



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ORİENTİN (OT) VE VICENİN-2'NİN (VC) AKCİĞER KANSER
HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE ETKİSİNİN İNCELENMESİ
VE SEMA 3F, NP-2 VE VEGF ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

HUDA ALCHAİB

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Prof.Dr. Sema USLU
İkinci Danışman :Prof.Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Eskişehir
Ocak 2021



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ORİENTİN (OT) VE VICENİN-2'NİN (VC) AKCİĞER KANSER
HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE ETKİSİNİN İNCELENMESİ
VE SEMA 3F, NP-2 VE VEGF ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

HUDA ALCHAİB

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Prof.Dr. Sema USLU
İkinci Danışman :Prof.Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Eskişehir
Ocak 2021

ÖZET

Orientin (ot) ve vicenin-2'nin (vc) akciğer kanser hücre hatları üzerinde etkisinin incelenmesi ve Sema 3F, NP-2, VEGF üzerinden araştırılması

Amaç: Akciğer kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir ve kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sıradadır. Akciğer kanseri etiyojisi, sigaranın neden olduğu esas olarak genetik ve epigenetik hasardır. Son araştırmalara göre, Hint Kutsal Fesleğeninden elde edilen suda çözünür iki flavonoid olan orientin (Ot) ve vicenin-2 (Vc), anti-proliferatif ve anti-anjiyojeniklerin yanı sıra apoptozu indüklemeyi durdurarak antitümör olarak işlev görebilir. Çalışmanın amacı orientin ve vicenin-2'in A549 hücrelerinin büyümesi ve apoptozisi üzerindeki etkisini araştırmak ve Sema 3F, VEGF ve Np-2 üzerindeki etkilerini incelemektir.

Material metod: Bileşiklerimizin A549 (kansere hücre hattı) ve CCD-19 ve L929'a (normal hücre hatları) karşı sitotoksitesini MTT testi ile, apoptotik etkileri ise akış sitometri metotları ile belirlenmiştir. Bileşiklerimizin A549 hücrelerinde apoptotik ve hücre proliferasyonunda yer alan genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi gerçek zamanlı PCR ile çalışılmıştır.

Sonuçlar: Bu çalışmada orientin ve vicenin-2, A549 hücre hattına karşı antikanser aktivite gösterdi, a) A549 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır ($p < 0.001$), b) sağlıklı hücreler üzerinde MTT testlerinde düşük toksisite göstermiştir c) akış sitometri deneylerinde hem erken hem de geç apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Orientin ile muamele edilmiş hücrelerde apoptozla ilişkili proteinlerin Bax ekspresyonları artarken, antiapoptotik Bcl-2 ekspresyonu azalmıştır, e) Orientin, artan hücre göçü ve metastaz ile ilişkili VEGF etkisini de bloke edebilen tümör baskılayıcı gen SEMA3f'yi yukarı düzenlemiştir. f) Orientin'in akciğer kanserinde aşırı eksprese edilen Nörofilin-2'yi önemli ölçüde aşağı regüle ettiği gösterilmiştir. g) PERK ve ERK genlerini de aşağı regüle ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, orientin'in ve daha az ölçüde vicenin-2 antitümör, özellikle de apoptotik etkilerine in vitro kanıtlar sağlamıştır. Akciğer kanserinde anti-kanser ajan olarak maksimum potansiyeli daha fazla araştırmak için orientin ve vicenin-2 üzerinde daha fazla prelinik denemelere ihtiyaç duyulmaktadır.

ANAHTAR KELİME: Akciğer, Kanser, Orientin, Vicenin-2, VEGF, Sema 3F, Np-2

ABSTRACT

Investigation of Orientin and Vicenin-2's effect on Lung cancer cell lines as anticancer agents and their relationship with Sema 3F, NP-2 and VEGF

Aim: Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths in males and second after breast cancer in females. Lung cancer etiology is mainly genetic and epigenetic damage caused by smoking. According to recent studies, orientin (Ot) and vicenin-2 (Vc), two water-soluble flavonoids extracted from Indian Holy Basil, can function as antitumor by stopping inducing apoptosis, as well as anti-proliferative and anti-angiogenic. The aim of the study was to investigate the effect of orientin and vicenin-2 on the growth and apoptosis of A549 cells and to study their effect on Sema 3F, VEGF and Np-2.

Material methods: The cytotoxicity of our compounds against A549 (cancer cell line) and CCD-19 and L929 (normal cell lines) was determined by MTT assay and their apoptotic effects were determined by flow cytometry methods. Our compounds effect on expression levels of genes involved in apoptotic and cell proliferation on A549 cells was studied with Real time PCR.

Results: In this study, orientin and vicenin demonstrated anticancer activity against the A549 cell line, a) significantly reduced viability of A549 cells ($p < 0.001$), b) low toxicity in MTT tests on healthy cells c) inducing both late and early apoptosis by flow cytometry experiments has been observed. In orientin treated cells Bax expressions of apoptosis-related proteins increased, while antiapoptotic Bcl-2 expression decreased, e) orientin up-regulates tumor suppressor gene Sema 3F, which can also block VEGF effect associated with increased cell migration and metastasis. f) orientin has also been shown to significantly down-regulate neuropilin-2, which is overexpressed in lung cancer. g) It has also been shown to down-regulate the PERK and ERK genes. These results provided in vitro evidence of orientin's and to a lesser extent vicenin's antitumor particularly apoptotic effects. Further preclinical trials on the orientin and the vicenin-2 are needed to further investigate the maximum potential as an anti-cancer agent in lung cancer.

KEYWORDS: Lung, Cancer, Orientin, Vicenin, Sema 3F, VEGF, NP-2

TEŞEKKÜR SAYFASI

Yüksek lisans çalışmalarımın bana rehberlik eden tüm tavsiyeler, fikirler, manevi destek ve bu araştırma alanında gelişme fırsatı veren Sayın Prof.Dr. Sema USLU ve Sayın Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ'ye

Yüksek lisans boyunca araştırmaya katılan ve bu araştırmanın mümkün olmasını sağlayan laboratuvar arkadaşım Biochem. Zennure Şevval ÇIYANCI'ya

Araştırma çalışması boyunca içten destek veren ve bana çok öğreten hocam ve arkadaşım Dr. Bio Şennur GÖRGÜLÜ'ye

Ayrıca analiz konusunda tavsiyelerde bulunan ve eğitimim süresinde her konuda destek veren ve yardım eden Dr. Fatih Kar'a Hayatımın her anında bana olan sevgileri, duaları, ilgileri ve fedakarlıkları için babama ve anneme

Eğitim süresince desteklerini benden esirgemeyen kardeşlerime, arkadaşlarıma

Son olarak, araştırma çalışmasını doğrudan veya dolaylı olarak tamamlamama destek olan herkese teşekkür ederim.

