ultasonik Banyo	Bandelin Electronic/Sonorex Digital 10 P
Vorteks	IKA/MS3
HPLC-DAD cihazı	Agilent Technologies /1200 Infinity
C ₁₈ kromatograf ayırım kolonu	Thermo Fisher Scientific/ThermoHypersil_keystone (250x4,6 mm 5µ)
Santrifüj	Hettich/ Micro 22R
+4C° Buzdolabı	Nüve/DF 490
Hücre Kültürü Kabini	Nuaire/Class 2A
Etüv	Nüve/EC 160
Su banyosu	MEMMERT/WNB 14
Mikroskop	Euromex/Oxion Inverso
Otomatik hücre sayım cihazı	Celeromics/Micro Counter 2100 Mini 11"
Mikroplak okuyucu spektrofometre	Neales/MB-530

Tablo 3.2. Devamı

Mikroplak okuyucu spektrofometre	Thermo Fisher Scientific/Varioskan Flash 3001
Muse hücre analiz cihazı	Merckmillipore/Muse Cell Analyzer
Akış sitometri cihazı	ACEA Biosciences/NovoCyte
Qubit cihazı	Invitrogen/Qubit fluorometer
PCR cihazı	Thermo Fisher Scientific/Applied Biosystems™ 7500 Fast DxReal-Time PCR Instrument, StepOnePlus Real-Time PCR System,ProFlex PCR System

Tablo 3.3. Çalışmamızda kullanılan kimyasalların listesi.

Adı	Üretici Firma
Diklorometan	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
Hekzan	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
Ethanol	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
Methanol	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
<i>Ficus carica</i> bitkisi meyve ekstraktı	Talya Bitkisel, Antalya, Türkiye
Protokateşuik asit (3,4-Dihidroksibenzoik asit)	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
Besiyeri (DMEM/Ham's F-12, with L-Glutamine)	CAPRICORN, Ebsdorfergrund, Almanya
Besiyeri (DMEM High Glucose with L-Glutamine)	CAPRICORN, Ebsdorfergrund, Almanya
FBS (Fetal Sığır Serumu)	CAPRICORN, Ebsdorfergrund, Almanya
L-Glutamin	CAPRICORN, Ebsdorfergrund, Almanya
Tripsin-EDTA solüsyonu	CAPRICORN, Ebsdorfergrund, Almanya

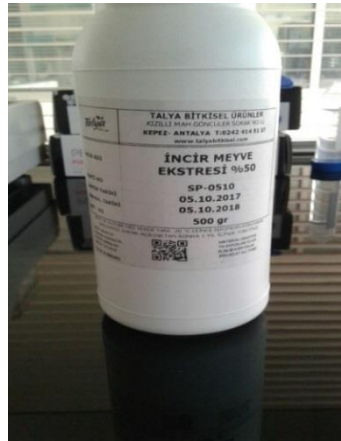
Tablo 3.3. Devamı

Hybrid-R mini kit	GENEALL Seoul, Kore
HyperScript FirstStrand cDNA Sentez Kiti	GENEALL Seoul, Kore
PBS (Phosphate buffered saline)	CAPRICORN, Ebsdorfergrund, Almanya
Tripan mavisi	CAPRICORN, Ebsdorfergrund, Almanya
RIPA tamponu	CAPRICORN, Ebsdorfergrund, Almanya
hFOB 1.19 hücre hattı	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
MG-63 hücre hattı (Prof. Dr. Leyla Didem Kozacı'nın hediyesidir.)	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
MTT Hücre Canlılığı Kiti	BIOTIUM,Fremont, ABD
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
Sitotoksosite Tespit Kiti (LDH)	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
NZYBradford Reaktif	NZYTECH, Lisboa, Portekiz
Muse Annexin V and Ölü Hücre Kiti	MERCK MILIPORE, Darmstadt, Almanya.
TUNEL Apoptoz Tespit Kiti	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
Triton-X-100	SIGMA ALDRICH, Taufkirchen,Almanya
H ₂ O ₂	Aklarkimya, Ankara, Türkiye
BSA (Sığır Serum Albumini)	CAPRICORN, Ebsdorfergrund, Almanya
Propidyum İodide	INVITROGEN, Waltham,ABD
Rnase	INVITROGEN, Waltham,ABD
Realamp SYBER Green mastermix	GENEALL Seoul, Kore
Qubit ssDNA Kiti	INVITROGEN, Waltham,ABD

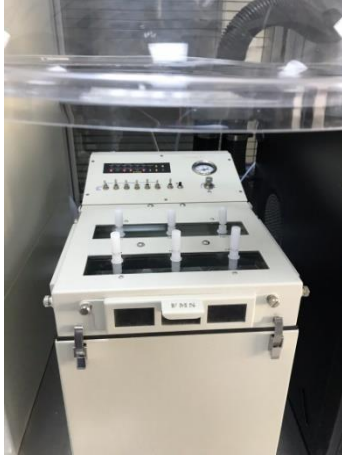
3.2. Yöntemler

3.2.1. *Ficus carica* Bitkisi Su Bazlı Meyve Ekstraktından Sulu Fraksiyon Hazırlaması

Ficus carica bitkisi meyve ekstraktı (Nante Kimya) 500 mL olarak ticari olarak temin edildi. Başlangıç hacmi olarak 50 mL olarak alınan incir ekstraktı 2 saat boyunca 70°C’de azot altında uçurma işlemine tabii tutuldu. 1:20 oranında hekzan eklenir ve ultrasonik banyoda 5 dakika sonike edildi. Ayrırma hunisi ile üst kısımda oluşan faz ayrıldı ve dipte kalan kısım 10 dakika 70°C’de azot altında uçurma işlemine tabii tutuldu. 1:20 oranında diklorometan eklendi ve ultrasonik banyoda 5 dakika sonike edildi. Ayrırma hunisi ile üst kısımda oluşan faz ayrıldı ve dipte kalan kısım 10 dakika 70°C’de azot altında uçurma işlemine tabii tutuldu. 1:20 oranında metanol eklendi ve ultrasonik banyoda 5 dakika sonike edildi. Ayrırma hunisi ile üst kısımda oluşan faz ayrıldı ve dipte kalan kısım 10 dakika 70°C’de azot altında uçurma işlemine tabii tutuldu. 1:20 oranında etanol eklendi ve ultrasonik banyoda 5 dakika sonike edildi. Ayrırma hunisi ile üst kısımda oluşan faz ayrıldı ve dipte kalan kısım 10 dakika 70°C’de azot altında uçurma işlemine tabii tutuldu. 1:20 oranında ultra saf su eklendi ve ultrasonik banyoda 5 dakika sonike edildi. Ekstraksiyon işlemleri sonucunda 15 mL incir sulu fraksiyonu elde edildi (39).



Şekil 3.1. İncir ekstraktı.



Şekil 3.2. Azot altında uçurma evoparatörü.

3.2.2. HPLC-DAD Analizi

Kromatografi, bir karışımdaki kimyasal bileşenlerin bir sabit faz ve bir hareketli faz yardımıyla ayrılması, tanınması ve tayini ile kalitatif ve kantitatif analizlerin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır ve analitik bir metottur. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) organik asitlerin ayrılmalarında ve miktar tayinlerinde, etkili metotlardır (42). Çalışmamızda HPLC, *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktındaki Protokateşuik asit tayini için kullanılmıştır. Çalışmanın bu aşamasında Protokateşuik asit kullanılmasının amacı HPLC yönteminin deneysel aşamasında standardizasyon aşamasının gerçekleştirilmesidir. Ayrıca incir total ekstresinin detaylıca incelendiği bu öncü tez çalışması tamamlanması ile elde edilecek veriler ışığında; ilerleyen çalışmalarda total incir ekstratı içerisinde etken madde adayları olabilecek Protokateşuik asit gibi spesifik moleküllere odaklanılacaktır. Böylece incir'den elde edilecek spesifik moleküllerin ilaç adayları olabilmeye yolunda devam edecek ileri çalışmalar planlanmaktadır.

Ticari olarak temin edilen Protokateşuik asit standardı ile HPLC kullanılarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı sulu fraksiyonu içerisindeki protokateşuik asit varlığı belirlenmiş ve miktarı ölçülmüştür. Protokateşuik asit standardı 5ppm, 10ppm, 20ppm, 40ppm, 50ppm, 100ppm'lik çözeltiler hazırlanmıştır. Akış hızı 5 mL/dk, kolon sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmıştır. Kromatograf ayırımı C₁₈ kolon ile yapılmıştır.

0,1 mg/mL stok çözelti hazırlandı.

Tablo 3.4. Kalibrasyon için stok çözeltilerden hazırlanan çözeltiler.

Çözeltiler	Ana stok	Saf su
5ppm	50µL	950µL
10ppm	100µL	900µL
20ppm	200µL	800µL
40ppm	400µL	600µL
50ppm	500µL	500µL



Şekil 3.3. HPLC-DAD analiz cihazı (Agilent Technologies 1200 Infinity).

3.2.3. Hücre Kültürü

Hücre kültürü besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerinin sürdürebilmek için gerekli olan çevreyi sağlayan besleyici solüsyonlardır. Besiyerlerinin içeriklerindeki aminoasit, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini destekler (43).

3.2.3.1. Hücre Kültürü Medium Hazırlanışı

Her 500 ml medium içerisinde;

- 50 ml FBS (%10)
- 5 ml PBS (%1)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (%1)
- 5 ml L-Glutamine (%1) bulunmaktadır.

Çalışmamızda hFOB hücre hattı için DMEM/Ham's F-12, with L-Glutamine, MG-63 hücre hattı için DMEM High Glucose with L-Glutamin besiyeri kullanıldı. *In vitro* deneylerde hücreler yaklaşık 2×10^5 hücre/cm² yoğunluğunda ekildi (43).

3.2.3.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları

İnsan osteosarcoma hücre hattı MG-63 ve insan osteoblast hücre hattı hFOB - 80°C'de muhafaza edilen hücreler, 37°C'de su banyosunda hücre kültürü çözüme protokolüne uygun olarak çözüldü ve 75 cm²'lik filtreli hücre kültürü flaskına aktarıldı. Hücre kültürü işlemleri ultraviyole ile sterilize edilen laminar hava akımlı çalışma kabinlerinde gerçekleştirildi (43).

Flaska aktarılan hücreler, 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem ortamındaki etüvde inkübe edilerek çoğaltıldı. Hücre hatlarındaki canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından değişiklikler mikroskopta günlük olarak izlendi. Flasklarda %80'ün üzerinde hücre yoğunluğu gözlemlendiğinde hücreler pasajlanarak çoğaltıldı (43).

3.2.3.3. Hücrelerin Pasajlanması

DMEM/Ham's F-12, with L-Glutamine ve DMEM High Glucose with L-Glutamin besiyerleri hücreleri beslemek için gerekli glukoza, hücrelerin canlılığını sürdürebilmek için uygun pH'a, hücresel fonksiyonları sürdürebilmek için gerekli aminoasit ve vitaminlere sahiptir fakat hücresel gelişim için yeterli olmayabilir. FBS hücrelerin tutunabilmesi ve çoğalabilmesi için kullanılan zengin bir protein çözeltilisidir. FBS'in içinde büyüme faktörleri, hormonlar, enzimler, yüzeye tutunmayı sağlayan proteinler vardır. Hücrelerin pasajlanması esnasında kullanılan enzim tripsindir. Tripsin hücrelerin yüzden ayrılmasını sağlar. Hücre kültürü sırasında kontaminasyon riskini önlemek amacıyla bütün uygulamalar kabin içinde yapıldı (43).Hücre kültürü uygulama basamakları;

Hücreler inkübatörden çıkarılır ve mikroskopta incelenir. Flasktaki eski medium boşaltıldı. Steril PBS ile flask yıkanır, sonrasında PBS uzaklaştırıldı. Tripsin eklendi. (kullanılan flaskın büyüklüğüne göre 3-6 mL arasında). Hücreler inkübatöre kaldıldı. 2-7 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübatördeki hücreler mikroskopta incelenir ve hücrelerin flask yüzeyden ayrıldığından emin olduktan sonra eklenen tripsin miktarının yaklaşık 3 katı kadar besiyeri flaska eklendi. Hücre sayısını hesaplamak için 60µL tripan mavisi ile 40µL tripsin-medium karışımı süspansiyon edilerek mikroskop altında sayıldı ya da hücre sayım cihazında alan taranarak sayım yapıldı. Hücre süspansiyonu 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pelet kısmı hücre besiyeri ile çözülerek bir sonraki deney aşamasına uygun olarak yeniden ekim yapıldı (43).

3.2.3.4. Hücrelerin Dondurulma ve Saklama İşlemleri

Flask yüzeyine yapışan hücrelerin tripsin-EDTA solüsyonu ile flask yüzeyinden ayrılması sağlandı ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tripsin-EDTA'nın uzaklaştırılması ile elde edilen pelet, 1 mL medium ilave edildikten sonra hücre sayımı yapıldı. Sayım işleminden sonra tripsin-EDTA miktarının en az iki katı kadar tam besiyeri eklenerek süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu falkona aktarıldı. Hücre süspansiyonu 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi. Pelet kısmına 900µl tam besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldı. %20 DMSO ve %20 FBS içeren bir besiyeri

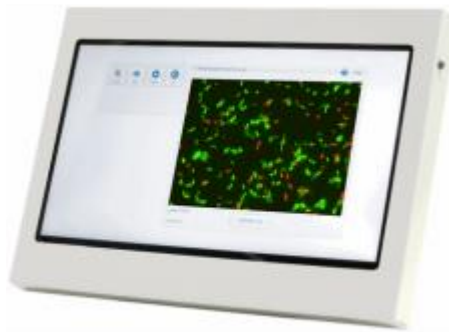
hazırlandı ve 900 μ L hücre süspansiyonuna eklendi. Hücre süspansiyonu kryo vial tüpler içine alındı ve kademeli olarak donduruldu. -80°C derin dondurucu veya sıvı azot tankı içerisinde muhafaza edildi (43).

3.2.3.5. Hücrelerin Çözülme İşlemleri

Azot tankı içerisinde muhafaza edilen hücreler, 37°C'deki su banyosunda, içerisinde %10 miktarında buz kalacak şekilde çözüldü. Steril falkona 7-9 mL tam besiyeri konuldu. Dondurma tüpü içerisindeki hücre süspansiyonu, falkona aktarıldı. Hücre süspansiyonu 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen pelet, tam besiyeri ile çözüldü ve pipetaj yapıldı. Flaska aktarılan hücreler, mikroskop altında incelendikten sonra etüvde inkübe edildi (43).

3.2.4. Hücre Sayımı

Çalışmamız süresince iki şekilde hücre sayımı yapıldı. Sayım için Celeromics (Micro Counter 2100 Mini 11") hücre sayım cihazı kullanıldı. Ayrıca manuel sayım için 10 μ l hücre süspansiyonu ve 90 μ L tripan mavisi ile karıştırılır, lam üzerine konularak 5 bölgedeki hücreler sayıldı. Bulunan hücre sayısı miktarı 50.000 ile çarpıldığında çıkan sonuç 1 mL mediumda kaç milyon hücre olduğunu gösterir.



Şekil 3.4. Otomatik hücre sayım cihazı (Micro Counter 2100 Mini 11").

3.2.5. Sitotoksisite Analizi

Çalışmamızda sitotoksisite analizi için MTT ve LDH yöntemi uygulanmıştır.

3.2.5.1. MTT Yöntemi

MTT-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT), tetrazolyum tuzudur ve Mosmann tarafından hücre canlılığının ve proliferasyonun ölçülmesi, hücre popülasyonunun dış faktörlere tepkisinin sayısal tahlilinde *in vitro* temel oluşturmak için önerilmiştir (44). Yöntem MTT ajanın hücrelere eklendikten sonra inkübasyona bırakılarak meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanır. Oluşan renk değişikliği, sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının, canlı hücrelerin mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Böylece, bu bileşiklerin absorpsiyon değeri ile metabolik olarak aktiviteleri orantılı olduğu için belirlenebilir.

MTT ajanının uygulanmasından 1 gün önce 96'lık plak içerisindeki her kuyucuğa 5000 hücre olacak şekilde 100µL kültür mediumu ile hücreler ekildi. Mikroplak hücreler yüzeye tutunana kadar (bizim hücrelerimiz için 24 saat yeterli oldu) 37°C, %5 CO₂ koşullarındaki inkübatörde bekletildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra, dilüe edilmiş incir bitkisi sulu fraksiyonu hücrelere uygulandı. Biz çalışmamızda 6 doz ve 3 tekrarlı olarak hazırlamış olduğumuz *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı sulu fraksiyonunu, her kuyuya toplam hacim 300µL olacak şekilde uygulandı (45).



Şekil 3.5. Mikroplak okuyucu spektrofotometre (MB-530).

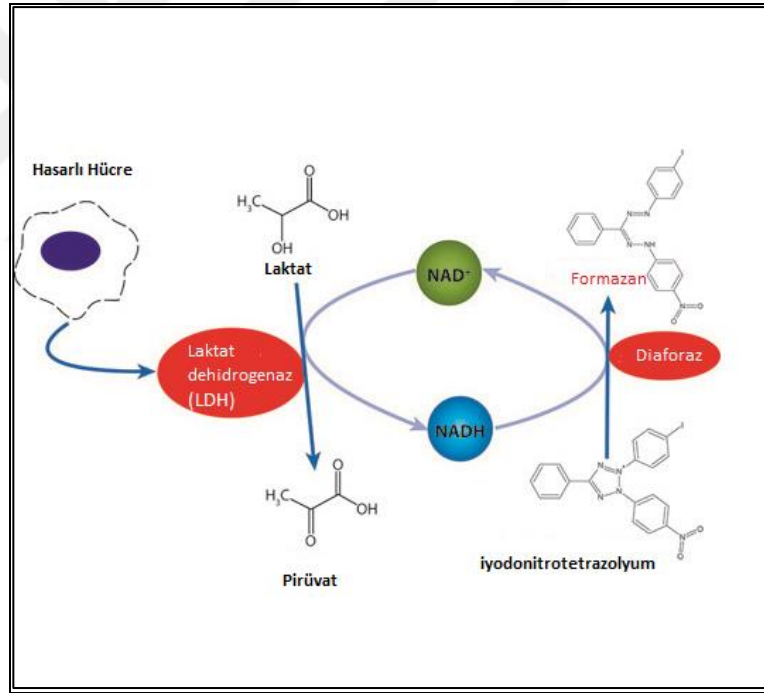
Tablo 3.5. MTT çalışması için hazırlanan plate düzeni.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)
B	BESİYERİ (300 µL)	MG-63 1:10	MG-63 1:10	MG-63 1:10	hFOB 1:10	hFOB 1:10	hFOB 1:10	hücre + besiyeri				BESİYERİ (300 µL)
C	BESİYERİ (300 µL)	MG-63 1:100	MG-63 1:100	MG-63 1:100	hFOB 1:100	hFOB 1:100	hFOB 1:100	hücre + besiyeri				BESİYERİ (300 µL)
D	BESİYERİ (300 µL)	MG-63 1:1000	MG-63 1:1000	MG-63 1:1000	hFOB 1:1000	hFOB 1:1000	hFOB 1:1000	hücre + besiyeri				BESİYERİ (300 µL)
E	BESİYERİ (300 µL)	MG-63 1:10000	MG-63 1:10000	MG-63 1:10000	hFOB 1:10000	hFOB 1:10000	hFOB 1:10000	H ₂ O ₂ + besiyeri				BESİYERİ (300 µL)
F	BESİYERİ (300 µL)	MG-63 1:100000	MG-63 1:100000	MG-63 1:100000	hFOB 1:10000	hFOB 1:10000	hFOB 1:10000	H ₂ O ₂ + besiyeri				BESİYERİ (300 µL)
G	BESİYERİ (300 µL)							H ₂ O ₂ + besiyeri				BESİYERİ (300 µL)
H	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)	BESİYERİ (300 µL)

Çalışmamızda her saat dilimi için Tablo 3.5’deki plate düzeni uygulandı ve çalışmamızda 0. Saat, 12. Saat, 24. Saat, 48. Saat, 72. Saat dilimi olmak üzere 5 saat dilimi uygulandı. Uygun saat diliminde 96’lık plak kuyucuklarında bulunan mediumdan 100µL uzaklaştırılarak MTT analizine başlandı. 96’lık plak kuyucuklarında kalan 200µL hücre-medium süspansiyonuna hazırlanan olan 10µL MTT solüsyonu eklendi. 3 saat 37°C, %5 CO₂, %95 nem ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, kuyucuklardan 200 µL hücre-medium süspansiyonu çekilerek 200µL DMSO eklendi. DMSO ekleme işleminden sonra hücreler, mikropalak okuyucu spektrofotometre ile 570nm’de absorbans değeri ölçümler yapıldı. Microsoft Excel programı ile 3 tekrarlı olarak yapılan ölçüm işleminin ortalaması alındı ve bu doğrultuda bir sonraki deney basamağı için uygun saat ve doz miktarı tespit edildi (45).