Huda ALCHAIB

18.01.2021

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAYI SAYFASI	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	vii
TEŞŞEKÜR SAYFASI	vii
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Akciğer Kanseri	2
2.1.1. Akciğer kanserin risk faktörleri	3
2.1.1.1. Sigara içmek.....	3
2.1.1.2. Çevresel faktörler	3
2.1.1.3. Kalıtsal faktörler	4
2.1.2. Akciğer kanser tedavi yöntemleri.....	4
2.2. Kanserde Genler.....	4
2.2.1. Onkogenler, proto-onkogenler ve işlevleri	5
2.2.1.1. Büyüme faktörleri	5
2.2.1.2. Büyüme faktörleri reseptörü.....	5
2.2.1.3. Sinyal dönüştürücü	6
2.2.1.4. Transkripsiyon faktörleri.....	7
2.2.1.5. Programlanmış hücre ölüm regülasyonu (Apoptoz regülatörü)	7
2.2.2. Onkogen Aktivasyon Mekanizmaları.....	8
2.2.3. Akciğer Kanseri Onkogenleri.....	9
2.3. Hücre Ölüm Yolakları.....	9
2.3.1. Apoptoz.....	9
2.3.1.1. Apoptozun Ana Bileşeni.....	10
2.3.1.1.1. Kaspaz.....	10
2.3.1.1.2. TNF Ailesi	11
2.3.1.1.3. Bcl-2 Ailesi.....	12
2.3.1.2. Apoptotik yollar	13

2.3.1.2.1. İnstrinsik Yolak	13
2.3.1.2.2. Ekstrinsik yol.....	14
2.4. Semaforinler.....	15
2.5. Flavonoidler	18
2.5.1. Orientin.....	20
2.5.1.1. Orientin Yapısı	20
2.5.1.2. Tıbbi Özellikler.....	21
2.5.1.2.1 Antioksidan ve Yaşlanma Karşıtı Etkisi.....	21
2.5.1.2.2. Radyokoruyucu Etkisi	21
2.5.1.2.3. Nöroprotektif veya Antidepresan Benzeri Etki	21
2.5.1.2.4. Antiadipogenez Etkisi.....	21
2.5.1.2.5. Antinosiseptif Etki	22
2.5.1.2.6. Antiinflamatuvar Etki	22
2.5.1.2.7. Antitümör Etkisi	22
2.5.2. Vicenin-2-2.....	23
2.5.2.1. Vicenin-2'in yapısı	23
2.5.2.2. Tıbbi özellikler.....	24
2.5.2.2.1. Antiseptik etki.....	24
2.5.2.2.2. Anti-enflamatuvar etkileri.....	24
2.5.2.2.3. Radyo-koruyucu Etki.....	24
2.5.2.2.4. Antitrombotik ve antiplatelet Etkisi	24
2.5.2.2.5. Antitümör aktivitesi.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
3.1. Materyaller	26
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler.....	26
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	27
3.1.3. Hücre hatları.....	28
3.2. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması.....	28
3.2.1. Orientin hazırlanması.....	28
3.2.2. Vicenin-2 hazırlanması	29
3.2.3. Sisplatin hazırlanması.....	29
3.3. Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Deneye Hazırlık.....	29
3.3.1. Materyal Sterilizasyonu	29

3.3.2.	<i>Hücrelerin stoklanması ve pasajlanması</i>	29
3.3.3.	<i>Hücre hatları sayımı</i>	30
3.4.	Metodlar	30
3.4.1.	<i>Hücre kültürü</i>	30
3.4.2.	<i>MTT analizi</i>	31
3.4.2.1.	<i>Yöntemin uygulanması</i>	31
3.4.2.1.1.	<i>Yöntemin uygulanması</i>	33
3.4.2.2.	<i>Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi</i>	33
3.4.2.2.1.	<i>Yöntemin uygulanması</i>	34
3.4.2.3.	<i>Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkilerin belirlenmesi</i>	34
3.4.2.3.1.	<i>Yöntemin uygulanması</i>	34
3.4.3.	<i>RT- PCR Yöntemi ile Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK, VEGF, SEMA 3F and NP2 genlerinin ifadelerinin belirlenmesi</i>	35
3.4.4.	<i>Etidyum Bromür ve Akridin Oranj ile çift boyama</i>	41
3.4.5.	<i>ELISA</i>	41
3.4.5.1.	<i>Yöntemin tanımlaması</i>	41
3.4.5.1.1.	<i>ELISA ile İnsan Nörofilini-2'nin kantitatif tespiti</i>	42
3.4.5.1.2.	<i>İnsan Semaforini 3F'nin ELISA ile kantitatif tespiti</i>	42
3.4.5.1.3.	<i>ELISA ile İnsan Büyüme faktörünün kantitatif tespiti</i>	42
4.	BULGULAR	43
4.1	MTT Sonuçları	43
4.1.1.	<i>Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 bileşiklerin A549 Akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri</i>	43
4.1.2.	<i>Orientin ve Vicenin-2 bileşiklerin CCD-19Lu Akciğer sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri</i>	45
4.1.3.	<i>Orientin ve Vicenin-2 bileşiklerin L929 sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri</i>	46
4.1.4.	<i>A549 hücre hattının CCD-19Lu hücre hattına göre selektivite indeksi</i>	48
4.2.	Hücre Ölümünün Floresan Mikroskopu Analizi Akridin turuncusu Etidyum bromür (AO / EB) Çift Boyama	49
4.3.	Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2, Akım Sitometrisi Yöntemleri ile A549 Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi	50

4.3.1.	Akım sitometrisinde Annexin-V FITC-PI analizi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi.....	50
4.3.1.1.	A549 hücre hattı üzerinde sisplatin, orientin ve Vicenin-2 uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi.....	50
4.3.1.2.	A549 hücre hattı üzerinde sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi	53
4.3.2.	Akım sitometrisinde JC-1 analizi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi. 59	
4.3.2.1A549 hücre hattı üzerinde Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi.....	59
4.3.2.2.	A549 hücre hattı üzerinde Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi.....	62
4.3.3.	Akım sitometrisinde kaspaz-3 analizi ile kaspaz aktivitesinin belirlenmesi.....	68
4.3.3.1.	A549 hücre hatları üzerinde 24. Saatte kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi	68
4.3.3.2.	A549 hücre hatları üzerinde 48. Saatte kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi	71
4.4.	Enzim Bağlı Immünosorbent Deneyi	77
4.4.1.	ELISA ile İnsan Nörofilini-2'nin kantitatif tespiti	77
4.4.2.	ELISA ile İnsan SEMA F'nin kantitatif tespiti	79
4.4.3.	ELISA ile VEGF'nin kantitatif tespiti	81
4.5.	RT-PCR (Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) analiz sonuçları	83
4.5.1.	RT-PCR (Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) 24. Saattaki analiz sonuçları.....	83
4.5.2.	RT-PCR (Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) 48. Saattaki analiz sonuçları.....	87
5.	TARTIŞMA.....	92
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	100
	KAYNAKLAR DİZİNİ	101
	ÖZGEÇMİŞ.....	110

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1.	RT-PCR analizi primerleri.....	38
Tablo 3.2.	RT-PCR bileşenleri.....	40
Tablo 4.1.	Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 A549 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	43
Tablo 4.2.	Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 CCD-19Lu hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	45
Tablo 4.3.	Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 L929 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	46
Tablo 4.4.	24. Saat IC ₅₀ değerlerine göre A549 hücre hatlarının CCD-19lu hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC ₅₀ değeri / Kanserli hücre IC ₅₀ değeri).....	48
Tablo 4.5.	24. Saat IC ₅₀ değerlerine göre A549 hücre hatlarının L929 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC ₅₀ değeri / Kanserli hücre IC ₅₀ değeri).....	48
Tablo 4.6.	A549 hücre hatlarının 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	56
Tablo 4.7.	Sisplatinin A549 hücre hatlarının üzerindeki 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	56
Tablo 4.8.	Orieninin A549 hücre hatlarının üzerindeki 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	56
Tablo 4.9.	Vicenin-2in A549 hücre hatlarının üzerindeki 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	57
Tablo 4.10.	A549 hücre hatlarının 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	57
Tablo 4.11.	Sisplatinin A549 hücre hatlarının üzerindeki 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	57
Tablo 4.12.	Orieninin A549 hücre hatlarının üzerindeki 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V ITC.....	58

Tablo 4.13.	Vicenin-2in A549 hücre hatlarının üzerindeki 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	58
Tablo 4.14.	A549 hücre hatlarının 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri	65
Tablo 4.15.	Sispatinin A549 hücre hatlarının 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite.....	65
Tablo 4.16.	Orientinin A549 hücre hatlarının 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite.....	65
Tablo 4.17.	Vicenin-2in A549 hücre hatlarının 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite.....	66
Tablo 4.18.	A549 hücre hatlarının 48. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite.....	66
Tablo 4.19.	Sispatinin A549 hücre hatlarının 48. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite.....	66
Tablo 4.20.	Orientinin A549 hücre hatlarının 48. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite.....	67
Tablo 4.21.	Vicenin-2in A549 hücre hatlarının 48. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite.....	67
Tablo 4.22.	A459 hücre hattındaki (kontrol) kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.....	74
Tablo 4.23	Sisplatin A549 hücre üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.....	74
Tablo 4.24.	Orientinin A549 hücre üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.....	74
Tablo 4.25.	Vicenin-2in A549 hücre üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.....	75
Tablo 4.26.	A459 hücre hattındaki (kontrol) kaspaz-3 48. Saatteki % aktivasyonları.....	75
Tablo 4.27.	Sisplatin A549 hücre üzerindeki kaspaz-3 48. Saatteki % aktivasyonları.....	75
Tablo 4.28.	Orientinin A549 hücre üzerindeki kaspaz-3 48. Saatteki % aktivasyonları.....	76
Tablo 4.29.	Vicenin-2in A549 hücre üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.....	76

Tablo 4.30.	A549 hücrelerinde Neurophillin-2'nin ELISA analizinin istatistiksel analizi	77
Tablo 4.31.	A549 hücrelerinde SEMA 3F'nin ELISA analizinin istatistiksel analizi.....	79
Tablo 4.32.	VEGF'in A549 hücrelerinin ELISA analizinin istatistiksel analizi	81



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1.	Orientin yapısı.....	20
Şekil 2.2.	Vicenin-2 yapısı.....	23
Şekil 3.1.	MTT molekülünün mitokondriyal redüktaz analiz sonunda formazan kristaline dönüşümü.....	31
Şekil 4.1.	Orientin ve Vicenin-2'in MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra A549 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri.....	44
Şekil 4.2.	Orientin ve Vicenin-2'in MTT testi kullanılarak 24 saat sonra CCD19-Lu hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri.....	45
Şekil 4.3.	Orientin ve Vicenin-2'in MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra L929 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri.....	47
Şekil 4.4.	Orientin'in varlığında veya yokluğunda insan akciğer kanseri hücrelerinin akridin turuncusu / etidyum bromürü (Çift boyama) hücresel boyanması	49
Şekil 4.5.	A549 hücre popülasyonu içersinden ve seçilen ana kapı ve kontrol	50
Şekil 4.6	Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC ₅₀ konsantrasyonun apoptotik etkileri.....	50
Şekil 4.7.	Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC ₂₅ IC ₅₀ ve IC _{50*2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.....	51
Şekil 4.8.	Vicenin-2in A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC ₂₅ IC ₅₀ ve IC _{50*2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.....	52
Şekil 4.9.	A549 hücre popülasyonu içersinden ve seçilen ana kapı ve kontrol	53
Şekil 4.10.	Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC ₅₀ konsantrasyonun apoptotik etkileri.....	53
Şekil 4.11.	Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC ₂₅ IC ₅₀ ve IC _{50*2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.....	54
Şekil 4.12.	Vicenin-2in A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC ₂₅ IC ₅₀ ve IC _{50*2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.....	55
Şekil 4.13.	A549 hücre popülasyonu içersinden ve seçilen ana kapı ve kontrol.....	59

Şekil 4.14.	Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{50} konsantrasyonunun mitokondriyal membran aktiviteleri.....	59
Şekil 4.15.	Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{25} IC_{50} ve IC_{50*2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri.....	60
Şekil 4.16.	Vicenin-2in A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{25} IC_{50} ve IC_{50*2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri.....	61
Şekil 4.17.	A549 hücre popülasyonu içersinden ve seçilen ana kapı ve kontrol.....	62
Şekil 4.18.	Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC_{50} konsantrasyonunun mitokondriyal membran aktiviteleri.....	62
Şekil 4.19.	Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC_{25} IC_{50} ve IC_{50*2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri.....	63
Şekil 4.20.	Vicenin-2in A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC_{25} IC_{50} ve IC_{50*2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri.....	64
Şekil 4.21.	A549 hücre popülasyonu içersinden ve seçilen ana kapı ve kontrol	68
Şekil 4.22.	Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{50} konsantrasyonunun kaspaz-3 aktiviteleri.....	68
Şekil 4.23.	Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{25} IC_{50} ve IC_{50*2} konsantrasyonlarının kaspaz-3 aktiviteleri	69
Şekil 4.24.	Vicenin-2in A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{25} IC_{50} ve IC_{50*2} konsantrasyonlarının kaspaz-3 aktiviteleri.....	70
Şekil 4.25.	A549 hücre popülasyonu içersinden ve seçilen ana kapı ve kontrol	71
Şekil 4.26.	Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC_{50} konsantrasyonunun kaspaz-3 aktiviteleri	71
Şekil 4.27.	Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC_{25} IC_{50} ve IC_{50*2} konsantrasyonlarının kaspaz-3 aktiviteleri.....	73
Şekil 4.28.	Vicenin-2 A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC_{25} IC_{50} ve IC_{50*2} konsantrasyonlarının kaspaz-3 aktiviteleri	74