3.2.5.2. LDH Yöntemi

LDH (Laktat dehidrogenaz) etkinliğinin ölçümü, hücre ölümü ve hücre lizisinin sayısal değerlendirilmesi için kullanılan kolorimetrik bir testir. Hasarlı hücrelerden salınan, sitozolik, laktat dehidrogenaz (LDH) enzimini kantitatif olarak ölçer (46). Biz çalışmamızda LDH yöntemini Bradford yöntemi ile birlikte değerlendirdik. Bradford metodu, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm’de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanır ve bu sayede örnek içerisindeki protein konsantrasyonu kantitatif olarak gösterilebilir (47). Çalışmamızda iki yöntemi birlikte değerlendirilip birim protein başına düşen enzim miktarı hesaplanarak ölçüm yapılmıştır.



Şekil.3.7. LDH yönteminin mekanizması (48).

Tablo 3.6. LDH ve Bradford yöntemi için plate düzeni.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	hFOB 1:10 24 saat	hFOB 1:10 24 saat	hFOB 1:10 48 saat	hFOB 1:10 48 saat	hFOB 1:10 72 saat	hFOB 1:10 72 saat	MG-63 1:10 24 saat	MG-63 1:10 24 saat	MG-63 1:10 48 saat	MG-63 1:10 48 saat	MG-63 1:10 72 saat	MG-63 1:10 72 saat
B	hFOB 1:100 24 saat	hFOB 1:100 24 saat	hFOB 1:100 48 saat	hFOB 1:100 48 saat	hFOB 1:100 72 saat	hFOB 1:100 72 saat	MG-63 1:100 24 saat	MG-63 1:100 24 saat	MG-63 1:100 48 saat	MG-63 1:100 48 saat	MG-63 1:100 72 saat	MG-63 1:100 72 saat
C	hFOB 1:1.000 24 saat	hFOB 1:1.000 24 saat	hFOB 1:1.000 48 saat	hFOB 1:1.000 48 saat	hFOB 1:1.000 72 saat	hFOB 1:1.000 72 saat	MG-63 1:1.000 24 saat	MG-63 1:1.000 24 saat	MG-63 1:1.000 48 saat	MG-63 1:1.000 48 saat	MG-63 1:1.000 72 saat	MG-63 1:1.000 72 saat
D	hFOB 1:10.000 24 saat	hFOB 1:10.000 24 saat	hFOB 1:10.000 48 saat	hFOB 1:10.000 48 saat	hFOB 1:10.000 72 saat	hFOB 1:10.000 72 saat	MG-63 1:10.000 24 saat	MG-63 1:10.000 24 saat	MG-63 1:10.000 48 saat	MG-63 1:10.000 48 saat	MG-63 1:10.000 72 saat	MG-63 1:10.000 72 saat
E	hFOB 1:100.000 24 saat	hFOB 1:100.000 24 saat	hFOB 1:100.000 48 saat	hFOB 1:100.000 48 saat	hFOB 1:100.000 72 saat	hFOB 1:100.000 72 saat	MG-63 1:100.000 24 saat	MG-63 1:100.000 24 saat	MG-63 1:100.000 48 saat	MG-63 1:100.000 48 saat	MG-63 1:100.000 72 saat	MG-63 1:100.000 72 saat
F	DMEM	hFOB kontrol 24 saat	hFOB kontrol 48 saat	hFOB kontrol 72 saat	MG-63 kontrol 24 saat	MG-63 kontrol 48 saat	MG-63 kontrol 72 saat					
G												
H												

Deneyde hücre kültürü işlemleri sırasında toplanan medium kullandı. Tablo 3.6'da görüldüğü gibi 67 kuyucuğa işlem uygulandı. LDH kitinin protokolüne uygun olarak içerisindeki 1 no'lu şişeden kuyucuk başına 2.5µL, 2 no'lu şişeden kuyucuk başına 11.25µL eklenecek şekilde alınarak karıştırıldı. Kuyulara 1:1 oranında miks ve medium eklendi. 30-60 dakika oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edildi. 492nm'de absorbans ölçüm gerçekleştirdi (49). Aynı plate düzeni Bradford deneyinde kullanıldı. Bradford deneyi için; 10µL mediuma 200µL Bradford çözeltisi eklendi. Bradford deneyi için 595nm'de absorbans değeri ölçüldü (50). Spektrofotometrik ölçüm sonrasında Bradford değerleri LDH değerlerine oranlandı.



Şekil 3.7. Mikroplak okuyucu spektrofotometre (Varioskan Flash 3001).

3.2.6. TUNEL Yöntemi

TUNEL yöntem, apoptoza giden hücreleri in vivo olarak boyamayı ve değerlendirmeyi sağlar. TUNEL yöntemi; son yirmi yıl içinde dokularda hücre ölümünü değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Programlanmış hücre ölümü olan hücreler, TUNEL yönteminde pozitif boyanır, çünkü bu method çift iplik DNA'ların kopmasının tespit eder. Bu yöntem 3'OH uçlarında floresan UTP'lerin dahil edilmesine ve saptanmasına dayanır. Bu yöntem yaygın olarak "TdT-dUTPnick-end-labelling" sözcüklerinin kısaltılması olan "TUNEL" yöntemi adıyla anılmaktadır (51).

Hücre kültürü ve MTT yöntemine uygun meyve ekstraktı uygulaması yapıldıktan sonra işleme başlandı. TUNEL yöntemi için TUNEL tespit kiti kullanıldı. Hücre ekimi için chamber slide lam kullanıldı. Kuyucuğa kontrol için işlemiden 3 saat önce DMSO, H₂O₂ uygulandı. Besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Lam, kuyucuk başına 1 mL PBS uygulanarak 15 sn bekletildi ve 2 kez yıkandı. Kuyucuk başına 200µL %100 metanol eklenerek -20°C'de 15 dakika bekletildi. Metanol kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Kuyucuk başına 1 mL PBS uygulanarak 15 sn bekletildi ve 2 kez yıkandı. Her kuyucuğa %0,2 Triton X-100 içeren 1 mL PBS eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Her kuyucuk 1 mL PBS ile 2 kez yıkandı. Her kuyucuğa 100µL Equation Buffer ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 50µL Tunel Reaction Buffer + 1µL enzim eklendi. 3. kuyu Tunel Reaction Buffer eklendi, enzim eklenmedi. 37°C'de 80 dakika nemli ve karanlık ortamda inkübe edildi. %0,1 Triton X-100 + 5 mg/mL BSA + PBS ile hücreler 3 er kez yıkandı. Her solüsyon eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Yıkama işleminden sonra eksitasyon dalga boyu 450-500nm ve tarama dalga boyu 515-565nm olmak üzere floresans mikroskobunda incelendi (52).

3.2.7. Muse™ Cihazı ile Canlı ve Ölü Hücrelerin Evrenlenmesi

Sitotksisite yöntemleri sonuçları doğrultusunda hücrelerin primer ve sekonder apoptozunu belirlemek için bu yöntem kullanılmıştır. Bunun için Muse™ Annexin V ve Ölü Hücre Kiti kullanıldı.

Annexin V, normal olarak hücre zarının iç yüzüne lokalize olan bir membran bileşeni olan fosfotidil serin (PS) için yüksek bir afiniteye sahip olan bir kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayıcı proteindir (53).

Apoptotik yolun başlangıcında, PS molekülleri, Annexin V'nin bunları kolayca bağlayabildiği hücre zarının dış yüzeyine translokasyona uğrar (53).

Muse™ Annexin V ve Ölü Hücre Testi, apoptotik hücrelerin dış membranındaki PS'yi saptamak için Annexin V kullanır. Hücre zarının yapısal bütünlüğünün bir göstergesi olarak ölü bir hücre markeri de kullanılır.

3 tekrarlı olacak şekilde kontrol ve meyve ekstraktı uygulanacak hücreler plağa ekim yapıldı. Uygulama için IC₅₀ dozuna göre uygun saat ve dozda meyve ekstraktı uygulaması yapıldı. Besiyeri pipet yardımı ile ortamdan uzaklaştırıldı. Besiyerinin ortamdan uzaklaştırılmasından sonra her kuyuya 1'er mL Tripsin eklendi. Tripsin eklenmesiyle inkübatöre kaldırılan hücreler 5 dk inkübe edildi (2 dk da bir mikroskopta hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı kontrol edilebilir). Hücreler yüzeyden kalktıysa üzerine tripsinin etkisini gidermek için tripsin miktarının yaklaşık 3 katı kadar besiyeri eklendi, bir kaç defa besiyeri pipet yardımıyla yıkandı. Ependorf tüplere alınan hücre süspansiyonu 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi. Tripsinin pipet yardımı ile uzaklaştırılması ile dipte pelet durumunda kalmış olan hücrelere 37°C'de 1 mL besiyeri eklendi. Hücreler homojenize olana kadar vortekslendi. Hücre sayımı yapıldı. (Muse yönteminde en fazla 500.000 hücre uygulamaya alınmalıdır). 0,1 mL besiyeri hücre süspansiyonu anneksin V uygulaması için başka ependorf tüplere alındı. Annexin V için ayrılmış olan 100µL besiyeri-hücre süspansiyonuna 100µL Anneksin V reagent eklendi. Pipetaj ve vortexleme işlemi yapıldı. Karanlıkta, oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. Muse hücre analiz cihazı ile analiz edildi (54).

3.2.8. Kantitatif RT-PCR Yöntemiyle Apoptotik Gen Düzeylerinin Belirlenmesi

Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR); hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir (55).

Kantitatif PCR (qPCR); PCR ürünleri nicel olarak ölçmek için kullanılır. Aynı zamanda real-time PCR cihazı ile gerçek zamanlı olarak gen ekspresyonunun miktarsal değişimi gözlemlenebilir. Bu nedenle, elektroforez aşamasına ihtiyaç duyulmaz. PCR reaksiyonu sırasında gen ekspresyonlarına bağlı olarak floresan sinyalinde değişim gözlemlenir ve bu değişimler RT-PCR cihazında anlık olarak gözlemlenebilir (55).

qPCR reaksiyonlarında farklı floresans boyalar kullanılmakla birlikte, yaygın olarak SYBER Green ve TaqMan kullanılır (55). Bu çalışmada, PCR ürünlerini işaretlemek için SYBER Green metodu kullanılmıştır.

Gerçek zamanlı PCR; gen ifadesini ölçülmesi, microRNA ve noncoding RNA analizi, SNP genotipleme, kopya numarası türevlerinin tespiti, nadir mutasyonlarının tespiti, genetiği değiştirilmiş organizmaların tespiti, vb.gibi çok çeşitli uygulamalara sahiptir (55).

3.2.8.1.RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için Hybrid-R mini kit ve HyperScript FirstStrand cDNA Syntesis Kit kullanıldı.

Besiyeri ve hücrelerin süspansiyonunda 500µL ependorf tüpe alındı. 750µL Riboex eklendi. Alt üst edildikten sonra, oda sıcaklığında 5 dk bekletilir, böylece riboex'in etki göstermesi sağlandı. 200µL kloroform eklenerek faz oluşumu sağlandı. Alt üst edilerek 2 dk bekletildi. 4°C 12000g devirde 15 dk santrifüj edildi (~11000 rpm).

Üst faz çekilerek ayrı bir ependorfa alındı (yaklaşık ~1 mL RNA fazı elde edildi). Üzerine 1:1 oranında RB1 eklendi. (Total 1mL RNA olduğu için 500 µL olacak şekilde 2 ependorf hazırlandı. 700µL'si pipetaj yapılarak Type F kolona alındı. Oda sıcaklığında 10000g devirde 30 sn santrifüj yapıldı. Kolondan collection tüplere süzülen süzüntü döküldü. SW1 500µL eklendi. 10000g devirde 30 sn oda sıcaklığında santrifüj edildi, collection tüpler biriken süzüntü döküldü. 500µL RNW eklenir. 10000g'de 30 sn oda sıcaklığında santrifüj edildi, collection tüpler biriken süzüntü döküldü. Tekrar santrifüj edildi, altında biriken süzüntü ile birlikte collection tüpler atıldı. Kolonlar ependorf tüplerlere yerleştirdi. 50µL RNAaz free water eklendi. Bu kolona tutunan RNA'nın ependorfa aktarılmasını sağlandı. 1 dakika 10000g'de santrifüj edildi. -20°C'de PCR aşaması olana kadar muhafaza edildi (56).

3.2.8.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi GeneAll HyperScriptFirst Strant Synthesis Kit kullanıldı.

MG-63/hFOB (2 örnek tipimiz vardı, kontrollerle birlikte 4 örnek için çalışma yapıldı. Her biri için 6 tüp yapıldı). Öncelikli olarak genomik DNA'yı uzaklaştırmak için Tablo 3.7'de gösterildiği gibi 14µL olacak şekilde reaksiyon hazırlandı.

20µL reaksiyon karışımı için 2µL RNA kullanıldı. cDNA'nın ilk zincir sentezi

- Tabloda belirtilen şekilde karışım nükleaz içermeyen tüp içerisinde hazırlandı.
- Yavaşça karıştırıldı ve santrifüj edildi.

Tablo 3.7. gDNA uzaklaştırmak için reaksiyon hazırlanması.

Karışım	Miktar (µL)
RNA	2
Nuclease free water	9,5
dNTP mix.	1
Oligo dT primer	0,75
Random Hexamer	0,75
Toplam	14

ProFlex Thermal Cycle PCR'da 65°de 5 dakika inkübe edildi. Ardından 1 dakika boyunca buz üzerine konuldu. Tablodaki bileşenler karışıma eklendi.

Tablo 3.8. cDNA sentezi için kullanılan karışımın içeriği.

Karışım	Miktar (µl)
HyperScript ters transkriptaz enzimi	1
10x RTase Buffer	2
0.1M DTT	2
RNase inhibitörü	1

Her bileşeni eklendi, hafifçe karıştırdı ve kısa santrifüjleme yapıldı. Aşağıdaki gibi ProFlex Thermal Cycle'da inkübe edilerek cDNA oluşturuldu (57).

Thermal cycler koşulları;

55°de 60 dakika

85°C'de 5 dakika

3.2.8.3. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

DNA'nın miktarını ölçmek amacıyla Qubit ssDNA assay kit kullanılarak, 260 nm dalga boyunda Qubit Flowsitometri cihazında optik dansite ölçülerek hesaplandı.

İlk aşamada Qubit ssDNA reaksiyon karışımı ve ssDNA tamponundan oluşan 1:200 oranındaki çalışma solusyonu hazırlandı. Bu solusyon; her bir örnek için 1µL reaksiyon karışımı ve 199µL tampon içermektedir. Standart eğri oluşturmak üzere 3 adet standartın hazırlanması için 3 adet ependorf tüpünün içerisine bu çalışma solusyonundan 190µL ve 10µL'de standart solusyonu eklendi. Her bir standart tüp Qubit 2.0 Fluorometre içerisine yerleştirilerek ölçümü yapıldı ve standart grafiği elde edildi. Daha sonra, her bir örnek için hazırlanan ependorf tüplerinin içerisine 199µL hazırlanan solusyondan ve 1µl DNA örneğinden alınıp, 2-3 saniye vortekslendi. Tüm tüpler 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra Qubit 2.0 Fluorometre içerisine yerleştirilip ölçümleri yapıldı (55).

3.2.8.4. qRT-PCR

ACTB, *GAPDH* (referans gen) ve apoptotik genler olan *Bax*, *Bad*, *Bim*, *Bak*, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9 primer dizileri Sentegen (Türkiye) tarafından dizayn edildi.

Tablo 3.9. Çalışmada kullanılan primerler.

Gen	No		Oligonükleotid Dizisi	Tm (°C)
BAX	NM_001291428	Sense Primer	AGCAAAGTGGTGCTCAAGGC	58
		Anti-Sense Primer	CCACAAAGATGGTCACTGTC	52
BAD	NM_004322	Sense Primer	CCGAGTGAGCAGGAAGACTC	58
		Anti-Sense Primer	GGTAGGAGCTGTGGCGACT	58
BIM	NM_138621	Sense Primer	ACAGAGCCACAAGACAGGAG	56
		Anti-Sense Primer	CCATTGCACTGAGATAGTGGTTG	57
BAK	NM_001188	Sense Primer	TTTTCCGCAGCTACGTTTTT	54
		Anti-Sense Primer	TGGTGGCAATCTTGGTGAAGT	55
kaspaz-3	NM_004346	Sense Primer	ATGGAAGCGAATCAATGGAC	53
		Anti-Sense Primer	AGTTTCTGAATGTTCCCTGAG	54
kaspaz-8	NM_033355	Sense Primer	GATGTTATTCCAGAGACTCCAG	54
		Anti-Sense Primer	GGTAGGTAATCAGCAAATCCA	52
kaspaz-9	NM_001229	Sense Primer	GGCTCTTCCTTTGTTTCATCTCC	56
		Anti-Sense Primer	TCACCAAATCCTCCAGAACCA	55
ACTB	NM_001101	Sense Primer	CTGTGCTATCCCTGTACGCC	57
		Anti-Sense Primer	CCATCTCTTGCTCGAAGTCCA	58
GAPDH	NM_002046	Sense Primer	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	58
		Anti-Sense Primer	TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT	62

GAPDH (referans gen) ve apoptotik genler olan *Bax*, *Bad*, *Bim*, *Bak*, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz 9 mRNA düzeyleri, SYBER Green kullanılarak StepOnePlus Real-Time PCR sistem ile ölçüldü. qRT-PCR için Tablo 3.10'da belirtilen karışım hazırlanıp Tablo 3.11'de belirtilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi (59).

Tablo 3.10. qRT-PCR için miks içeriği.

Karışım	Miktar (μL)
2x SYBR qPCR Master Mix	10
ROX	1
Primer (Forward)	0,8
Primer (Reverse)	0,8
water	5,4
cDNA	2
Toplam	20

Tablo 3.11. Toplam 20 μl olarak hazırlanmış olan qRT-PCR reaksiyonu koşulları.

	SICAKLIK	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
İlk denatürasyon	95°C	10 DAKİKA	1
Denatürasyon	95°C	15 SANİYE	40
Annealing\ Uzatma	60°C	1 DAKİKA	
Algılama (tarama)			
Melting	95-60°C	1 DAKİKA 30 SANİYE	1

Çalışmanın sonuçları Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument ile 520nm’de analiz edilmiştir.



Şekil 3.8. Real-Time PCR sistemi (StepOnePlus).

3.2.9. Akış Sitometri Yöntemi ile Hücre Döngüsü Evrelerinin Belirlenmesi

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Akış sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir. Akış sitometrinin temel yaklaşımı; hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granüleritesi açısından değerlendirilmesidir. Bu amaçla hedeflenen yapı ya da hücre önce floresan madde ile işaretli bir antikor veya özel bir boya (nükleik asitlere özel propidyum iyodür) kullanılarak işaretlenir (60).



Şekil 3.9. Akış sitometri cihazı (NovoCyte).

Plate ekilmiş olan hücrelerin besiyeri pipet yardımı ile ortamdan uzaklaştırıldı. Platedeki kuyucuk sayısına göre (eğer 12 kuyu ise 1 mL, 6 kuyu ise 2 mL) tripsin eklendi. Tripsin eklenen hücreler 37°C'de 5' inkübe edildi. 2' sonunda hücreler yüzeyden ayrılmış mı diye mikroskop altında incelendi. Hücreler plate yüzeyinden ayrıldıktan sonra, tripsin etkisini gidermek için tripsin miktarının 3 katı kadar besiyeri eklendi. Pipetaj yapıldı. Hücreler hızlı bir şekilde sayıldı. (Yaklaşık 1.000.000 hücre olacak şekilde besiyeri ile sulandırıldı.) Annexin V işlemi için gerekli olan miktarsa hücre ayrıldı. Santrifüj edildi (1500 rpm 5 dk). Süpernatant kısmı atıldı. Pelet kısmına PBS eklendi. (1.000.000 hücre başına 1 mL PBS) Hücreler birkaç kez pipetlendi ya da hafifçe vorteksledi. Santrifüj edildi (1500 rpm 5 dk). Süpernatant kısmı atıldı. Pelet kısmına PBS eklendi (1.000.000 hücre başına 1 ml PBS). Santrifüj edildi (1500 rpm 5 dk). Süpernatant kısmı atıldı. Hücreler orta hızda vortekslenirken damla damla 1 mL %70 IceCold eklendi. Boyama işlemine başlamadan önce +4°C'de en az saat yarım saat, en fazla 3 gün bekletildi. (Daha

uzun süreli bekletilecekse -20°C 'ye alınmalıdır). Santrifüj edildi (300g 5 dk). Süpernatant kısmı atıldı. 1 mL PBS eklenir. Santrifüj edilir (300 g 5 dk). Süpernatant kısmı atıldı. RNase eklendi. (Toz RNase ise 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, hazır süspanse edilmiş RNase ise 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (50 μL ekledik). 15-20 dakika 37°C 'de inkübe edildi. PI eklendi. ((10 μL PI + 190 μL PBS) x örnek sayısı). 15-20 dakika 37°C 'de inkübe edildi. Pipetaj yapılarak okuma aşamasına geçildi (61).

3.2.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar IBM SPSS istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada LDH yöntemi sonuçları 48.saat'de 5 farklı konstantasyonun dağılımında apoptotik hücreler Anova testi ile incelenmiştir. Analiz sonuçları test istatistiği ve p değeri verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edilmiştir. Annexin V tespiti ile canlı ve ölü hücrelerin evrenlenmesinde apoptotik hücreler, qRT-PCR sonuçları, akış sitometrisi ile hücrelerin hücre döngüsünde sayıları Independent sample t test ile değerlendirilmiştir.

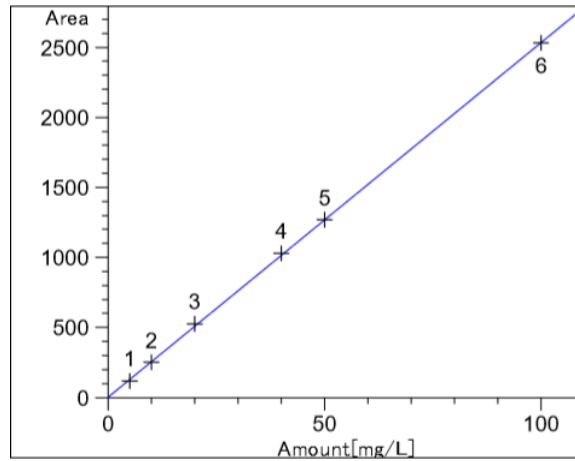
4.BULGULAR

4.1. *Ficus carica* Bitkisi Meyve Ekstraktı Sulu Fraksiyonu Hazırlanması

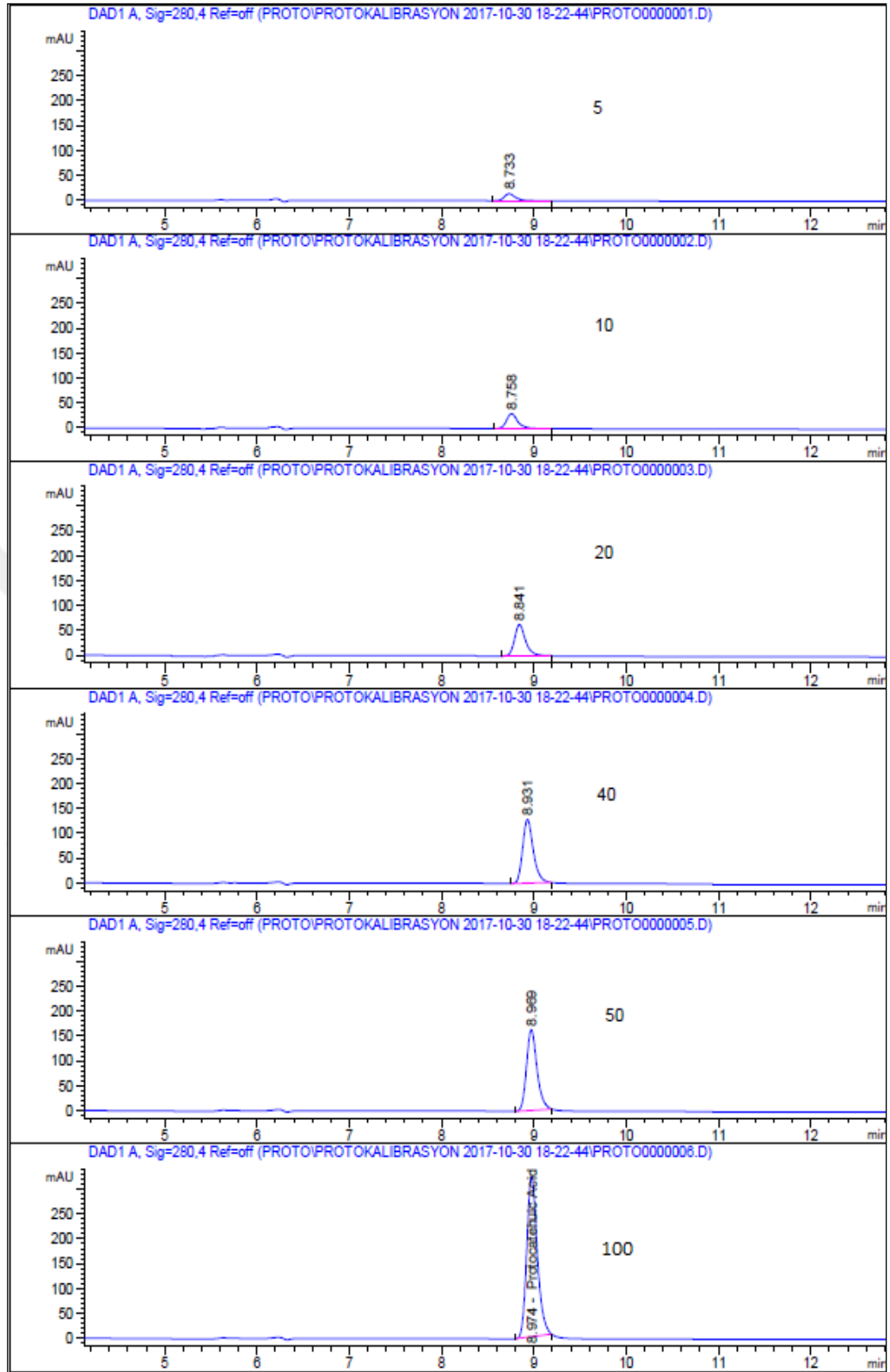
Ticari olarak elde edilen *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı, su bazlı olarak ekstrakte edilmiştir. HPLC-DAD analizi için sulu fraksiyon olarak hazırlanarak içeriğindeki organik maddelerin çözülmesi için çeşitli alkollerle muamele edilmiştir.

4.2.HPLC-DAD Analizi ile *Ficus carica* Bitkisi Meyve Ekstraktı Sulu Fraksiyonunda Bulunun Protokateşuik Asit Tayini

Ficus carica bitkisi meyve ekstraktı için bir standart madde olan Protokateşuik asit varlığı ve miktarı HPLC cihazı ile belirlenmiştir. HPLC-DAD (Diyot yayma dedektörü) kullanılmıştır. Protokateşuik asit standartı 5ppm, 10ppm, 20ppm, 40ppm, 50ppm olarak 100ppm'lik stok çözeltiden hazırlanarak Şekil 4.1.'de gözlemlenen kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Akış hızı 5 mL/dk'ya, kolon sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmıştır. Mobil faz olarak % 0,1 trifloroasetik asit (asetonitril içerisinde), % 0,1 trifloroasetik asit (metanol içerisinde) hazırlanmıştır.

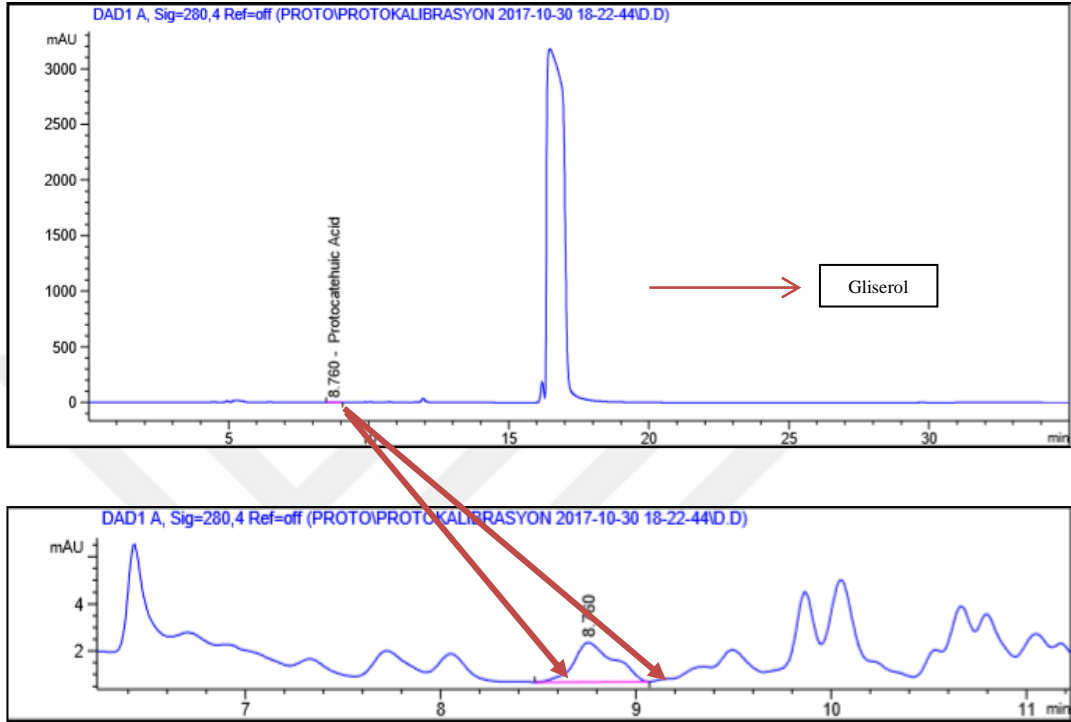


Şekil 4.1. Protokateşuik asit standartı için kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.2. Protokateşuik asit standartı 5ppm, 10ppm, 20ppm, 40ppm, 60ppm ve 100ppm konsantrasyonlarının HPLC diyagramı.

Yapılan HPLC-DAD analizi sonucunda Şekil 4.3’de ki HPLC diyagramında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı sulu fraksiyonu içerisinde 8.17063×10^{-1} mg/L olarak bulunduğu ortaya konmuştur.



Şekil 4.3. *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı sulu fraksiyonu HPLC diyagramı.

4.3. *Ficus carica* Bitkisi Meyve Ekstraktı Sulu Fraksiyonunun Hücre Hatlarında IC₅₀ Dozajının Belirlenmesi

HPLC analizini ardından dozaj belirleme çalışmalarına geçilmiştir. 96 kuyucuklu plaka ile dozaj aralıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Daha önce belirtmiş olduğumuz hücelere farklı doz ve farklı saat aralıklarında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı sulu fraksiyonu uygulanmıştır. MTT işlemi sonucunda mikropalak okuyucu spektrofotometre cihazıyla canlılık ölçülerek yaklaşık IC₅₀ değeri belirlenmiştir.

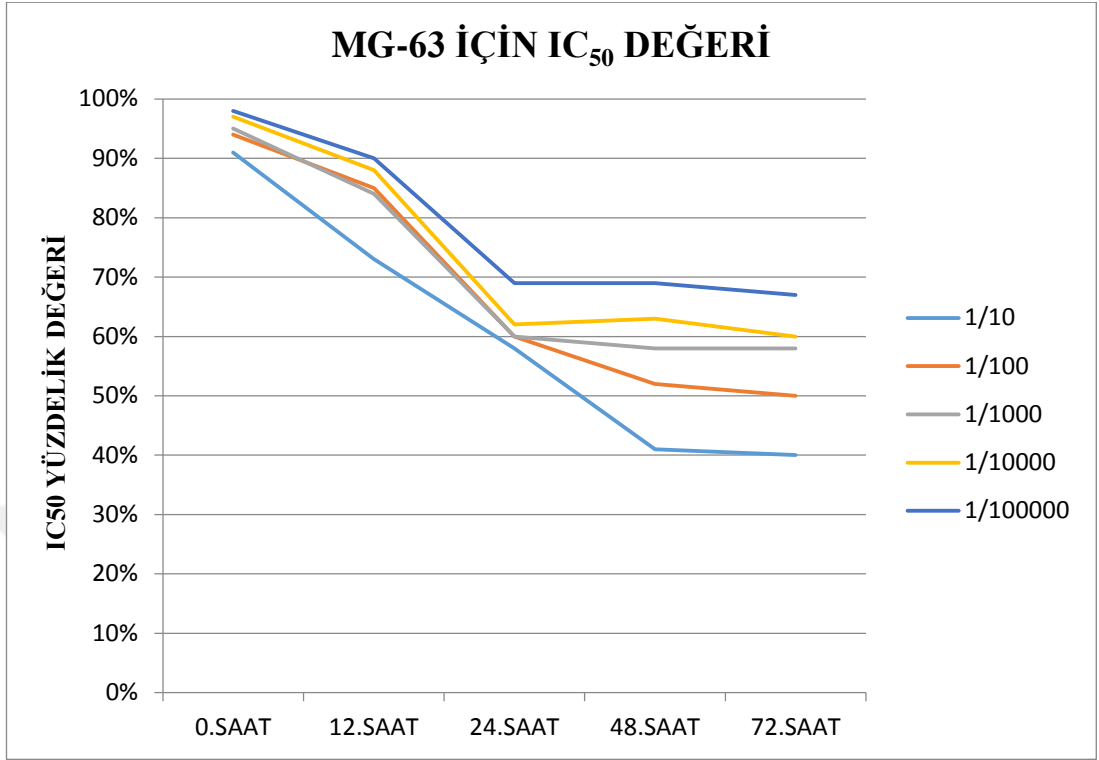
Tablo 4.1. MG-63 için zamana ve doza bağlı MTT ve IC₅₀ değerleri.

	MG63							
	1/1	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000	NC	BLANK
0.SAAT	1,375	2,265	2,328	2,348	2,390	2,411	2,452	0,381
	48%	91%	94%	95%	97%	98%		
12.SAAT	1,151	1,854	2,110	2,089	2,174	2,217	2,430	0,298
	40%	73%	85%	84%	88%	90%		
24.SAAT	1,036	1,530	1,573	1,573	1,616	1,766	2,431	0,285
	35%	58%	60%	60%	62%	69%		
48.SAAT	0,932	1,145	1,357	1,473	1,570	1,686	2,285	0,352
	30%	41%	52%	58%	63%	69%		
72.SAAT	0,739	0,996	1,167	1,303	1,337	1,457	2,021	0,312
	25%	40%	50%	58%	60%	67%		

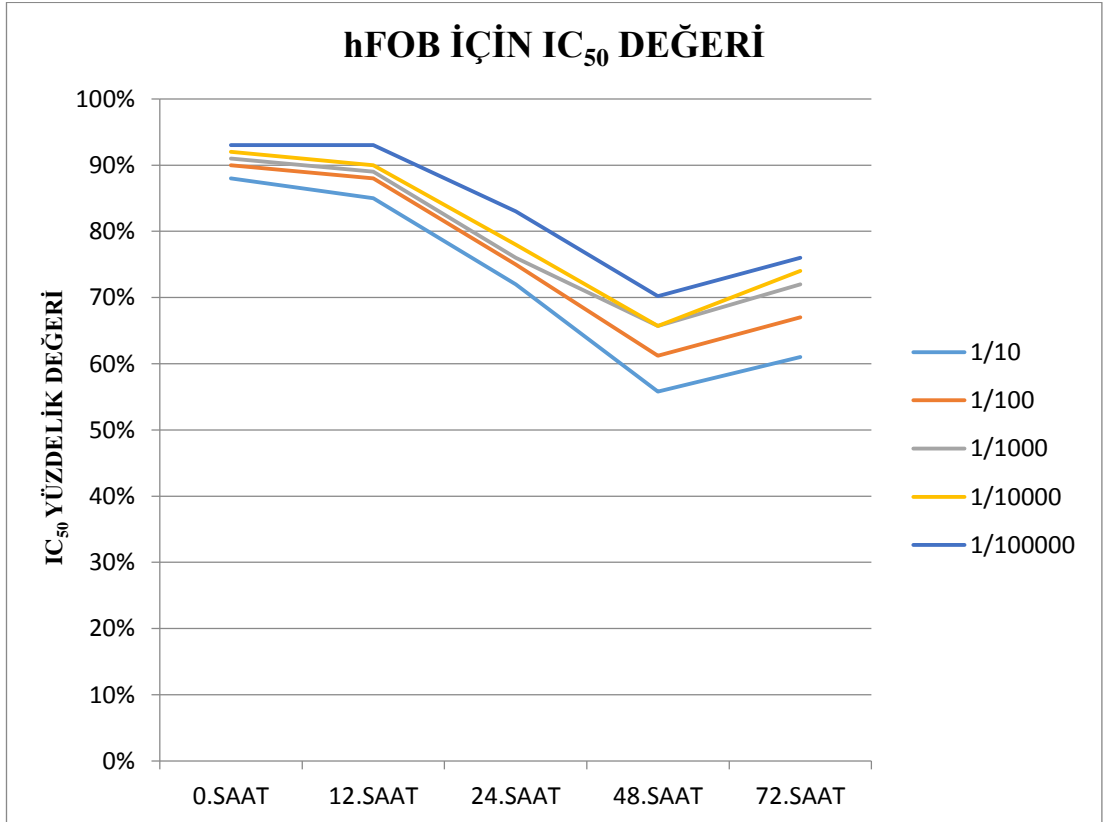
Tablo 4.2. hFOB için zamana ve doza bağlı MTT ve IC₅₀ değerleri.