Şekil 4.29.	Cisplatin ile muamele edilmiş hücrelerde B. Orientin ile muamele edilmiş hücrelerde C. Vicenin-2 ile muamele edilmiş hücrelerde Np-2'nin ELISA analizinin istatistiksel analizi.....	78
Şekil 4.30.	Cisplatin ile muamele edilmiş hücrelerde B. Orientin ile muamele edilmiş hücrelerde C. Vicenin-2 ile muamele edilmiş hücrelerde Sema 3F'nin ELISA analizinin istatistiksel analizi.....	80
Şekil 4.31.	Cisplatin ile muamele edilmiş hücrelerde B. Orientin ile muamele edilmiş hücrelerde C. Vicenin-2 ile muamele edilmiş hücrelerde VEGF'nin ELISA analizinin istatistiksel analizi.....	82
Şekil 4.32.	24 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in NP-2 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	83
Şekil 4.33.	24 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in VEGF geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	84
Şekil 4.34.	24 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in SEMA 3F geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	84
Şekil 4.35.	24 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in Bax geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	85
Şekil 4.36.	24 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in CYD1 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	85
Şekil 4.37.	24 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in Bcl-2 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	86
Şekil 4.38.	24 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in PERK geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	86
Şekil 4.39.	24 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in ERK geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	87
Şekil 4.40.	48 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in NP-2 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	87
Şekil 4.41.	48 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in VEGF geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	88
Şekil 4.42.	48 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in SEMA 3F geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	88
Şekil 4.43.	48 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in Bax geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	89

Şekil 4.44.	48 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in CYD1 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	89
Şekil 4.45.	48 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in Bcl-2 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	90
Şekil 4.46,	48 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in PERK geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi.....	90
Şekil 4.47.	48 saatteki Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in ERK geninin mRNA ekspresyonu üzerine etki.....	91



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
SEMA 3F	: Semaforin 3F
NP-2	: Nörofilin 2
SCLC	: Küçük hücreli akciğer kanseri
NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
CT	: Computed tomography scanning
ANOVA	: Varyans analizi
ATCC	: Amerikan tip kültür koleksiyonu
ATM	: Mutant ataksi telanjiektazi geni
ATP	: Adenozin tirifostfat
BAX	: Bcl-2 bağlı protein
BCR	: Kesme noktası küme protein
PDGF	: Trombosit türevli büyüme faktörü
CYD-1	: Sitokinez defektif 1
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar
RAF-1	: Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
FBS	: Fötal sığır serumu
GTP	: Guanozin tri fosfat
IAP	: Apoptoz protein inhibitörleri
IC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan doz
IC _{50/2}	: Maksimum inhibisyonun %25'sini oluşturan doz
A549	: İnsan Akciğer kanseri hücre hattı
CCd-19lu	: İnsan sağlıklı Akciğer hücre hattı
L-929	: Sağlıklı fare fibroblastik hücre hattı
MAP	: Mitojenle aktiveleşen kinazlar
NGF	: sinir büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
TK	: Tyrozin kinaz

MTT	: Thiazolyl Blue Tetrazolyum Bromide
NIH/3T3	: Sağlıklı fare embriyo fibroblastik hücre
NTP	: Nükleotid tri fosfat
OD	: Optik densite
P53	: Protein 53
PBS	: Fosfat tuz tampon çözeltisi
PCR	: Polimeyaz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik nükleik asit
RPE	: Rölatif proliferatif etki
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
SERM	: Seçici östrojen modülatörü
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNF-R	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TNF α	: Tümör nekroz faktörü alfa
UV	: Ultra viole
$\Delta\Psi_m$: Mitokondriyal membran potansiyeli
RTK	: Receptor Tyrosine Kinase
STAT	: Signal transducer and activator of transcription protein
LPS	: Lipopolysaccharides
RTK	: Receptor tyrosine kinase
Apo2L/TRAIL	: TNF-related apoptosis-inducing ligand
MAPK	: Mitojen active edişlmış protein kinaz
ROS	: Reactive oxygen species
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
HUVEC	: Human umbilical vein endothelial cells
TLR4	: Toll-like receptor 4
FADD	: Fas-associated protein with death domain

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü 2018 istatistiklerine göre Akciğer kanseri insidans ve mortalite açısından en önde gelen kanser türlerinden biridir. Ayrıca akciğer kanseri, dünya çapında kötü prognoz nedeniyle en fazla ölüme neden olmaktadır .

Antikanser ilaçlar geliştirmek amacı ile yapılan sentez ve etki çalışmaları incelendiğinde, orientin ve vicenin-2 flavonoid bileşiklerin antikanser etki potansiyellerinin yüksek olduğu görülmektedir. Orientin (Ot) ve vicenin-2 (Vc), Hint kutsal fesleğeninden (Ocimum sanctum) ve dünyanın farklı bölgelerindeki bazı bitkilerden izole edilmiş suda çözünür flavonoidlerdir.

Bu çalışmada ise A549 insan akciğer karsinoma hücreleri üzerinde orientin ve vicenin-2 sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi ve etki mekanizmalarının Sema 3F, VEGF gen düzeyinde aydınlatılması amaçlanmıştır. Ayrıca orientin ve vicenin-2 selektiviteleri normal insan hatları üzerinde belirlenecektir.

Bu çalışmada, orientin ve vicenin-2'nin Akciğer kanser hücreleri üzerindeki antitümör etkisinin ve Semaforin 3F, reseptörü NP-2 ve VEGF arasındaki ilişkinin olup olmadığını araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Normal akciğer dokusu, trakea ve bronşların bazal mukoza salgı hücreleri, bronşiyollerin Clara hücreleri, tip 1 ve tip 2 alveollerin pnömositleri gibi çeşitli hücre tiplerinden oluşur (Eramo ve ark. 2008).