	HFOB							
	1/1	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000	NC	BLANK
0.SAAT	1,845	2,191	2,234	2,256	2,278	2,299	2,451	0,285
	72%	88%	90%	91%	92%	93%		
12.SAAT	1,803	2,129	2,194	2,216	2,238	2,303	2,455	0,280
	70%	85%	88%	89%	90%	93%		
24.SAAT	1,593	1,786	1,850	1,871	1,914	2,021	2,385	0,244
	63%	72%	75%	76%	78%	83%		
48.SAAT	1,335	1,412	1,528	1,625	1,625	1,721	2,361	0,215
	52%	56%	61%	66%	66%	70%		
72.SAAT	1,316	1,499	1,609	1,701	1,738	1,775	2,215	0,380
	51%	61%	67%	72%	74%	76%		

Tablo 4.3. MG-63 için zamana ve doza bağlı IC₅₀ değerleri.



Tablo 4.4. hFOB için zamana ve doza bağlı IC₅₀ değerleri.



Tablo 4.1. Ve Tablo 4.3.'den anlaşılacağı gibi *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı sulu fraksiyonu MG-63 hücre hattı üzerinde %50 canlılığa ulaştığı doz 1:100, saat aralığı 48. saat olarak bulunmuştur. Tablo 4.2. Ve Tablo 4.4.'de gözlemlendiği gibi hFOB hücre hattı için herhangi bir doz ve saat aralığında canlılık %50 azalmadığı için sonraki deneylerde hFOB hücre hattına kanser hücre hattımız olan MG-63 ile aynı doz ve saat aralığında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı sulu fraksiyonu uygulanmıştır.

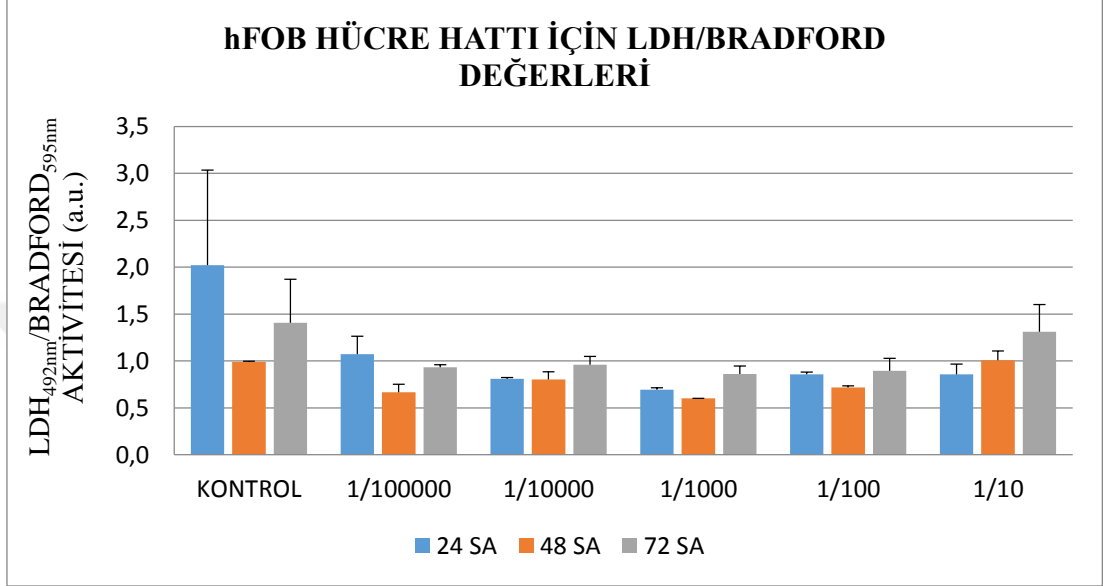
4.4. *Ficus carica* Bitkisi Meyve Ekstraktı Sulu Fraksiyonunun Hücre Hatlarında LDH Düzeylerinin Belirlenmesi

Hücre ölümü sırasında açığa çıkan LDH miktarı nicelendirmek için LDH ve Bradford yöntemi kullanılmıştır.

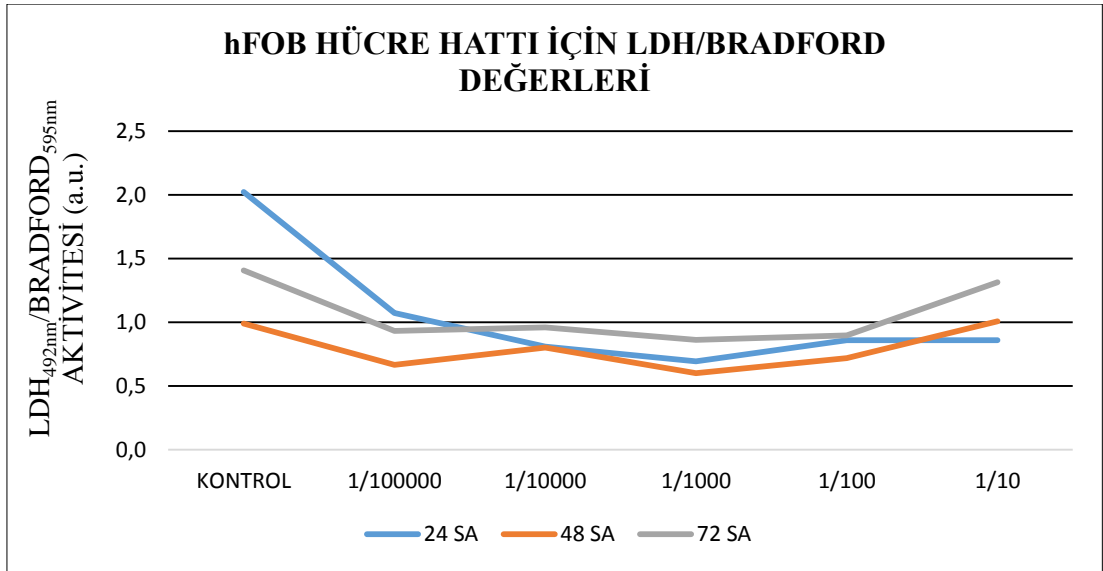
Tablo 4.5. Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63 için LDH/BRADFORD mean değerleri. Ölçümler 3 farklı zaman aralığı (24 saat, 48 saat, 72 saat) ve 5 farklı konsantrasyonda (1/100000, 1/10000, 1/1000, 1/100,1/10) yapılmıştır.

		KONTROL	1/100000	1/10000	1/1000	1/100	1/10
MG-63	24SA	1,499	0,669	0,580	0,712	0,900	1,109
	48SA	0,953	0,854	1,165	0,718	0,902	2,565
	72SA	1,313	1,266	1,300	1,561	1,826	1,877
hFOB	24 SA	2,022	1,072	0,809	0,694	0,858	0,858
	48 SA	0,990	0,665	0,802	0,601	0,719	1,007
	72 SA	1,405	0,932	0,959	0,861	0,897	1,312

Tablo 4.6. Kontrol hücre hattı hFOB hücre hattına IC₅₀ doz ve zaman aralığına uygun olarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra LDH/BRADFORD mean değerleri. Ölçümler 3 farklı zaman aralığı (24 saat, 48 saat, 72 saat) ve 5 farklı konsantrasyonda (1/100000, 1/10000, 1/1000, 1/100, 1/10) yapılmıştır. mavi; 24.saat, turuncu; 48.saat, gri;72.saat. (a) histogram grafiği (b) çubuk grafiği.



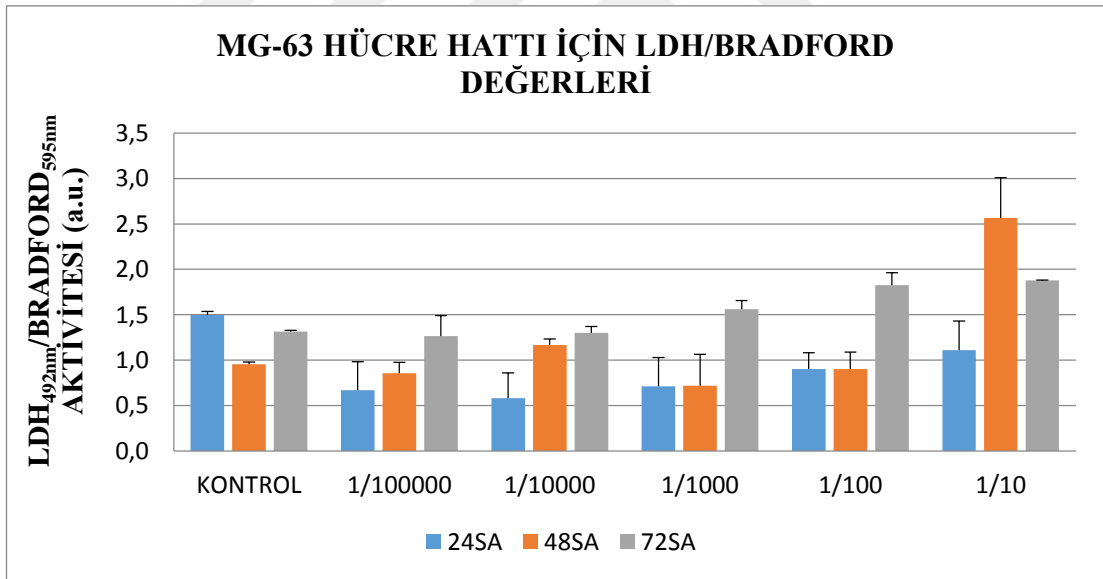
(a)



(b)

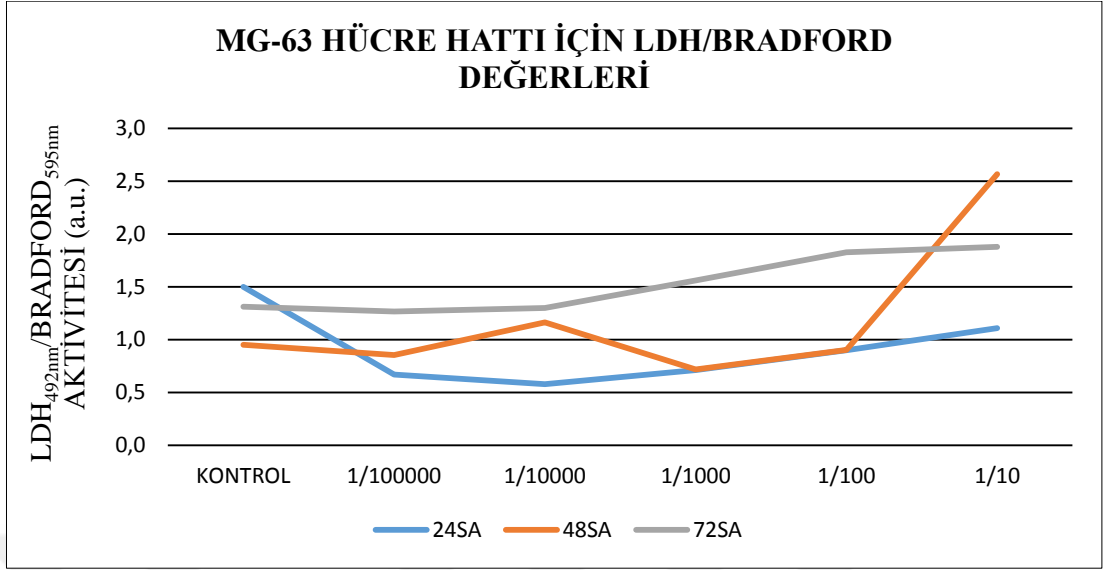
hFOB hücre hattına, farklı doz ve zaman aralığında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanmıştır. Çalışma 2 tekrarlı olarak yapılmıştır. IC₅₀ zaman aralığı olarak 48. Saat belirlenmiş olduğu için istatistiksel çalışmamız aynı zaman aralığı için yapılmıştır. Tablo 4.6'da gözlemlendiği gibi değerler arasında farklılık gözlenmezken, yapılan deneye göre uygulanan farklı dozlardan elde edilen sonuçlar arasında hFOB hücrelerinde 1/10 (p=0.367) 1/100 (p=0.215), 1/1000 (p=0.126), 1/10000 (p=0,230), 1/100000 (p=0.291) konsantrasyonlarında birim protein başına salınan LDH miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05).

Tablo 4.7. Kanser hücre hattı MG-63 hücre hattına IC₅₀ doz ve zaman aralığına uygun olarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra LDH/BRADFORD mean değerleri. Ölçümler 3 farklı zaman aralığı (24 saat, 48 saat, 72 saat) ve 5 farklı konsantrasyonda (1/100000, 1/10000, 1/1000, 1/100, 1/10) yapılmıştır. mavi; 24.saat, turuncu; 48.saat, gri;72.saat. (a) histogram grafiği (b) çubuk grafiği.



(a)

Tablo 4.7'nin devamı

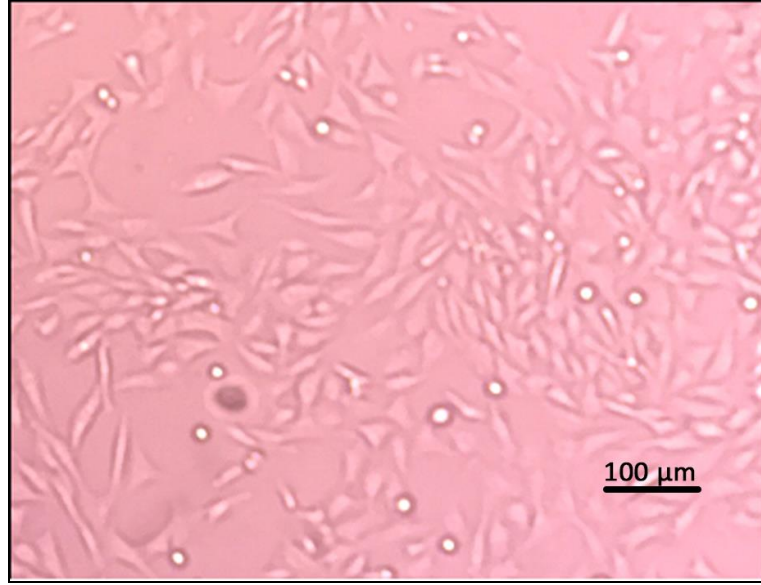


(b)

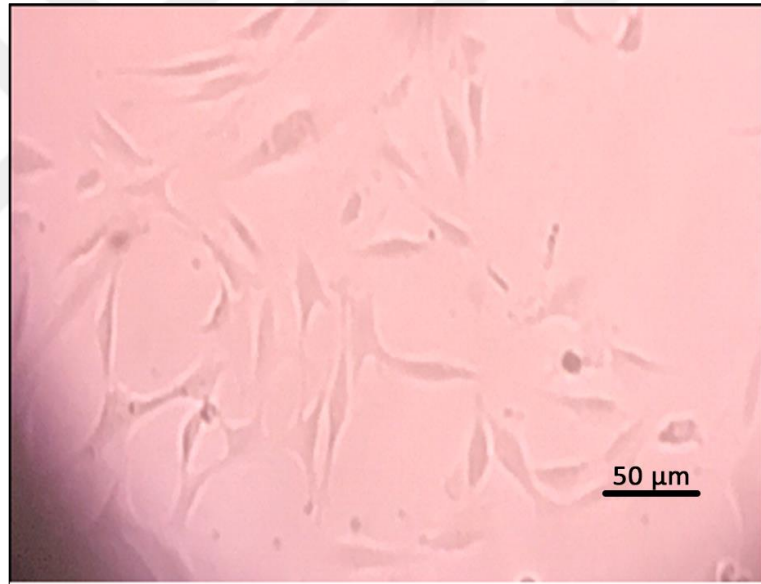
MG-63 hücre hattına, farklı doz ve zaman aralığında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanmıştır. Çalışma 2 tekrarlı olarak yapılmıştır. IC₅₀ zaman aralığı olarak 48. Saat belirlenmiş olduğu için istatistiksel çalışmamız aynı zaman aralığı için yapılmıştır. LDH yöntemi uygulanmasından sonra MG-63 hücre hatlarında LDH miktarının birim proteine oranla doğrusal olarak arttığı Tablo 4.7'de gözlemlenmiştir. Bu doğrusal artış 48. Saatte 1/100 (p=0.071), 1/1000 (p=0.490), 1/10000 (p=1.000), 1/100000 (p=0.998) konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). İstatistiksel analiz sonucunda 1/10 (p=0.049) konsantrasyonunda anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0.05).

4.5. TUNEL Yöntemi ile Apoptotik Etkinin Gözlemlenmesi

TUNEL yöntemi çalışmamızda apoptozun histolojik olarak görüntülenmesi amacıyla yapılmıştır. Hücrelerin IC₅₀ değerlerine uygun olan doz ve saat aralığında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra TUNEL yöntemi uygulanmıştır.

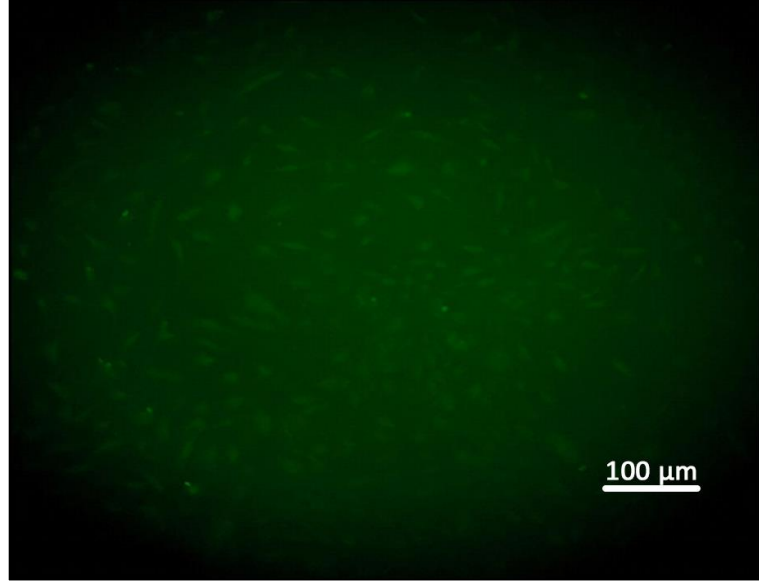


(a)

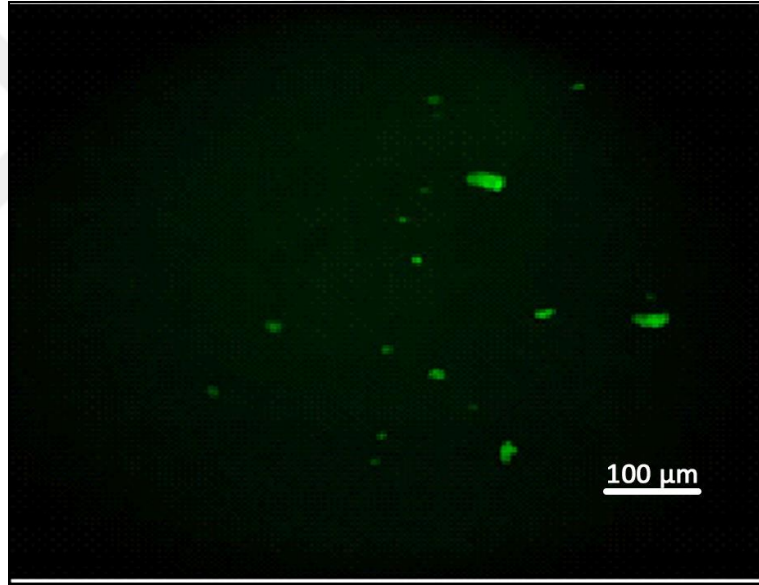


(b)

Şekil 4.4. hFOB hücre hattına *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanmadan önce a.10x oküler mikroskopik görüntüsü ve b. *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanmadan sonra 20x oküler mikroskopik görüntüsü.

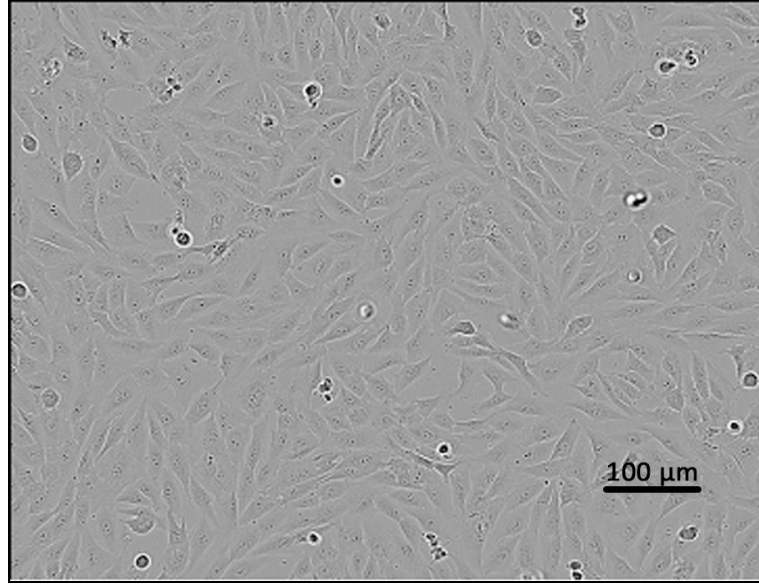


(a)

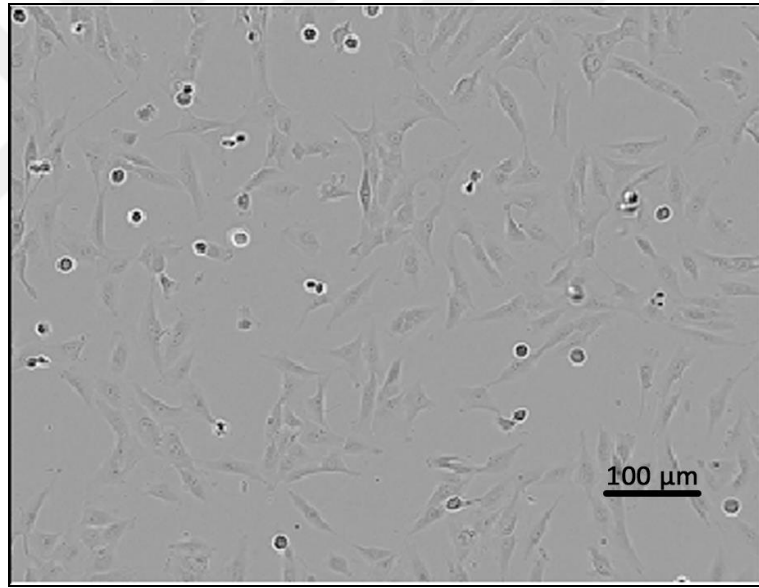


(b)

Şekil 4.5. a.hFOB hücre hattına IC₅₀ doz ve saat aralığına uygun olarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonraki 10x oküler mikroskopik görüntüsü. b.hFOB hücre hattının TUNEL uygulamasından sonraki 10x oküler mikroskopik görüntüsü.

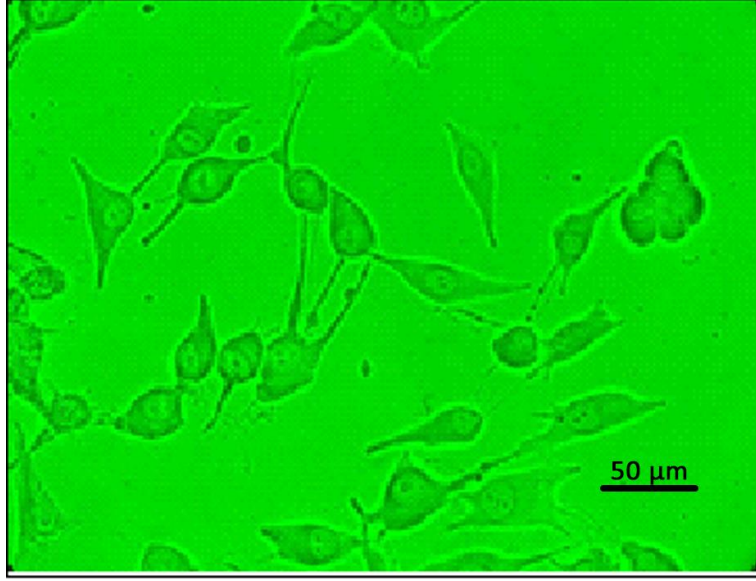


(a)

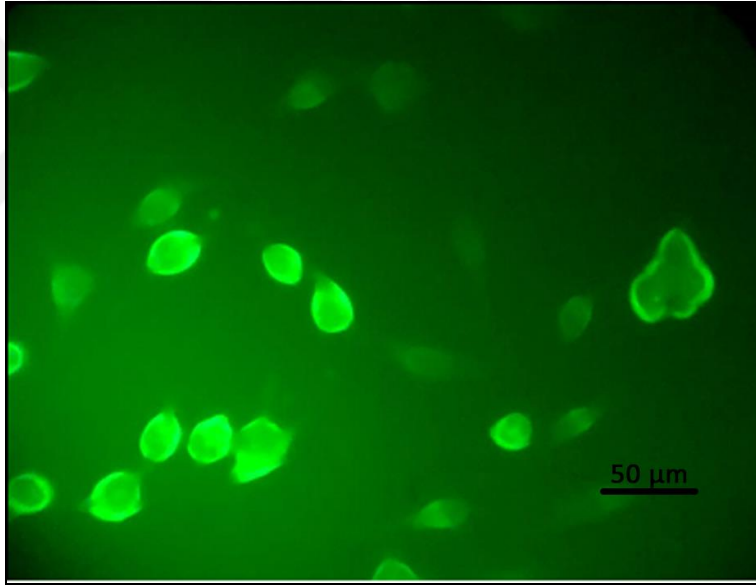


(b)

Şekil 4.6. a.MG-63 hücre hattına *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanmadan önce 10x oküler mikroskopik görüntüsü. b. MG-63 hücre hattına IC_{50} doz ve saat aralığına uygun olarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonraki 10x oküler mikroskopik görüntüsü.



(a)



(b)

Şekil 4.7. MG-63 hücre hattının TUNEL uygulamasından sonraki a. 20x oküler mikroskopik görüntüsü, b. 20x floresans mikroskopik görüntüsü.

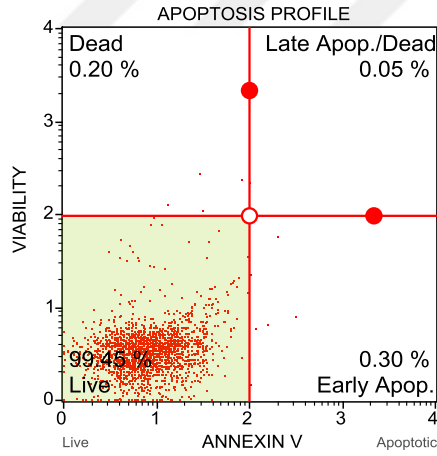
TUNEL yöntemi, bir floresans boyama yöntemidir ve apoptotik hücreleri işaretlemeyi sağlar. Yaptığımız çalışmada kontrol hücre hattımızda apoptozun görülmediği için boyanma olmazken, kanser hücre hattımız olan MG-63 apoptoza uğradığı için boyanmıştır.

4.6. Muse™ Cihazı ile Canlı ve Ölü Hücrelerin Evrenlenmesi

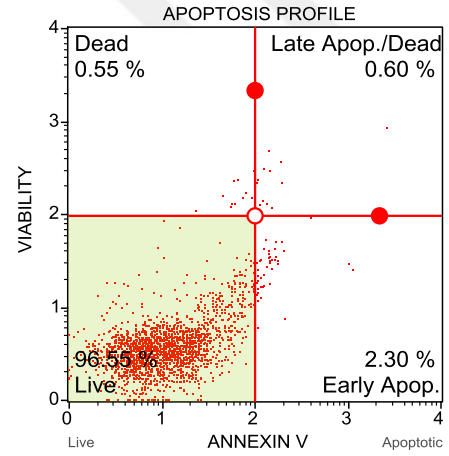
Hücre hatlarına IC₅₀ doz ve saat aralığına uygun olarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra Muse™ Annexin V ve Ölü Hücre yöntemiyle canlı ve ölü hücrelerin evrenlenmesi aşamasına geçilmiştir.

Tablo 4.8. Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63 için Annexin V deneyine göre % apoptoz değerleri. Ölçümler kontrol ve ilaç grubu için ayrı ayrı yapılmıştır.

		canlı	erken apoptoz	geç apoptoz	ölu	toplam apoptoz
hFOB	Kontrol	99,30	0,43	0,10	0,17	0,53
	Meyve ekstraktı	97,28	1,58	0,45	0,68	2,03
MG-63	Kontrol	97,97	1,47	0,17	0,38	1,65
	Meyve ekstraktı	96,92	1,78	0,58	0,71	2,37



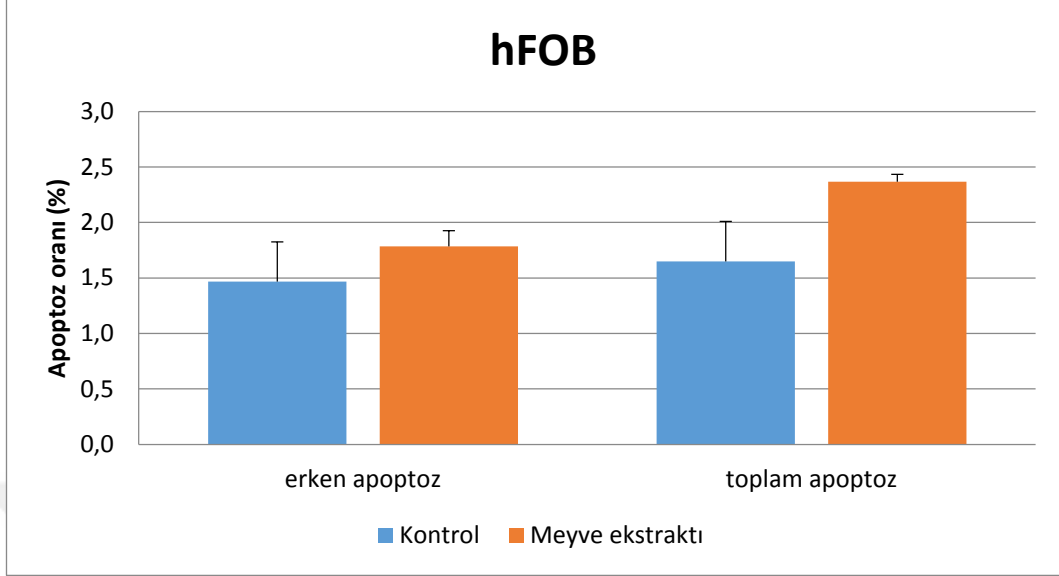
(a)



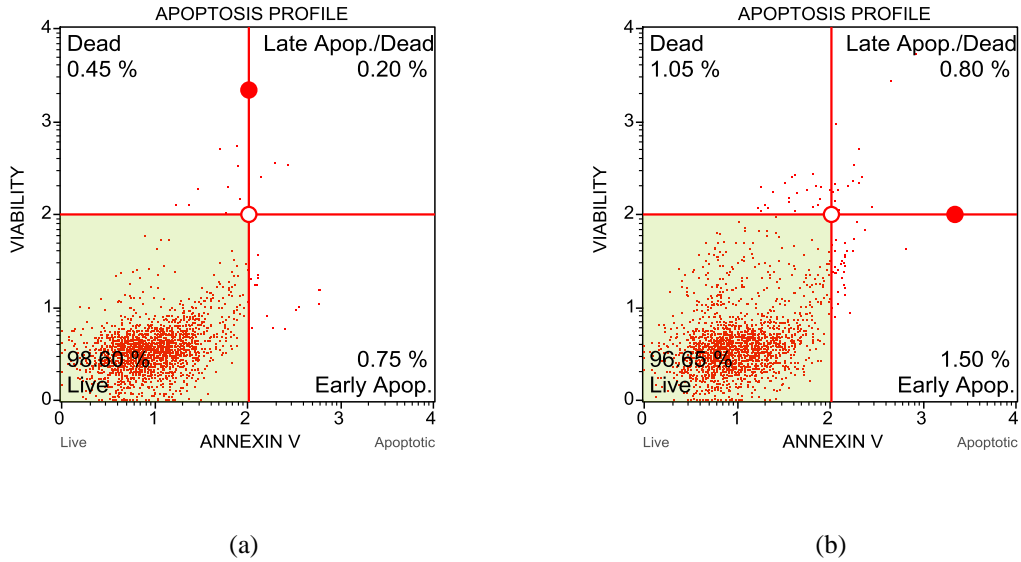
(b)

Şekil 4.8. Kontrol hücre hattı olan hFOB'un 48. Saat ve 1/100 *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonraki apoptoz düzeyinin Muse™ nokta dağılım grafikleri. Kontrol grubu (a), meyve ekstraktı uygulanan grup (b) ile ifade edilmiştir.

Tablo 4.9. hFOB'un 48. Saat ve 1/100 konsantrasyonda erken apoptoz ve toplam apoptoz düzeyi ortalaması. mavi; kontrol grubu, turuncu; meyve ekstraktı grubu.



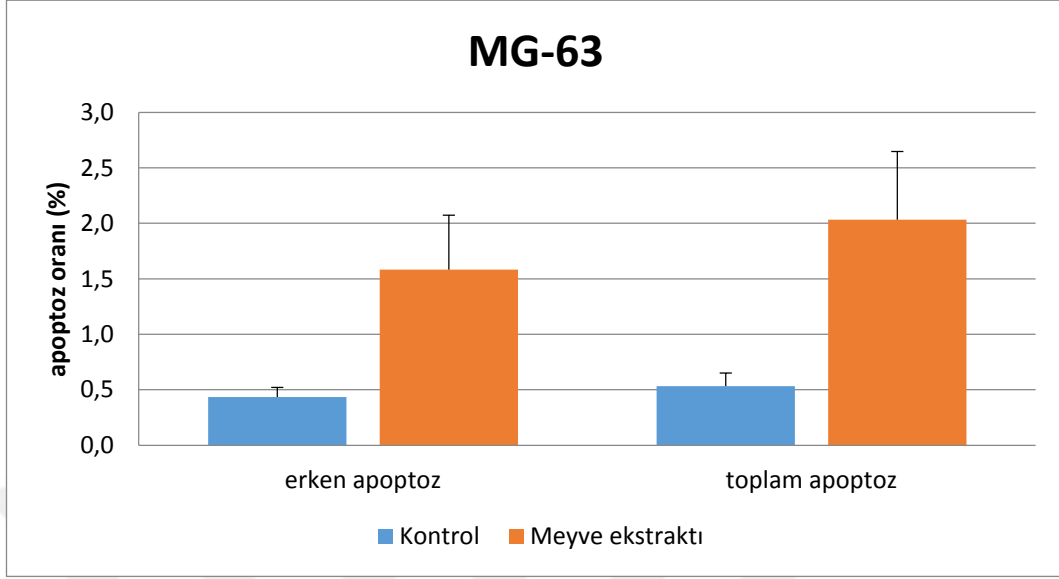
Çalışmamız sonucunda yapılan istatistiksel analiz ile sadece geç apoptoz evresinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Apoptozun erken evresinde ve toplam apoptoz değerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. ($p>0.05$).



Şekil 4.9. Kanser hücre hattı olan MG-63'e 48. Saat ve 1/100 konsantrasyon *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonraki apoptoz düzeyinin Muse™ nokta dağılım grafikleri.

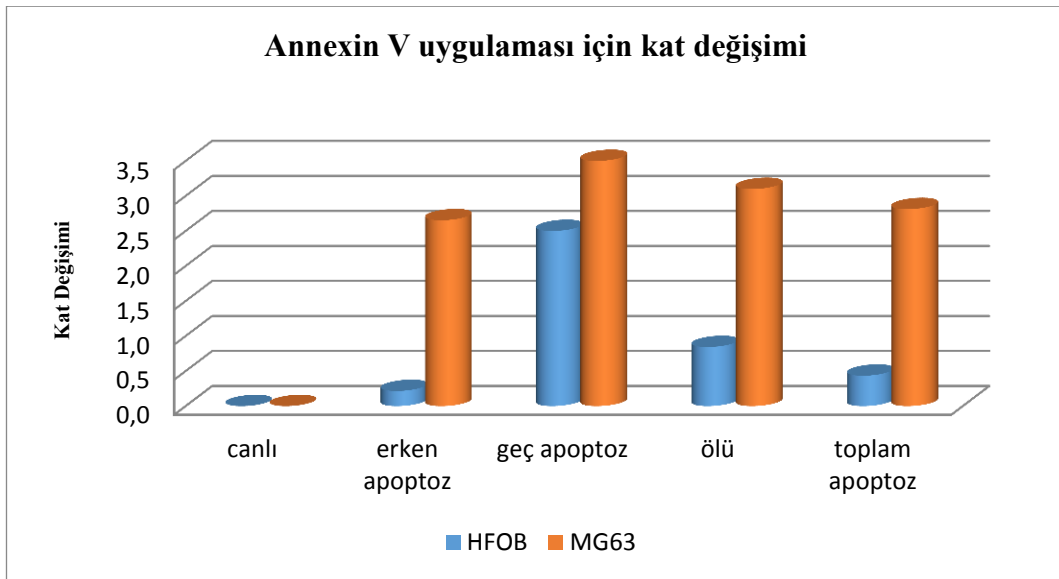
Kontrol grubu (a), meyve ekstraktı uygulanan grup (b) ile ifade edilmiştir.

Tablo 4.10. MG-63'ün 48. Saat ve 1/100 konsantrasyonda erken apoptoz ve total apoptoz düzeyi ortalaması. mavi; kontrol grubu, turuncu; meyve ekstraktı grubu.

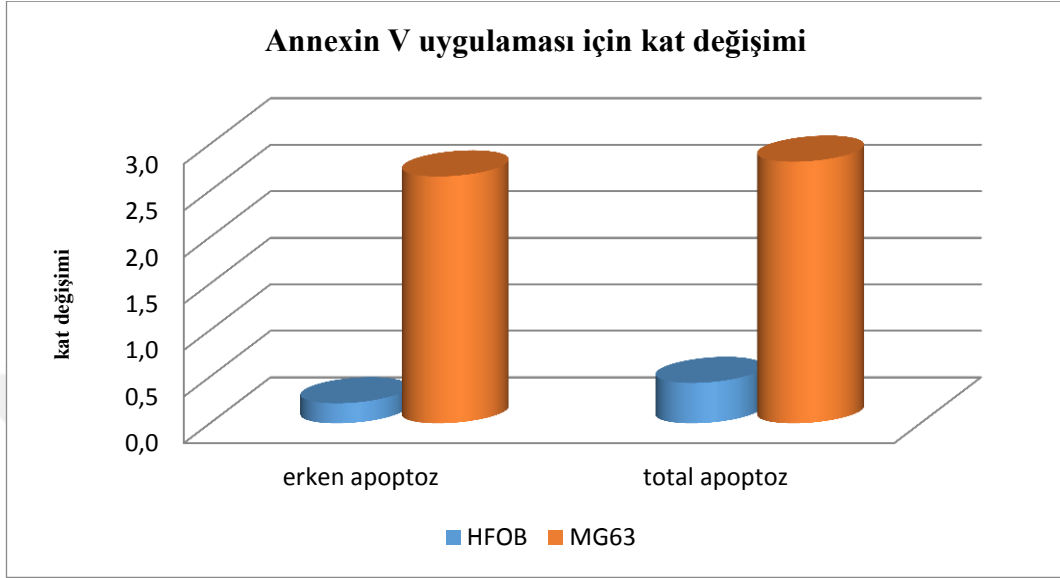


Çalışmamız sonucunda yapılan istatistiksel analiz ile canlı ve ölü evresinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Apoptozun erken evresinde ve toplam apoptoz değerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 4.11. Muse™ cihazı ile canlı ve ölü hücrelerin evrenmesi sonucunda kanser hücre hattı ile kontrol hücre hattının grup ortalamalarının kat değişimi. mavi; kontrol grubu, turuncu; meyve ekstraktı grubu.