Dünya Sağlık Örgütü 2018 istatistiklerine göre Akciğer kanseri insidans ve mortalite açısından en önde gelen kanser türlerinden biridir (12.8). Ayrıca akciğer kanseri, dünya çapında kötü prognoz nedeniyle en fazla ölüme (% 17.8) neden olmaktadır (Travis ve ark. 2015).

Akciğer kanseri, dünyada kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedenidir. Terapötik etkileri iyileştirmek için yapılan farklı girişimlere rağmen, şu ana kadar hiçbir iyileşme oranı elde edilememiştir, bu yüzden hayatta kalma oranları% 15'in altında kalmıştır (Eramo ve ark. 2008).

Akciğer kanseri, tümör histolojisine göre küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) veya küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) olarak kategorize edilir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, adenokarsinom, yassı hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomu içeren üç histolojik sınıfa ayrılmaktadır (Hodgson ve ark. 2000).

Gelişmiş ülkelerde sigara tüketiminde kadın ve erkek arasındaki tarihsel ve sosyal farklılıklar nedeniyle, erkeklerde insidans ve mortalite oranları kadınlardan daha yüksektir (Y. Mao 2016) (Bilello, Murin, and Matthay 2002).

Akciğer kanseri insidansı ve mortalite oranları da etnik kökene göre farklılık göstermektedir. 2012 yılında, siyah Amerikalılar 100.000'de 62 en yüksek insidans oranına ve 100.000'de 48.4 en yüksek mortalite oranlarına sahipken, Hispanikler 100.000'de 28 en düşük ve mortalitede 100.000'de en düşük 19.4 oranına sahiptir (Collins and Haines 2014).

Çoğu akciğer kanseri ileri bir aşamada keşfedilir ve akciğer kanserlerinin sadece% 15'inin erken aşamalarda keşfedilmesi, dismal prognozdan sorumlu olabilir. Bu nedenle, Düşük doz CT görüntüleme ve etkili biyobelirteçler kullanarak yüksek riskli popülasyonları tarayarak erken tanı, akciğer kanseri hastalarının sağkalımını iyileştirebilir (Joo ve ark. 2011).

2.1.1. Akciğer kanserin risk faktörleri

Araştırmalar, tütün kullanımı, radon maruziyeti, iç ve dış hava kirliliği, görece zararlı mesleki maruziyet, kalıtsal duyarlılık, radyasyon maruziyeti ve dengesiz diyetin akciğer kanseri insidansının artmasından sorumlu olduğunu bulmuştur. Bu bulgular akciğer kanserini etiyolojik seviyeden önlememize yardımcı olabilir. Akciğer kanseri insidansını azaltmak için tütün kullanımı kısıtlama yasası, hava kirliliği kontrolü ve gençlerin sigarayı önleme eğitimi gibi etkili ve pratik halk sağlığı politikası oluşturulmalıdır (Y. Mao 2016).

2.1.1.1. Sigara içmek

Akciğer kanseri için baskın risk faktörü (sigara içmeyenlere kıyasla relatif risk [RR] = 10 ila 30). Bu nedenle, herhangi bir popülasyonda akciğer kanseri insidansı, o popülasyonun sigara içme alışkanlıklarına bağlıdır (Bilello, Murin, and Matthay 2002) (Brownson ve ark. 1998) (Joo ve ark. 2011).

2.1.1.2. Çevresel faktörler

Çoğunlukla araç egzozu, ısıtma sistemleri ve endüstriyel yanan atıklardan kaynaklanan açık hava kirliliği, dekoratif ve inşaat malzemelerinden pişirme dumanı, formaldehit ve benzen ve tütün dumanı gibi iç mekan kirliliği kaynakları ciddi bir çevresel risk faktörüdür. Bazı ekolojik çalışmalar, akciğer kanserinin% 50'sinden fazlasının kirli hava nedeniyle kentsel alanlarda endüstriyel kaynaklardan ve araçlardan görüldüğünü bulmuştur (Samet ve ark. 2009) (Hobbins ve ark. 2016).

2.1.1.3. Kalımsal faktörler

Çevresel ve fiziksel faktörlerin yanı sıra, genetik de Akciğer kanserinin gelişiminde fakat daha az oranda önemli kuluçka faktörleridir. Fakat kalımsal faktörün akciğer sporadik kanserine toplam katkısı, diğer risk faktörlerinin ortaya çıkmasına bağlıdır. (Susan 2017)(England 2000). Sigara içmeyenlerde EGFR, KRAS, P53 ve ALK gibi genlerdeki akciğer kanseri genetik değişiklikleri bu sigara içenlerden farklıdır (Joo ve ark. 2011).

2.1.2. Akciğer kanser tedavi yöntemleri

Tedavi tümör histolojisine, tanı aşamasına ve hastanın fonksiyonel değerlendirmesine göre değişir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri primer tedavisinin ilk üç aşaması, bitişik tedavi ile veya tedavisiz cerrahi (rezeksiyon) içerir. Kemoterapi, küçük hücreli karsinom ve genellikle KHDAK'nin üçüncü ve dördüncü aşaması olan rezektabl küçük hücreli olmayan karsinom için çapa tedavisidir (Collins and Haines 2014).

2.2. Kanserde Genler

Kansere onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve mikroRNA genlerindeki değişiklikler neden olur. Bu değişiklikler genellikle somatik olaylardır, ancak germ hattı mutasyonları bir kişiyi kalımsal veya ailesel kansere yatkın hale getirebilir. Malign bir tümörün gelişimi için nadiren tek bir genetik değişiklik yeterlidir. Çoğu kanıt, kanser hücrelerinde genellikle çok sayıda onkogen, tümör baskılayıcı gen veya mikroRNA geninde çok aşamalı bir ardışık değişiklik sürecine işaret eder (Croce 2008).

Önceki tüm çalışmalar, onkogen ekspresyonunun sadece kanser başlangıcı için değil, aynı zamanda hastalığın sürdürülmesi için de gerekli olduğunu göstermiştir ve onkogenleri merkezi anti-kanser terapötik hedefleri olarak dikkat çekmektedir. Onkojenik ekspresyon, genetik olarak tasarlanmış fare modellerinde dokuya özgü promotörler tarafından yönlendirildiğinde, tümörler yüksek frekansta

ortaya çıkar, ancak uyarıcı uyarı kapatıldığında geriler (Boxer ve ark. 2004) (Jonkers and Berns 2004) (Vicente-duen ve ark. 2013).