Tablo 4.12. Muse™ cihazı ile canlı ve ölü hücrelerin evrenmesi sonucunda kanser hücre hattı ile kontrol hücre hattının erken apoptotik ve toplam apoptotik grup ortalamalarının kat değişimi. mavi; kontrol grubu, turuncu; meyve ekstraktı grubu.



Çalışmamızda kontrol ve kanser hücre hattına IC₅₀ doz ve zaman aralığına göre *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra Muse™ Annexin V ve Ölü Hücre yöntemiyle canlı ve ölü hücrelerin evrenmesi yapılmıştır. Her iki hücre hattı içinde hem meyve ekstraktı uygulanarak hem de uygulanmayarak 3 tekrarlı bir deney düzeneği oluşturulmuştur.

Yapılan analizler sonucunda kontrol hücre hattında apoptozun erken evresinde ve total apoptozda ~0.5 kat değişim gözlenmiştir. Kanser hücre hattında apoptozun erken evresinde ve total apoptozda ~3 kat değişim gözlemlenmiştir.

4.7. Kantitatif RT-PCR Yöntemiyle Apoptotik Gen İfadelerinin Belirlenmesi

Total RNA'lerden cDNA'lar prosedüre uygun olarak sentezlenmiş, ardından qRT-PCR gen ifade düzeyleri prosedüre uygun olarak yapılmış, apoptotik gen ifade düzeyleri *GAPDH* ile normalize edilerek ölçülmüştür.

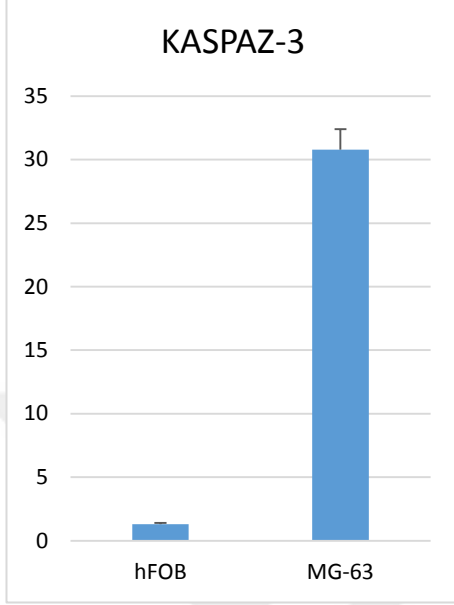
Tablo 4.13. Kontrol hücre hattı olan hFOB hücresinde IC₅₀ doz ve zaman aralığına uygun olarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra qRT-PCR ile ölçülen apoptotik genlerin ve GAPDH geninin ekspresyonu.

hFOB	MEYVE EKSTRAKTI		KONTROL		$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta C_T}$
	C _T	Δc_t meyve ekstraktı	C _{T2}	Δc_t kontrol		
Kaspaz-3	20,06	3,17	20,33	3,53	-0,36	1,29
Kaspaz-8	29,38	12,49	27,82	11,03	1,46	0,38
Kaspaz-9	26,99	10,10	26,93	10,14	-0,04	1,05
<i>BAX</i>	26,99	10,10	26,75	9,95	0,15	0,94
<i>BAD</i>	28,71	11,82	28,75	11,96	-0,14	1,18
<i>BIM</i>	26,55	9,66	27,62	10,83	-1,17	2,38
<i>BAK</i>	23,36	6,48	22,77	5,97	0,51	0,71
<i>GAPDH</i>	16,89	0,00	16,80	0,00	0,00	1,00

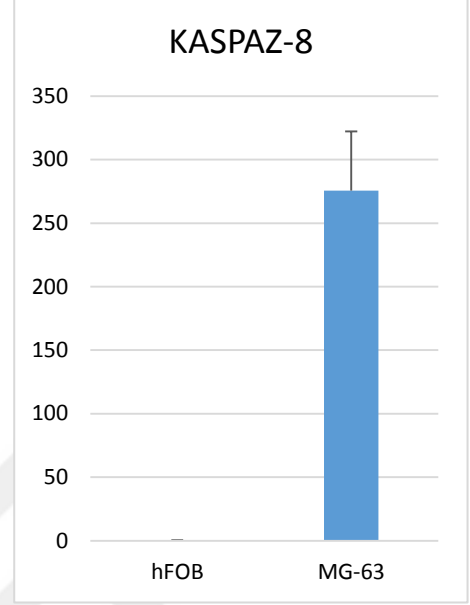
Tablo 4.14. Kanser hücre hattı olan MG-63 hücresinde IC₅₀ doz ve zaman aralığına uygun olarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra qRT-PCR ile ölçülen apoptotik genlerin ve GAPDH geninin ekspresyonu.

MG-63	MEYVE EKSTRAKTI		MG63-KONTROL		$\Delta\Delta ct$	$2^{-\Delta ct}$
	C _T	Δct meyve ekstraktı	C _T 2	Δct kontrol		
Kaspaz-3	31,67	7,03	33,75	11,97	-4,94	30,79
Kaspaz-8	29,53	4,89	34,73	12,95	-8,07	275,54
Kaspaz-9	32,38	7,74	31,27	9,50	-1,76	3,45
<i>BAX</i>	28,61	3,97	23,78	2,01	1,96	0,26
<i>BAD</i>	27,64	3,00	34,95	13,17	-10,17	1191,79
<i>BIM</i>	32,46	7,82	32,84	11,06	-3,24	11,00
<i>BAK</i>	30,52	5,88	31,53	9,75	-3,87	14,69
<i>GAPDH</i>	24,64	0,00	21,78	0,00	0,00	1,00

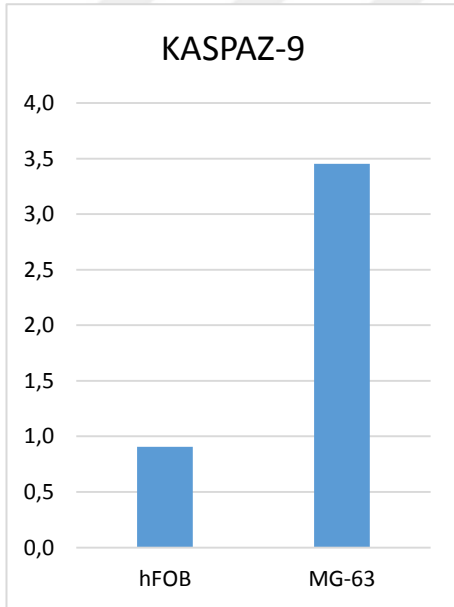
Tablo 4.15. Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı MG-63 hücresinde IC₅₀ doz ve zaman aralığına uygun olarak *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra qRT-PCR ile ölçülen a. kaspaz-3, b. kaspaz-8, c.kaspaz-9, d.*BAD*, e.*BAX*, f. *BIM*, g. *BAK* genlerinin ekspresyon düzeyleri.



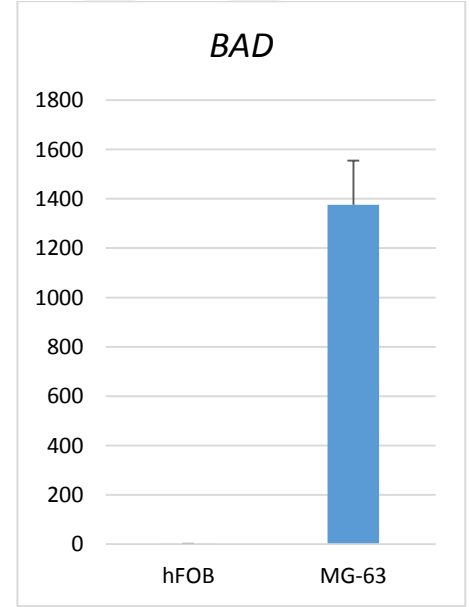
(a)



(b)

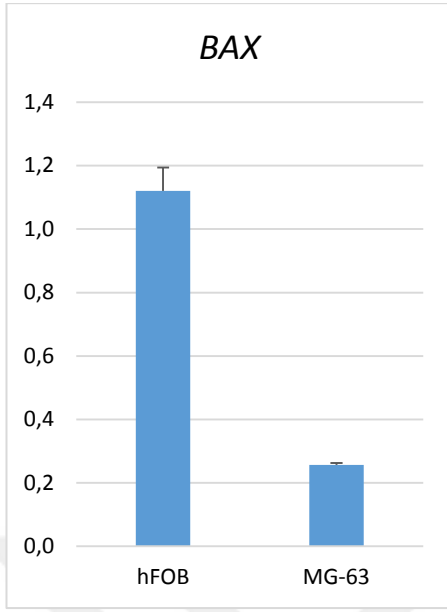


(c)

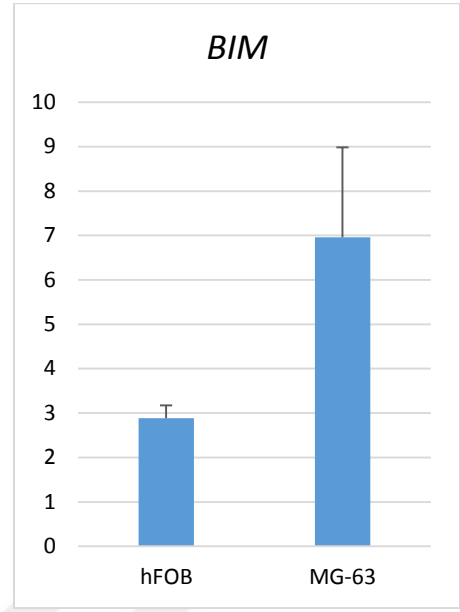


(d)

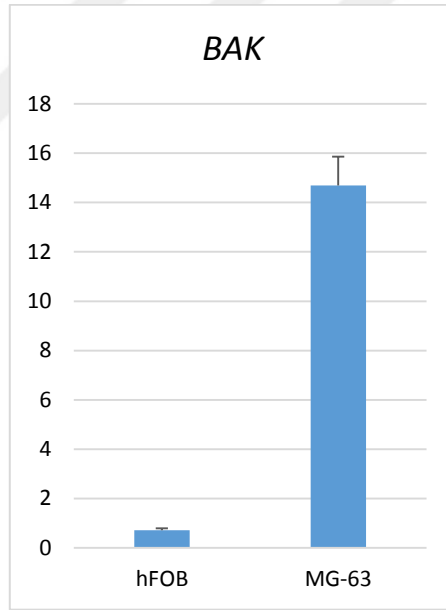
Tablo 4.15. Devamı



(e)



(f)

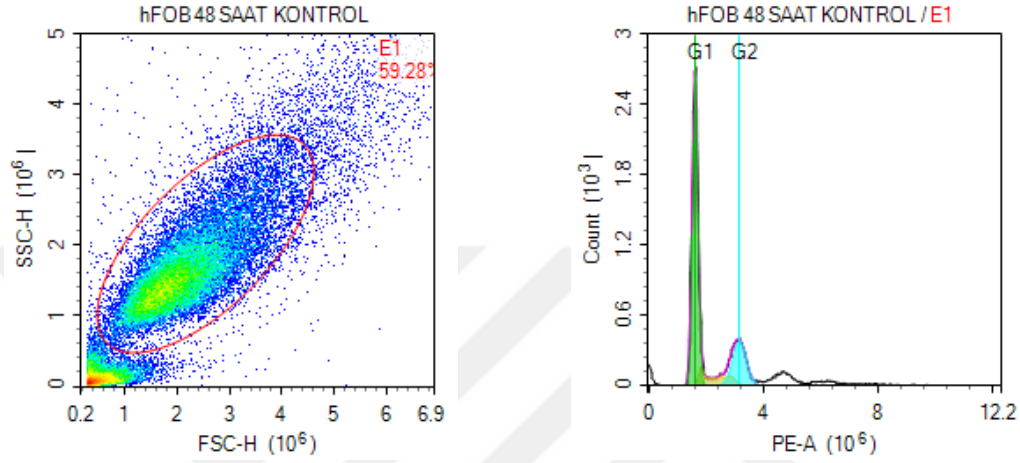


(g)

Sonuçlara bakıldığında hücre hatlarına 48.saat ve 1/100 konsantrasyonunda *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra apoptotik genlerde kontrol hücre hattına kıyasla kanser hücre hattı gen ifadeleri yüksek seyretmiştir. Ekspresyon düzeylerindeki bu artış kaspaz-3, kaspaz -8, kaspaz -9 ve *BAK* genlerinde istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). *BAX* genin ekspresyonundaki azalma, *BAD* ve *BIM* genlerinin ekspresyonundaki artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

4.8. Akış Sitometri Yöntemi İle Hücre Döngüsü Evrelerinin Belirlenmesi

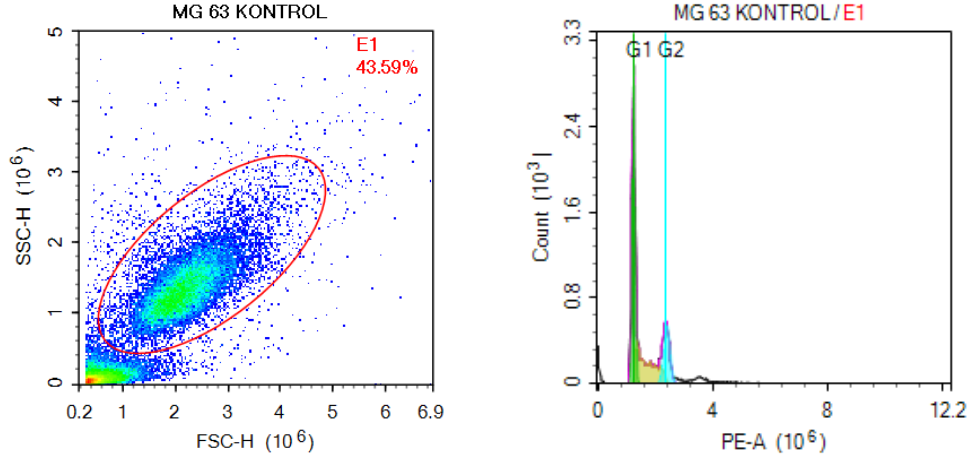
Çalışmamızdaki hücre hatlarına IC₅₀ sonuçlarına uygun doz ve saat aralığında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra akış sitometri yöntemi uygulanarak, hücrelerin apoptoza giderken hücre döngüsüne etki edip etmediği tespit edilmeye çalışıldı.



Şekil 4.10. Kontrol hücre hattı olan hFOB'un kontrol grubu için DNA hücre döngüsü analizi akış sitometri sonuçları.

Tablo 4.16. Kontrol hücre hattı olan hFOB'un kontrol grubu için DNA hücre döngüsü faz yüzdeleri.

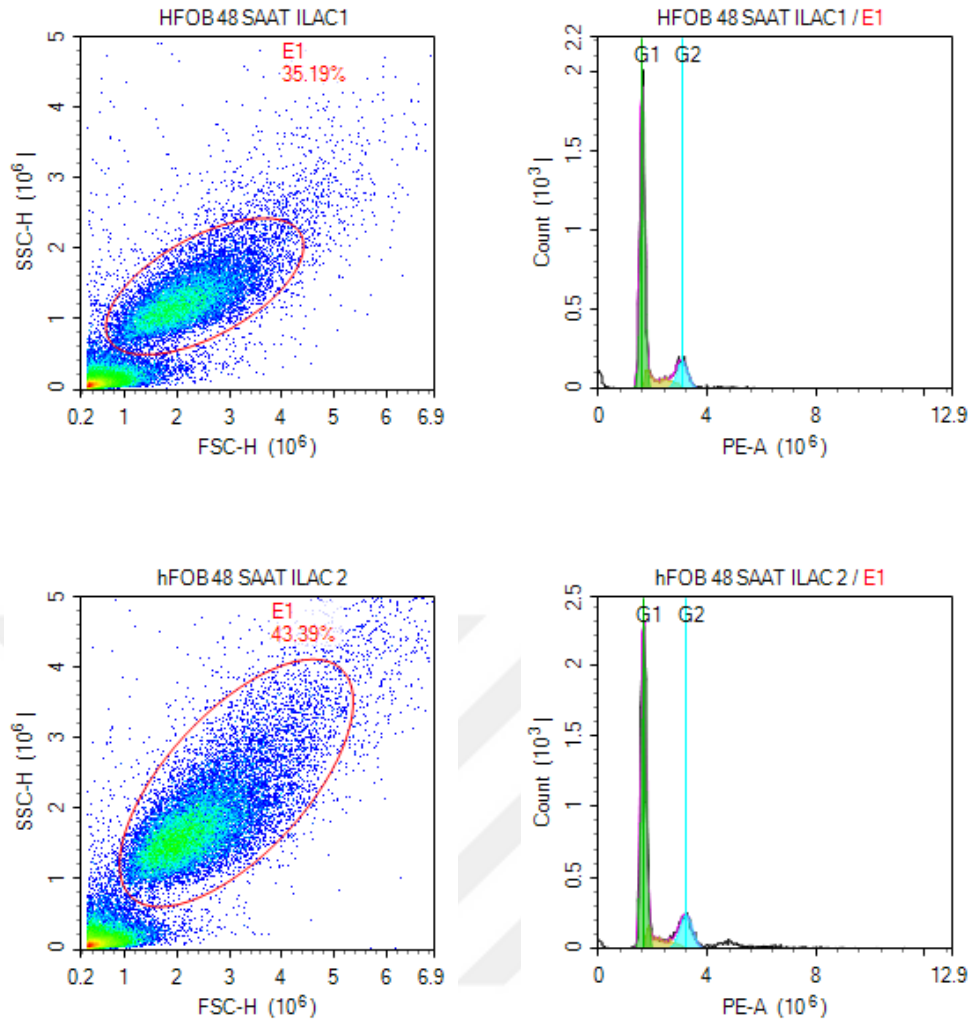
	G1	S	G2
hFOB KONTROL	%38,95	%26,35	%21,84



Şekil 4.11. Kanser hücre hattı olan MG-63'ün kontrol grubu için DNA hücre döngüsü analizi akış sitometri sonuçları

Tablo 4.17. Kanser hücre hattı olan MG-63'ün kontrol grubu için DNA hücre döngüsü faz yüzdeleri.