2.2.1. Onkogenler, proto-onkogenler ve işlevleri

Proto-onkogenler hücre büyümesinin kontrolünde yer alan proteinleri kodlar. Proto-onkogenlerin yapısının değiştirilmesi ve / veya ekspresyonu, onları duyarlı hücrelerde neoplastik fenotipi indükleyebilen onkogenler haline getirebilir. Onkogenler, normal muadillerinin (proto-onkogenler) protein ürünlerinin fonksiyonel ve biyokimyasal özelliklerine dayanarak beş gruba ayrılabilir. Bu gruplar (1) büyüme faktörleri, (2) büyüme faktörü reseptörleri, (3) sinyal transdüserleri (dönüştürücü) (4) transkripsiyon faktörleri ve (5) programlanmış hücre ölüm düzenleyicileri dahil olmak üzere diğerlerdir (Pierotti, Sozzi, and Croce 2003).

2.2.1.1. Büyüme faktörleri

Büyüme faktörleri, hedef hücrelerin proliferasyonunu uyarmak ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), fosfolipaz C- γ , ve sinyal transdüktörleri ve transkripsiyon (STAT'lar) veya SMAD proteinlerinin aktivatörleri ve transkripsiyon faktörleri, gibi hücre içi sinyal yollarının spesifik kombinasyonlarını uyarmak için hücre dışı sinyaller olarak işlev gören salgılanan polipeptitlerdir. Bu hücre aktivasyon modülleri ve ilgili GF'ler, tümör ilerlemesinin çeşitli aşamalarında birlikte seçilir. Büyüme faktörlerinin iyi tanımlanmış dört örneği vardır: trombositten türetilmiş büyüme faktörü (PDGF), sinir büyüme faktörü (NGF), epidermal büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü (Witsch, Sela, ve Yarden 2010).

2.2.1.2. Büyüme faktörleri reseptörü

Bazı viral onkogenler, intrinsik tirozin kinaz (TK) aktivitesine sahip olan normal büyüme faktörü reseptörlerinin değiştirilmiş versiyonlarıdır. RTK'lar, bilgiyi hücre zarı boyunca tek yönlü bir şekilde ileten moleküler makinelerdir. Bir büyüme faktörünün reseptörün hücre dışı ligand bağlanma alanına bağlanması, genellikle

dimerizasyondan sonra, RTK ile fiziksel olarak etkileşen aşağı akış proteinlerinin aktivasyonuna yol açan hücre içi TK katalitik alanının aktivasyonu ile sonuçlanır, esas olarak mitojenle aktive edilen protein kinazlar (MAPK'lar) yolu, PI3K / AKT eksenini ve STAT proteinleri ile temsil edilir (Croce 2008). Bu yollar, spesifik RTK'ya bağlı olarak, genelde anormal hücre çoğalmasına ve apoptozdan kaçmasına neden olarak farklı şekilde aktive edilir (Montor, Salas, and de Melo 2018).

RTK listesi ERB B1, ERB B2, FMS, KIT, MET, RET, ROS, ALK ve TRK'yı içerir ve bunlar genellikle tümör tipine bağlı olarak farklı mekanizmalar yoluyla onkojenlere dönüştürülebilir (Hynes and Lane 2005). ERB B1 (epidermal büyüme faktörü reseptörü — EGFR), küçük hücreli olmayan akciğer kanserinden (NSCLC) etkilenen hastaların bir alt grubundaki TK alanındaki nokta mutasyonları ile ligand bağlayıcı alanın silinmesiyle onkojenik olarak aktive edilebilir (Bethune ve ark. 2010).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), gen transkripsiyonunun hipoksiye bağımlı kontrolünü düzenler. VEGF'nin aktivitesine üç reseptör tirozin kinaz aracılık eder: VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (FLK1-KDR) ve VEGFR3 (FLT4). VEGF, çeşitli kanserlerde anjiyogenezi uyarır ve bu nedenle VEGF ve VEGFR inhibitörleri geliştirilmiştir (Witsch, Sela, and Yarden n.d.). Bevacizumab bir monoklonal anti-VEGF antikorudur ve küçük bir molekül olan SU5412, VEGFR1 ve VEGFR2'nin reseptör tirozin kinazlarının yanı sıra PDGF reseptörü ve KIT'in kinazlarını bağlar (Yu Yang ve ark. 2011) (Witsch, Sela, and Yarden 2010).

2.2.1.3. Sinyal dönüştürücü

Mitojenik sinyaller, toplu sinyal iletim kaskadı olarak adlandırılan bir dizi kompleks bağlanma yoluyla hücre yüzeyi üzerindeki RTK'dan hücre çekirdeğine iletilir (Croce 2008).

Birçok proto-onkogen, sinyal iletim yollarının üyeleridir. Bunlar iki ana gruptan oluşur: 1. reseptör olmayan protein kinazlar ve 2. guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinler. A. Reseptör olmayan protein kinazlar TK'lere (örn., ABL, LCK ve SRC) ve serin / treonin kinazlara (örn., RAF-1, MOS ve PIM-1) alt sınıfa ayrılır. (Gocek, Moulas, and Studzinski 2014) B. İntrensik guanozin trifosfat (GTPaz) aktivitesine sahip GTP-bağlayıcı proteinler, monomerik ve heterotrimerik gruplara

ayrılır. Monomerik GTP-bağlayıcı proteinler, HRAS, KRAS ve NRAS içeren önemli proto-onkogenler RAS ailesinin üyeleridir. Şu anda proto-onkogenler olarak dahil edilen heterotrimerik GTP-bağlayıcı proteinler (G proteinleri), şu anda GSP ve GIP'yi içermektedir (Pierotti, Sozzi, and Croce 2003).

2.2.1.4. *Transkripsiyon faktörleri*

Transkripsiyon faktörleri, hedef genlerin veya gen ailelerinin ekspresyonunu düzenleyen nükleer proteinlerdir. Transkripsiyonel düzenlemeye, genellikle hedef genin yukarısında yer alan spesifik DNA sekanslarına veya DNA yapısal motiflerine (örn: zinc finger) protein bağlanması aracılık eder (Bhagwat and Vakoc 2015). Transkripsiyon faktörlerinin etki mekanizması, bazen belirli partnerlerle heterodimerik komplekslerde diğer proteinlere bağlanmayı da içerir. Transkripsiyon faktörleri, hücre dışı sinyalleri gen ekspresyonunda modüle edilmiş değişikliklere dönüştüren sinyal iletim yolundaki son bağlantıdır. Birçok proto-onkogen, retroviral homologları yoluyla keşfedilen transkripsiyon faktörleridir. Örnekler arasında ERB A, ETS, FOS, JUN, MYB ve C-MYC bulunur. Fos ve jun, ekspresyonu hücre bölünmesine yol açan bir dizi hedef geni pozitif olarak düzenleyen AP-1 transkripsiyon faktörünü oluşturur (Liebermann and Zerbini 2006).

İnsan hematolojik tümörlerinde transkripsiyonel aktiviteye sahip bir proto-onkogenin önemli bir örneği, hücre çoğalmasına yol açan genlerin ekspresyonunu kontrol etmeye yardımcı olan C-MYC genidir. C-MYC gen (transkripsiyonel düzenlemede yer alan heliks-döngü-heliks / lösün zipper süper ailesine ait bir nükleer DNA bağlayıcı protein için kodlanmış), insan lösemi ve lenfomadaki kromozomal translokasyonlarla sıklıkla aktive edilir (Johnson, Nau, and Minna 1987) (Hoffman and Liebermann 1998).

2.2.1.5. *Programlanmış hücre ölüm regülasyonu (Apoptoz regülatörü)*

Normal dokular hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasında düzenlenmiş bir denge sergiler. Kanser hücrelerinin çalışmaları, hem kontrolsüz hücre proliferasyonunun hem de programlanmış hücre ölümüne girememenin neoplaziye ve antikanser tedavilerine duyarsızlığa katkıda bulunabileceğini göstermiştir.

Programlanmış hücre ölümünü düzenlediği gösterilen ilk proto-onkogen BCL-2'dir (Strasser, O'Connor, and Dixit 2000).

Çoğunlukla tüm foliküler lenfomaların ve bazı yaygın büyük B hücreli lenfomaların başlamasında rol alan BCL-2 geni, mitokondriye lokalize olan ve apoptozu inhibe ederek hücre sağkalımını artıran sitoplazmik bir proteini kodlar. BCL-2 ailesi üyeleri BCL-XL ve BCL-2 apoptozu inhibe eder ve birçok kanserde up-regüle edilir (Antonsson and Martinou 2000) (Yip and Reed 2008).

Apoptozda yer alan ikinci onkogen, intrinsik yolla aktive edilen kaspaz-9'dur. Sitokrom c'nin sitozole salınması, apoptozom adı verilen bir holoenzim kompleksi oluşturan kaspaz adaptörü Apaf-1 ve prokaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlanır. Kaspaz-9, sırayla, aşağı akış kaspazlarını, özellikle kaspaz-3 ve ayrıca kaspaz-6, 7 ve 8'i aktive ederek DNA parçalanmasına ve apoptozu yol açar. Akt'nin, Ser-196 seviyesinde kaspaz-9'un fosforilasyonu ile apoptozom fonksiyonunu düzenleyebileceği gösterilmiştir. Bu fosforilasyon olayı, apoptoz kaspaz-9 aracılı baskılanmaya yol açan ilgili fonksiyonel sonuçlara sahiptir. Akt supresyonu kaspaz-9 için spesifiktir ve muhtemelen intrinsik katalitik aktivitenin inaktivasyonundan kaynaklanır. Son zamanlarda, bax'ın dahil olduğu ve mitokondriyal membran hasarına yanıt olarak kaspaz-9 stimülasyonuna (Apaf-1 yoluyla) yol açtığı gösterilmiştir (B. Kim, Srivastava, and Kim 2015).

2.2.2. Onkogen Aktivasyon Mekanizmaları

Onkogenlerin aktivasyonu, hücrel proto-onkogenlerde genetik değişiklikler içermektedir. Bu genetik değişikliklerin sonucu olarak hücreye büyümeyle ilgili avantaj sağlamaktır. Dört genetik mekanizma insan neoplazmlarında onkogenleri aktive eder: (1) mutasyon, (2) gen amplifikasyonu, (3) kromozom yeniden düzenlemeleri ve (4) aşırı ekspresyon. İlk üç mekanizma ya proto-onkogen yapısında bir değişikliğe ya da proto-onkogen ekspresyonunda bir artışa neden olmaktadır. Neoplazi çok aşamalı bir işlem olduğundan, bu mekanizmalardan birden fazlası meydana gelebilir ve bu durum proto-onkogen aktivasyonu ile tümör baskılayıcı gen kaybı veya inaktivasyonunun bir kombinasyonuna yol açar (Botezatu ve ark. 2016).

2.2.3. Akciğer Kanseri Onkogenleri

Li Mao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 15 hasta bireyden iki hedef genden elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizinin, bir K-ras veya bir p53 gen mutasyonu içeren 10 primer tümör tespit ettiğini bulmuştur. K-ras mutasyonları, genellikle akciğerin adenokarsinomu ile ilişkili olmaktadır. İki p53 mutasyonu, 273 ve 281'deki kodonlarda meydana gelmiş olup her ikisi de daha önce akciğer kanserinde tanımlandı (L. Mao ve ark. 1994).

Wong ve arkadaşları parafine gömülü küçük hücreli akciğer kanseri örneklerinden ekstrakte edilen DNA'yı incelemiş ve 41 (% 12) doku örneğinin 5'inde c-myc veya N-myc'nin üç kattan fazla DNA amplifikasyonu bulmuşlardır (Johnson, Nau, and Minna 1987).

2.3. Hücre Ölüm Yolakları

Çok hücreli organizmalarda hücrelerin gelişmesi, hemostazı, ölümü, ve bağışıklık fonksiyonu aşamaları önemli bir süreç oluşturmaktadır. Bu nedenle süreçte meydana gelecek herhangi bir düzensizlik, kanser, oto bağışıklık veya nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik sorunlara yol açacaktır. Hücre ölüm yolakları, farklı proteaz türleri (kaspazlar kalpainleri ve transglutaminazlar) ve nükleazlar dahil olmak üzere enzimolojik kriterlerine göre veya fonksiyon türüne (programlanmış, fizyolojik veya patolojik) göre sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalarda Apoptoz, Nekroz ve Otofaji gibi morfolojik kriterler göz önünde bulundurulmaktadır (Susan 2009).

2.3.1. Apoptoz

Apoptoz yapılan bazı çalışmalarda ilk olarak, bağışıklık sisteminin savunması ve bazı hastalıklarda gözlemlenen biyolojik süreçlerde işlevini tamamlamadan önce, gelişim ve yaşlanmada önemli bir rol oynayan enerjiye bağlı bir hücre ölümü modeli olarak tanımlanmıştır. Normalde apoptoz “programlanmış hücre ölümü”, hücrelerin bir hücre ölümü yolağından geçerek ölmek üzere programlandığı DNA hasarına neden olan bir uyarı tarafından tetiklenir. Nekrozun aksine, intihar yoluyla hücre

ölümü olarak bilinen apoptoz, hücre küçülmesi, membran bozulması, kromatin yoğunlaşması ve kaspazların kaskadı aktive etmek için DNA parçalanması ile süreci başlar (Apoptozun Moleküler Temeli n.d.).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar sayesinde apoptoz hakkında çok geniş bir bilgi birikimi bulunmaktadır. Bu durum apoptoz ve genlerinin önemini ve malign fenotip üzerindeki derin etkilerini anlamamıza yardımcı olmaktadır (Lowe and Lin 2000).