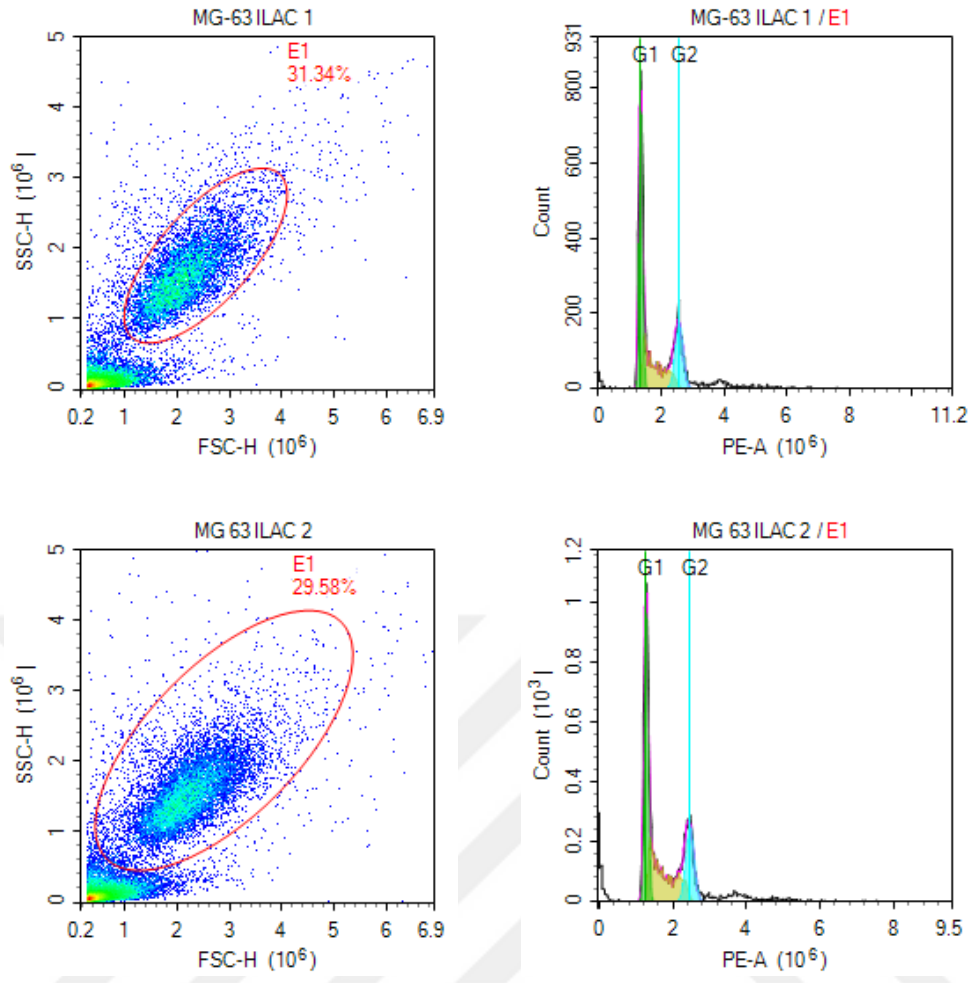
	G1	S	G2
MG-63 KONTROL	%44,03	%27,16	%18,33



Şekil 4.12. Kontrol hücre hattı olan hFOB'un ilaç grubu için DNA hücre döngüsü analizi akış sitometri sonuçları.

Tablo 4.18. Kontrol hücre hattı olan hFOB'un meyve ekstraktı grubu için DNA hücre döngüsü faz yüzdeleri.

	G1	S	G2
hFOB MEYVE EKSTRAKTI 1	%63,94	%10,94	%15,74
hFOB MEYVE EKSTRAKTI 2	%66,24	%13,69	%14,22

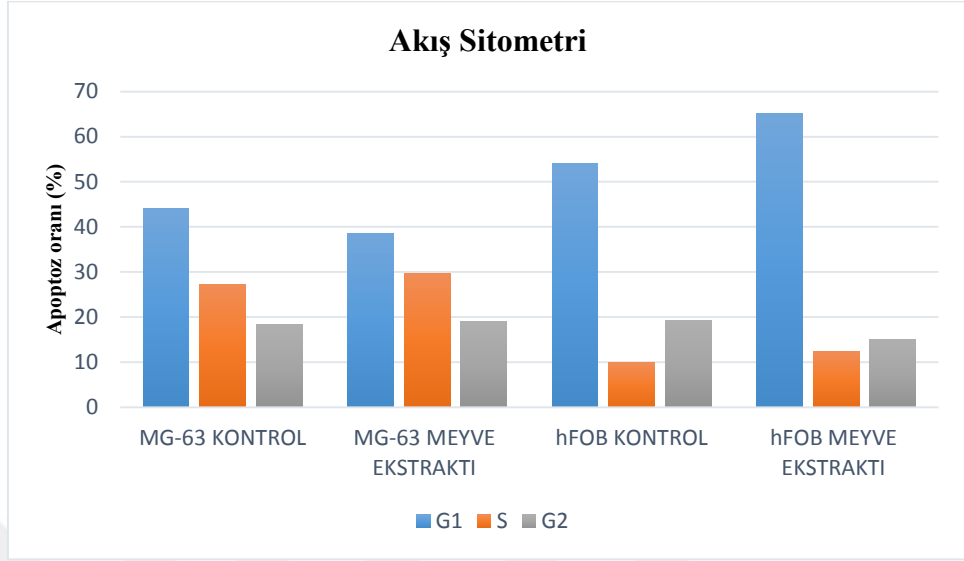


Şekil 4.13. Kanser hücre hattı olan MG-63'ün meyve ekstraktı grubu için DNA hücre döngüsü analizi akış sitometri sonuçları.

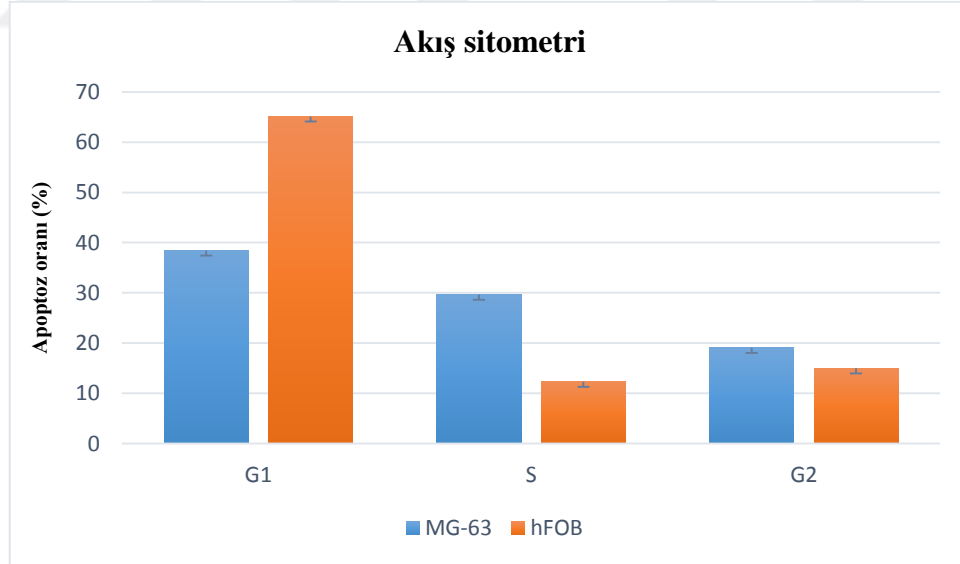
Tablo 4.19. Kanser hücre hattı olan MG-63'ün meyve ekstraktı grubu için DNA hücre döngüsü faz yüzdeleri.

	G1	S	G2
MG-63 MEYVE EKSTRAKTI 1	%40,25	%26,71	%20,83
MG-63 MEYVE EKSTRAKTI 2	%63,94	%10,94	%15,74

Tablo 4.20. Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63 ün meyve ekstraktı uygulanan ve uygulanmayan grup ortalamalarının akış sitometri ile hücre döngüsü analizi. Mavi; G1 fazı, turuncu; S fazı, gri; G2 fazı.



Tablo 4.21. Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63 ün grup ortalamalarının akış sitometri ile hücre döngüsü analizi. Mavi; MG-63, turuncu; hFOB.



Çalışmamızda apoptoza gittiği gözlemlenen hücrelerin, hücre döngüsüne etkisinin analiz etmek için akış sitometri çalışması yapılmıştır. Yapılan istatistik çalışmada kontrol ve kanserli hücre hattı ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Her iki hücre hattında da *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulamasından sonra hücre döngüsünde apoptoz açısından anlamlı bir değişim yoktur. ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Osteosarkoma (OS) iskelet sisteminde yaygın olan bir malign tümör olup mezenkimal doku kaynaklıdır. Osteosarkoma, distal femur, proksimal tibia ve proksimal humerus kemiklerinin metafizlerinde sıklıkla görüldüğünden metastaz yapma ve tekrarlama eğilimi gösterir (7). Primer tümörün kesin rezeksiyonu öncesi birden fazla kemoterapötik ajanın uygulanması osteosarkomanın tedavisinde önemli bir gelişmedir. Bununla birlikte, OS tedavisinde kemoterapi ilaçlarına karşı zayıf klinik sonuç, osteosarkom hastalarının yaklaşık %50'sinde karşılaşılan bir problemdir. 5 yıllık relapsız sağkalım oranı yaklaşık %65'tir (18). Sentetik ilaçlara/kemoterapiye dayanan mevcut tedavi seçenekleri kanserde sınırlı terapötik başarı sunar; çünkü bunlar son derece toksik etkiye sahiptir, pahalıdır ve hücre sinyal yolağının işleyişini değiştirmektedir. Doğal bileşikler, özellikle fitokimyasallar, mineraller ve vitaminler kanser yükünü azaltmak için umut verici ve pragmatik bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Kanser tedavisinde güvenli ve uygun maliyetli bir alternatif olduğu için gittikçe artan bir ilgi görmektedir. Tek hedefli moleküller gibi davranan ilaçların aksine, şifalı bitkiler kanser gelişimini ve ilerlemesini düzenleyen çoklu hedef moleküllere sahiptir (1).

Bitkiler, insanlar tarafından hastalıkları tedavi amacıyla olarak uzun zamandır kullanılmıştır (8). Ayrıca bitkilerin anti-kanser özellikleri olduğu ve hatta kemoterapinin etkinliğinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (13). *Ficus carica* ürünlerinin terapötik kullanım Ortadoğu'da yaygındır (2). *Ficus carica*'nın hipoglisemik, hipokolesterolemik, hipotrigliseridemik, ve antihelmintik etkilerinin yanı sıra, kanser baskılayıcı etkileri hücre kültürü hatlarında gösterilmiştir (14-16).

Yapılan literatür araştırmasına göre bir takım bitki ekstraktlarının OS üzerinde terapötik etkisi olduğunu göstermektedir. *Ficus carica*'nın OS üzerindeki olası terapötik etkisine ilişkin henüz bir çalışma bulunmadığı gözlemlenmiştir (40). Bu çalışmada; *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının kemik kanseri hücre hattında olası ölüm yolları üzerinden etki mekanizmasının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Bu araştırma ile;

Ficus carica bitkisi su bazlı meyve ekstraktı, ticari olarak temin edilmiş, organik çözücülerle muamele edilerek sulu fraksiyonu hazırlanmıştır. HPLC-DAD kullanılarak içeriğindeki Protokateşuik asit bileşiği 8.17063×10^{-1} mg/L olarak tespit edilmiştir. *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının içeriğindeki diğer bileşenlerin analizi için LC/MS gibi daha ileri tespit uygulamalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızın sonraki hedeflerinden biri de ekstraktın içerik yapısını daha iyi analiz etmektir.

MTT yöntemi; kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar. IC_{50} değeri; inhibe edici özelliği olduğu düşünülen maddenin tam inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonunun yarı değerini verir (62). Yapılan literatür taraması sonucunda *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının farklı hücre hatlarında sitotoksik aktivitesinin belirlendiğini göstermiştir (1,63). Fakat kemik kanseri hücre hattı üzerinde *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının sitotoksik aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışma bulunmamıştır. Yaptığımız çalışma kapsamında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının inhibe edici özelliğini olup olmadığını anlamak amacıyla IC_{50} değeri saptanmıştır. Diğer bir deyişle, *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanan hücrelerin hayatta kalabilirliğini MTT yöntemi ile ölçerek *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının IC_{50} değerini belirlenmiştir. MTT yöntemi sırasında kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63'e 4 farklı zaman aralığı (12. Saat, 24. Saat, 48. Saat, 72. Saat) ve 5 farklı konsantrasyonda (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000) *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanmıştır. Uygulama sonrasında kanser hücre hattı olan MG-63 için IC_{50} değeri 48. Saat ve 1/100 konsantrasyonu olarak tespit edilmişken, kontrol hücre hattı olan hFOB için IC_{50} değerine ulaşılamamıştır. MTT deneyi sonucunda kontrol hücre hattı için *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının toksik bir etkisi olmadığı görülmüştür. Yani kanserli hücreyi ölüm yoluna sokarken sağlıklı hücre üzerinde ölümcül bir etkisi yoktur. Sonuçlar doğrultusunda, sonraki işlem basamakları için uygulama kolaylığı açısından hem hFOB hem de MG-63 hücre hattına da 48. Saat de 1/100 konsantrasyonunda *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu olarak, literatürdeki diğer çalışmalar *Ficus carica* bitkisini antikanser bileşenleri içerdiğini desteklemiştir (63).

Laktat dehidrogenaz tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hücre toksik maddelere maruz kaldığında membran yapısı bozulur ve laktat dehidrogenaz hücrelerden dışarı sızar. Böylece hücre ölümü ya da hasarı LDH yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilebilir (64). LDH yöntemi; membran değişikliği sonucunda açığa çıkan intraselüler enzimlerin aktivitesini ölçen kolorometrik bir testtir. Enzim aktivitesi ile hücre ölümü doğru orantılı olarak değişir. Hücre kültüründeki süpernatantın içinde laktat dehidrogenaz ölçümü ile kültürdeki hücrelerin canlılık değişimi kantitatif değer alır (62). LDH ölçümü 492nm'de yapılmıştır. Bradford metodu ise protein miktar tayini için kullanılan bir yöntemdir. Protein tayini için spektrofotometrik ölçümler 595nm'de yapılmıştır. Çalışmamızda LDH yöntemini Bradford yöntemi ile birlikte kullanarak birim protein başına düşen enzim miktarını belirlemeyi amaçladık. Hücre ölümünü analiz ettiğimiz diğer bir yöntem olan MTT yöntemi ile paralellik sağlaması açısından kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63'e 3 farklı zaman aralığı (24. Saat, 48. Saat, 72. Saat) ve 5 farklı konsantrasyonda (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000) *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulanmıştır. Yapılan uygulama sonrasında kontrol hücre hattı olan hFOB'un kontrol grubu, meyve ekstraktı grubu ile kıyaslandığında LDH miktarının en yüksek kontrol grubunda seyrettiği gözlemlenmiştir. *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulaması yapılan diğer konsantrasyon grupları arasında değişim gözlemlenmemiştir. Kontrol hücre hattı olan hFOB için LDH sonuçları MTT sonuçları ile paralellik göstermiştir. Kanser hücre hattı olan MG-63 için konsantrasyon miktarındaki artışa doğru oranlı olarak LDH/Bradford oranında artış görülmüştür. Bu artış 1/10 konsantrasyonunda anlamlıdır. LDH/Bradford miktarındaki doğrusal artış MTT deneyindeki hücre canlılığındaki azalma ile paralellik göstererek hücrenin membran yapısının bozulduğunu ve hücrenin ölüme gittiği düşüncesini güçlendirmiştir.

DNA fragmentasyonu apoptozun ilk aşamalardan biridir. Apoptotik parçalanma sonucunda DNA kırıkları oluşur ve DNA uçları terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak işaretlenir. TdT ve nonizotopik işaretleyiciler kullanılarak apoptotik hücreler floresan görüntülemeyle apoptotik olmayan hücrelerden ayrılabilir. Yapılan literatür taramasında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının beyin tümörü hücre hattı olan GBM üzerinde DNA fragmentasyonuna yol açtığı kanıtlanmıştır (1). Çalışmamız kapsamında kemik

kanseri hücre hattı üzerinde de aynı etkiyi gösterip göstermeyeceğini tespit etmek amacıyla kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63'e IC₅₀ için uygun konantrasyon ve zaman aralığında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra DNA fragmentasyonun histokimyasal olarak gösterilebilmesi için TUNEL yöntemi uygulanmıştır. TUNEL yönteminin uygulanması sonucunda kontrol hücrelerinde boyanma olmazken, apoptoza uğrayan kanser hücrelerinde floresan boyanma tespit edilmiştir. Böylece kanser hücre hattı olan MG-63'ün apoptotik morfoloji gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu deneysel sonuç daha önce *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının GBM kanser hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin anlaşılması için yapılan çalışmayı (1) desteklemektedir.

Normal şartlarda hücre zarının iç yüzeyinde lokalize bir membran bileşeni olan fosfotidil serin, yüksek bir afiniteye sahip bir kalsiyum bağımlı fosfolipid molekülüdür. Hücre apoptoza girdiğinde fosfotidil serin hücre dışına doğru yapraklanır (53). Bu morfolojik değişiklik Annexin V proteininin fosfotidil serine bağlanması ile tespit edilebilir. Çalışmamızda kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63'e IC₅₀ için uygun konantrasyon ve zaman aralığında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra Muse Annexin V kiti ile apoptoz evrenmiştir. Geç evre apoptoz nekrozu da işaret edebileceği için kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63'ün apoptotik analizi, erken evre ve toplam apoptoz değerlendirilerek yapılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla birlikte kontrol hücre hattı olan hFOB için bir kat artışı görülmezken ve kanser hücre hattı olan MG-63'ün erken apoptoz ve toplam apoptoz değerlerinde 3 kat artış tespit edilmiştir. Apoptoz değerlerinde artış görülmesi fakat istatistiksel olarak anlamlı olmaması kanser hücre hattı olan MG-63'ün belirlenen IC₅₀ için uygun konantrasyon ve zaman aralığında membranın değişiklik gösteren fosfotidil serinin zar yüzeyindeki konumu açısından yeterli bir değişimin olmadığını düşündürmektedir. Bu sürecin açıklanması açısından ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Apoptozun aşamalarından bir diğeri kaspaz ve *Bcl-2* genlerinin aktivasyonudur. Apoptoz temel olarak iki yolla başlatılır: 1) dışsal yol 2) içsel yol. Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yol aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklaştığı bir mekanizma oluşturur. Çalışmamız sırasında içsel ve dışsal

yoklaktaki gen ekspresyonu düzeylerini analiz etmek için kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63'e IC₅₀ için uygun konantrasyon ve zaman aralığında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan qRT-PCR metodu ile gen ekspresyonlarındaki değişim gerçek zamanlı olarak analiz edilebilmiştir. *Bcl-2* gen ailesinde insanlarda görülen kanserlerin yarısında anormal yüksek düzeylerde ve/veya hatalı *Bcl-2* yapımı vardır (18). Çalışmamızda *Bcl-2* ailesine dahil olan *Bax*, *Bad*, *Bim* ve *Bak* geninin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63 arasında gen ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılık olup olmadığı istatistiksel olarak analiz edilmiştir. *Bax*, *Bad*, *Bim* genlerinin ekspresyonunda anlamlı bir değişim görülmezken, *Bak* genin ekspresyonundaki değişim istatistiksel olarak anlamlıdır. *Bak* geni etkinleşerek mitokondri dış zarında porların oluşumuna ve zar potansiyelinin değişimine yol açar. Bu da efektör (uygulayıcı) kaspazların aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanır (65). Çalışmamızda başlatıcı kaspazlar olan kaspaz-9 ve kaspaz-8, efektör kaspaz olan kaspaz-3'ün ekspresyon düzeyleri de analiz edilmiştir. *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63 arasında kaspaz aktivitesi açısından anlamlı bir farklılık olup olmadığı istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre kaspaz-9, kaspaz-8 ve kaspaz 3'ün ekspresyonundaki değişim anlamlıdır. Çalışmamız sırasında yapılan qRT-PCR analiz sonucunda *Ficus carica* bitkisi ekstraktının kanser hücre hattı olan MG-63'ün apoptoz giderken hem içsel yolları hemde dışsal yolları üzerinde etkisi olabileceğini göstermiştir. Apoptoz sırasında proapoptotik yollar anti-apoptotik yollarla baskılanabileceği bildirilmiştir (64). *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının kanser hücre hattı üzerindeki etkisinin anlaşılması açısından pro-apoptotik genlerin ve kaspaz yolunun anti-apoptotik genlerin ekspresyonuyla birlikte değerlendirilmesi mekanizmanın anlaşılması açısından önem kazanmaktadır. Ayrıca ileri istatistiksel metodlar kullanarak qRT-PCR sonuçlarının yeniden analiz edilmesi sonraki çalışma hedeflerindedir.

Bu çalışmada kemik kanseri hücre hattında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının sitotoksik bir etkisi olduğu, DNA fragmentasyonuna yol açtığı, apoptotik yolları aktive ettiği kanıtlanmıştır. Membran değişikliği ile ilgili sonuçların doğrulanması için ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Proapoptotik genler; *Bcl-2* gen ailesi üyesi olup hücre döngüsü üzerinde etkilidir. Bu genlerin ekspresyonundaki artış hücre döngüsü üzerinde aktivasyonu ile kemik kanseri hücre hattında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının hücre döngüsü üzerinde bir etkisi olup olmadığını düşüncesini doğurmuştur. Bu amaçla hücre döngüsü analizi için akış sitometri yöntemi kullanılmıştır. Akış sitometri floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklüğüne ve granülaritesine göre tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapan bir sistemdir. Hücre döngüsünün analizinde sıklıkla kullanılan bir metoddur. Yapılan literatür taramasında *Ficus carica*'nın meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231'ün hücre döngüsüne etki ederek, döngüyü S fazında durdurduğu kanıtlanmıştır (63). Çalışmamız sırasında kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63'e IC₅₀ için uygun konantrasyon ve zaman aralığında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı uygulandıktan sonra propidium iyodür boyası kullanarak, her iki hücre için de hücre döngüsü analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda G₁, S, G₂ evrelerinde ki apoptoz oranı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kontrol hücre hattı olan hFOB ve kanser hücre hattı olan MG-63'ün meyve ekstraktı uygulanan ve uygulanmayan grubu arasında hücre döngüsü evrelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı kanserli hücreyi ölüme götürürken hücre döngüsü üzerinde bir etkiye sebep olmadığı düşünülmektedir. Bu durumu açıklayabilmek için *c-myc* ve *p53* gen aktivitesinin incelenmesi düşünülmektedir. Osteosarkoma oluşumundaki nedenlerden biri de *c-myc* genin ekspresyonudur (64). Transkripsiyon faktörü olan *Myc*, hücre proliferasyonunda rol oynayan bazı genlerin ekspresyonu üzerinde etkilidir. *c-myc* aktivitesi hücrenin sürekli olarak hücre döngüsünde kalarak çoğalmasında etkili olarak apoptozdan kaçmasını sağlayabilir. *p53* geni hücre döngüsünün kontrolünde etkili olan bir başka genidir (64). DNA hasarlanması sonucunda *p53* geni hücre döngüsünü G₁ evresinde bloke edebilir. Ama bunun için *p53* geninin "sikline bağlı kinaz"ları fosforilasyonunu engelleyen p21 proteinin bulunması gerekir. Eğer p21 proteini bulunmazsa DNA hasarı olmasına rağmen hücre döngüsü durmaz (64). Sonraki çalışmalarda bu gen gruplarının analiz edilerek *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının hücre döngüsündeki etkisinin daha iyi anlaşılabilceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ❖ Bu çalışma sırasında *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının kemik kanseri hücre hattı üzerinde apoptotik indüksiyona etkisi olup olmadığını tespit etmeye çalıştık.
- ❖ Yaptığımız organik çözücüler ile hazırladığımız fraksiyon ve HPLC analizi ile içeriğindeki miktarı tayini yapılabileceğini tespit edilmiştir.
- ❖ MTT yöntemi ile IC₅₀ belirleyerek *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktı sağlıklı hücrede toksik bir etkisi yokken kanserli hücreyi ölüme götürdüğünü tespit edilmiştir.
- ❖ Membran değişimi analiz yöntemi olan LDH ve Annexin V metodu ile elde edilen değerlerde artış görülmesine rağmen anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir. Bu yüzden membran değişikliğini daha iyi anlamak için flow sitometri gibi farklı analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.
- ❖ Apoptozun bir diğer işareti olan DNA fragmentasyonu TUNEL metodu ile tespit edilebilmiştir. Bu yöntem sırasında kontrol hücre hattı olan hFOB da herhangi bir floresan boyanma görülmezken kanser hücre hattı olan MG-63'ün floresan boyanması ile hücrenin ölüme giderken apoptozu seçtiğinin bir başka göstergesi olmuştur.
- ❖ Apoptoza gidişte yolakların etkisini anlamak için proapoptotik genler ve kaspazların ekspresyonu qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Proapoptotik gen olan Bak'ın, başlatıcı ve efektör kaspazların ekspresyonundaki değişim anlamlı bulunmuştur. Analiz sonuçları *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının kemik kanseri hücre hattını hem içsel hemde dışsal yolları aktive ederek apoptoza götürdüğünü göstermiştir. Yolakların daha iyi anlaşılması açısından antiapoptotik genlerin ekspresyon düzeylerinin analiz edilmesi önemlidir.
- ❖ Kanser hücrelerinin apoptoz sırasındaki hücre döngüsünü analiz etmek için akış sitometri yöntemi kullanılmıştır. Analiz sonucunda her iki hücre hattı içinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Hücre döngüsünün analizi için

farklı gen gruplarının ekspresyon düzeylerinin incelenmesi süreci açıklamak açısından önem kazanmaktadır.

MG-63 kemik kanseri hücrelerinde *Ficus carica* bitkisi meyve ekstraktının; içerik tayini, sitotoksik analizi, membran değişikliği, DNA fragmentasyon değişikliği, hücre döngüsü, apoptotik yollar üzerindeki etkisinin analizi sonucunda elde edilen verilerin gelecek çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir. Ayrıca diğer hücre ölüm tiplerinin analizi içinde çalışmamız öncülük edecektir. Çalışılan kanser hücre hattında; hücre proliferasyonu ve ölüm yollarının gen, protein ve görüntüleme yöntemleri ile detaylı analizi için ilave çalışmaların gerçekleştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.



7.KAYNAKLAR

1. Amara AA, El-Masry MH, Bogdady HH. Plant crude extracts could be the solution: extracts showing in vivo antitumorigenic activity. *Pak J Pharm Sci.*, 2008, 21(2):159-171.
2. Şahin MO, Canda AE, Mungan Mu, Kırkalı Z. 1,25-dihidroksi vitamin D3 ve reseptörlerinin insan kanserlerindeki yeri. *Türkiye Ekopatoloji Dergisi.*, 2000, 6(1-2): 73-79.
3. Yan GN, Lv YF, Guo QN. Advances in osteosarcoma stem cell research and opportunities for novel therapeutic targets. *Cancer Lett.*, 2016, 370(2):268-274.
4. Fan XL, Cai GP, Zhu LL, Ding GM. Efficacy and safety of ifosfamide-based chemotherapy for osteosarcoma: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.*, 2015, 9:5925-5932.
5. Li YS, Deng ZH, Zeng C, Lei GH. JNK pathway in osteosarcoma: pathogenesis and therapeutics. *J Recept Signal Transduct Res.*, 2016, 36(5):465-470.
6. ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.*, 2014, 25 Suppl 3: 113-123.
7. Li CJ, Liu XZ, Zhang L, Chen LB, Shi X, Wu SJ, Zhao JN. Advances in Bone-targeted Drug Delivery Systems for Neoadjuvant Chemotherapy for Osteosarcoma. *Orthop Surg.*, 2016, 8(2):105-110.
8. Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. Osteosarcoma: Current treatment and a collaborative pathway to Success. *J Clin Oncol.*, 2015, 33(27):3029-3035.

9. Shaikh AB, Li F, Li M, He B, He X, Chen G, Guo B, Li D, Jiang F, Dang L, Zheng S, Liang C, Liu J, Lu C, Liu B, Lu J, Wang L, Lu A, Zhang G. Present advances and future perspectives of molecular targeted therapy for osteosarcoma. *Int J Mol Sci.*, 2016, 17(4):506.
10. Chen R, Wang G, Zheng Y, Hua Y, Cai Z. Long non-coding RNAs in osteosarcoma. *Oncotarget.*, 2017, 8(12):20462-20475.
11. Zhang J, Yu XH, Yan YG, Wang C, Wang WJ. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. *Clin Chim Acta.*, 2015, 444:182-192.
12. Wang Z, Xu H, He M, Wu H, Zhu Y, Su Z. The association of glutathione S-transferase polymorphisms in patients with osteosarcoma: evidence from a meta-analysis. *Eur J Cancer Care (Engl.)*, 2015, 24(3):417-424.
13. Li J, Yang Z, Li Y, Xia J, Li D, Li H, Ren M, Liao Y, Yu S, Chen Y, Yang Y, Zhang Y. Cell apoptosis, autophagy and necroptosis in osteosarcoma treatment. *Oncotarget.*, 2016, 7(28):44763-44778
14. http://www.who.int/cancer/publications/WRC_2014/en/. 10 Aralık 2017.
15. [http://www.onkoloji.gov.tr/attachments/article/8653/Ana%20Rapor%202016%20\(v01.2\).pdf](http://www.onkoloji.gov.tr/attachments/article/8653/Ana%20Rapor%202016%20(v01.2).pdf). 14 Kasım 2018.
16. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.*, 2007, 14(7):1237-1243.
17. Sigerist HE. The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer. *Bull N Y Acad Med.*, 1932, 8(11):642-653.
18. Hashemi SA, Abediankenari S, Ghasemi M, Azadbakht M, Yousefzadeh Y, Dehpour AA. The Effect of Fig Tree Latex (*Ficus carica*) on Stomach Cancer Line. *Iran Red Crescent Med J.*, 2011, 13(4):272-275.

19. Akgül H, Tez M, Unal AE, Keşkek M, Sayek I, Özçelik T. Echinococcus against cancer: why not? *Cancer.*, 2003, 98(9):1999-2000.
20. Akdur R. Kanser epidemiyolojisi ve kanserden korunma ilkeleri. *Sağlık ve Sosyal Yardım Vakfı Dergisi.* 1993; Sayı: 4.
21. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2015, 7(12). pii: a006080.
22. Fulda S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol.*, 2015, 31:84-88.
23. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.*, 2007, 35(4):495-516.
24. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer.*, 2015, 14:48.
25. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 2015,16(6):2129-2144.
26. Sharma HP, Jain P, Amit P. Apoptosis (programmed cell death) - A review. *World Journal of Pharmaceutical Research.*, 2014, 3: 1854-1872.
27. DNA and disease cancer biology tutorial apoptosis. University of Bath. <http://www.bath.ac.uk/biosci/hejmadi/mooc/docs/apopnecroimage.html>. 14. Kasım.2018.
28. Julian L, Olson M. Apoptotic membrane dynamics in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton.*, 2015,7 133–142.

29. Marzban H, Del Bigio MR, Alizadeh J, Ghavami S, Zachariah RM, Rastegar M. Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front Cell Neurosci.*, 2015, 8:450.
30. Khan KH, Blanco-Codecido M, Molife LR. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 2014, 90(3):200-219.
31. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2015, 7(4). pii: a026716.
32. Wang J, Yang M, Li Y, Han B. The Role of MicroRNAs in the Chemoresistance of Breast Cancer. *Drug Dev Res.*, 2015, 76(7):368-374.
33. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.*, 2011, 30:87.
34. Sampson VB, Yoo S, Kumar A, Vetter NS, Kolb EA. MicroRNAs and Potential Targets in Osteosarcoma: Review. *Front Pediatr.*, 2015,3:69.
35. He F, Zhang W, Shen Y, Yu P, Bao Q, Wen J, Hu C, Qiu S. Effects of resection margins on local recurrence of osteosarcoma in extremity and pelvis: Systematic review and meta-analysis. *Int J Surg.*, 2016, 36(Pt A):283-292.
36. Vos HI, Coenen MJ, Guchelaar HJ, Te Loo DM. The role of pharmacogenetics in the treatment of osteosarcoma. *Drug Discov Today.*, 2016,21(11):1775-1786.
37. Li Z, Yu X, Shen J. Long non-coding RNAs: emerging players in osteosarcoma. *Tumour Biol.*, 2016, 37(3):2811-6.
38. Barolo MI, Ruiz Mostacero N, López SN. *Ficus carica* L. (Moraceae): an ancient source of food and health. *Food Chem.*, 2014, 164:119-127.

39. Tezcan G, Tunca B, Bekar A, Yalcin M, Sahin S, Budak F, Cecener G, Egeli U, Demir C, Guvenc G, Yilmaz G, Erkan LG, Malyer H, Taskapilioglu MO, Evrensel T, Bilir A. Ficus carica latex prevents invasion through induction of let-7d expression in GBM cell lines. *Cell Mol Neurobiol.*, 2015, 35(2):175-187.
40. J Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer.*, 2005, 5(3):231-7.
41. Pujari TA. Cocrystals of nutraceuticals: Protocatechuic acid and quercetin. Graduate Theses and Dissertations. University of South Florida.2009
42. Gülşen U. Gıda Analizlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler-I: HPLC. *Turkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics.*, 2016, 2(1):23-32.
43. Primer hücre kültürü uygulama kursu. Türkhaygen-1 projesi. 23-24 Ocak 2008.
44. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 1983, 65, 55–63.
45. <https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/PI-30006.pdf>. 14 Kasım 2018.
46. Tokur O, Aksoy A. In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg.*, 2017, 6 (1): 112-118.
47. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 1976, 72:248-254.
48. <https://www.gbiosciences.com/Bioassays/CytoScan-LDH-Cytotoxicity-Assay>. 14 Kasım 2018.

49. <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/roche/cytotoxicity-detection-kit-ldh.html>. 14 Kasım 2018.
50. <https://www.nzytech.com/products-services/molecularbiology/products/protein-electrophoresis-blotting/proteinquantification/mb19801/>. 14 Kasım 2018.
51. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol.*, 2014, 25(12):2689-701.
52. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/s7101?lang=en®ion=TR>
53. Van Heerde WL, Groot PG, Reutelingsperger CP. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb Haemost.*, 1995, 73(2):172-179.
54. [http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%2046003384MAN%20\[B\]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER'S%20GUIDE.pdf](http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100105%2046003384MAN%20[B]%20%20ANNEXIN%20V%20&%20DEAD%20CELL%20KIT%20100%20TEST%20USER'S%20GUIDE.pdf). 14 Kasım 2018.
55. Okutucu B, Pehlivan S. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *dergipark.*, 2003, 12:138.
56. <http://www.buykorea.org/product-details/GeneAll-Hybrid-R-RNA-purification-kit--3033522.html#pdi01>. 14 Kasım 2018.
57. http://www.geneall.com/goods_detail.php. 14 Kasım 2018.
58. https://www.thermofisher.com/documentconnect/documentconnect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/Qubit_ssDNA_Ass

ay_UG.pdf&title=User%20Guide:%20ubit%20ssDNA%20Assay%20Kit.

14 Kasım 2018.

59. http://www.geneall.com/goods_detail.php?goodsIdx=1806&Showno=0.

14 Kasım 2018.

60. Kanev MO, Muranlı Gökalg FD. Flow sitometri ve kullanım alanları. *SAÜ Fen Bil Der.*, 2016, 1: 33-38.

61. Cecchini, M. J., Amiri, M., Dick, F. A. Analysis of Cell Cycle Position in Mammalian Cells. *J. Vis. Exp.*, 2012, 59:3491,

62. Güneş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi.*, 2008, 2:73-78.

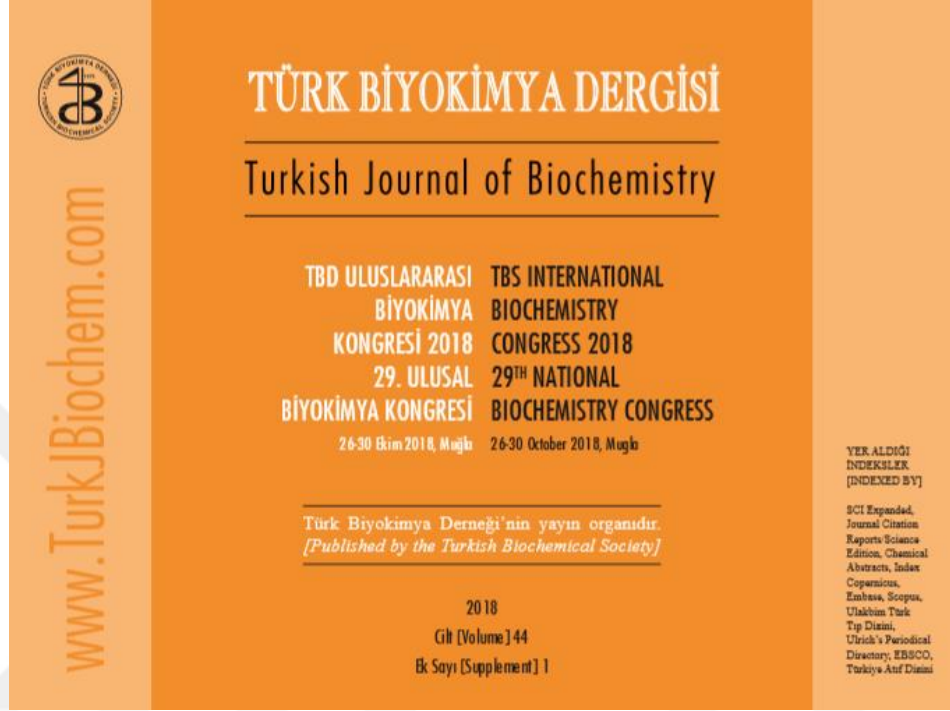
63. Zhang Y, Wan Y, Huo B, Li B, Jin Y, Hu X. Extracts and components of *Ficus carica* leaves suppress survival, cell cycle, and migration of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *Onco Targets Ther.*, 2018, 11:4377-4386.

64. Tokur O, Aksoy A. In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg.*, 2017, 1:112-118

65. Varshney J, Scott MC, Largaespada DA, Subramanian S. Understanding the osteosarcoma pathobiology: a comparative oncology approach. *Vet Sci.*, 2016, 3:1.

8.EKLER

EK-1. Ulusal Bilimsel Toplantıda Sunulan ve Bildiri Kitabında Özeti Basılan Bildiri



P-020 DETERMINATION OF PROTOCATECHUIC ACID WITH HPLC-DAD IN FICUS CARICA EXTRACT

Tuğba Yalçınkaya, Ender Şimşek, Özen Özensoy Güler, Ahmet Çarhan
Ankara Yıldırım Beyazıt University, Faculty of Medicine, Department of
Medical Biology, ANKARA

OBJECTIVES:Ficus carica (fig) is a fruit that grows in dry and temperate climates. (1). Ficus carica; It is rich in calcium, potassium, ascorbic acid, vitamin A, fatty acids and many phenolic acids (2). Phenolic compounds are components with anticarcinogenic, antioxidative, antimutagenic, free radical binding and lipid peroxidation inhibition (3).
MATERIALS and METHODS:In this study; the HPLC-DAD method was used to determine the amount of protocatechuic acid, one of the phenolic acids found in the content of the fig. In the study, the aqueous fraction of the Ficus carica fruit juice extract obtained in commercial form on the basis of water was prepared.
RESULTS:As a result of HPLC-DAD analysis, the amount of protocatechuic acid was measured as 7.30299×10^{-1} mg / L.
CONCLUSIONS:The results show that applied extraction and HPLC-DAD analysis can be used to determine the selectivity of the protocatechuic acid.
Keywords: {Ficus carica}, protocatechuic acid, amount of phenolic substance, high performance liquid chromatography (HPLC).

EK-2. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	:Tuğba YALÇINKAYA
Doğum tarihi	:01.12.1989
Doğum yeri	:ANKARA
Medeni hali	:BEKAR
Uyruğu	:T.C.
Adres	: Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tel	:05448820104
Faks	:
E-mail	:yalcinkayatugba@outlook.com
EĞİTİM	
Lise	: Özel Nene Hatun Fen Lisesi
Lisans	: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi
Yüksek lisans	
Doktora	
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: 61,25
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	