Bu morfolojik ve moleküler değişiklikler, çok çeşitli fizyolojik veya deneysel olarak uygulanan ölüm stimülatörleri tarafından ortaya çıkarılır ve çeşitli doku hücrelerinde gözlenir (Strasser, O'Connor, and Dixit 2000).

2.3.1.1. Apoptozun Ana Bileşeni

2.3.1.1.1. Kaspaz

Kaspaz-kaskad sistemi, hücre içi apoptotik sinyallerin indüksiyonu, transdüksiyonu ve amplifikasyonu için hayati roller oynar. Apoptoz ile yakından ilişkili olan kaspazlar, aspartat özgü sistein proteazları ve interlökin-1 β -dönüştürücü enzim ailesinin üyeleridir (Fan ve ark. 2005).

Şimdiye kadar on dört kaspaz tanımlanmıştır, öncüllerinin hepsi prokaspazlar olarak bilinen zimojenlerdir. Prokaspazlarda prodomain'in N-terminali, kaspaz aktivasyonu için gerekli olan çok çeşitli bir yapı içerir ve hepsi, diğer kaspazları otomatik olarak aktive edip büyük ve küçük bir alt üniteye sahip bir heterodimer üretme yeteneğine sahiptir. İki heterodimer, enzimatik bir aktif heterotetramer oluşturur (Launay ve ark. 2005).

Amino asit sekanslarındaki homolojilerine dayanarak, kaspazlar üç alt aileye ayrılır. Birinci ailede apoptoz aktivatörleri yer almaktadır ve Kaspaz-2, Kaspaz-8, Kaspaz-9, Kaspaz-10'dan oluşmaktadır. İkinci aile apoptoz uygulayıcılarıdır ve Kaspaz-3, Kaspaz-6, Kaspaz-7'yi içerirken; Üçüncü aile Kaspaz-1, kaspaz-4, Kaspaz-5, Kaspaz-11, Kaspaz-12, Kaspaz-13, Kaspaz-14 içermektedir (Fan ve ark. 2005).

Apoptoza katılan kaspazlar aralarında, başlatıcı kaspaz gruplarından kaspaz 2, 8, 9 ve 10 ve efektör kaspaz 3, 6 ve 7 grubuna ayrılabilir (Kroemer and Martin 2005).

Bazı çalışmalar, TNF ve Fas / Apo-1 tarafından kaspazların hücre ölümü indüksiyonuna katılımını desteklemektedir: (i) Reseptör kaynaklı hücre ölümü, sentetik kaspaz inhibitörleri tarafından bloke edilebilir. (ii) Kaspazlar, inaktif öncüler olarak üretilir. Diğer apoptoz proseslerinde olduğu gibi, TNF ve Fas / Apo-1 tarafından hücre ölümünün uyarılmasının, bazı kaspazların proteolitik işlemleri yoluyla hızlı aktivasyonu ile sonuçlandığı bulunmuştur. (iii) Benzer şekilde, kaspaz substratları olarak işlev gören ve diğer apoptotik işlemlerde parçalandığı gösterilen birçok proteinin de TNF veya Fas/Apo-1 tarafından indüklenen ölüm süreçlerinin erken aşamalarında parçalandığı bulunmuştur (Wallach ve ark. 1997).

2.3.1.1.2. TNF Ailesi

TNF- α , hücre içi N terminaline sahip bir tip II transmembran proteindir. Hem membrana entegre bir protein hem de proteolitik bölünmeden sonra salınan çözünür bir sitokin olarak sinyal verme potansiyeline sahiptir; çözünür formu, 17 kDa bileşenine kovalent olarak bağlı olmayan bir trimeridir. TNF reseptörü aktivasyonu, çoklu sinyal iletim yollarını aktive eden hücre içi adaptör proteinlerinin alımına yol açar (Hehlgans and Pfeffer 2005) (Varfolomeev and Ashkenazi 2004) .

TNFR1 aktivasyonunun hücre içi içeriğe bağlı iki farklı sonucu olabilir. Varsayılan yolak, enflamasyon ve hücre sağkalımı ile ilgili genlerin indüksiyonudur. TNFR1'e ligant bağlanması, AP-1 transkripsiyon faktörlerinin veya sırayla NF-aktivite B' yi aktive eden IK- β kinazların aktivasyonu yoluyla bir dizi enflamatuvar aracıyı ve büyüme faktörünü indükler. NF-aktivite B aktivasyonu ayrıca c-FLIPL, Bcl-2 ve süperoksit dismutaz gibi apoptozun negatif regülatörlerini de önemli ölçüde indükler. NF-aktivite B aktivasyonu başarılı olmazsa (örn., Hücre metabolik olarak tehlike ile karşılaştıysa), apoptoz, kaspaz-8 yoluyla ve hücre içi reaktif oksijen birikimi yoluyla, sürekli Jun N-terminal kinaz aktivasyonu ve mitokondriyal yollarla aracılık eder. NF- κ B'nin yetersiz aktivasyonuna bağlı olduğundan, apoptoz, TNF-

α 'ya Fas-L ve TRAIL gibi TNF süper ailesinin diğer üyeleri tarafından indüklenen hızlı apoptozdan farklı olarak geç bir yanıt oluşturur (Balkwill 2006).

Apoptotik sinyalizasyon iki farklı bileşenin oluşmasıyla meydana gelebilir. İlk olarak TNFR-I'den ayrılır ve sitozolde ölüm mekanizmasını çalıştıran farklı bir kompleks oluşturur. Antiapoptotik moleküller tarafından yeterince baskılanmadığı takdirde apoptozu başlatabilen sitoplazmik bir komplekstir (Kiraz ve ark. 2016).

TNFR-II'ye ligant bağlanması, NF- κ B, JNK, p38 MAPK, ERK ve PI3K yollarının aktivasyonuna yol açar, ancak bu reseptörün biyolojik rolü hala tam olarak anlaşılammıştır (S, Gautamethi, Bokyung Sung 2008).

TNFR1 ile indüklenen apoptoz, başlangıç aşaması TNFR-I, kinaz RIP1 ve TRAF2'nin apoptozu karşılayacak anti-apoptotik genleri aktive ederek anti-apoptotik genleri aktive edecek şekilde birleştirilmesiyle iki ardışık sinyal kompleksini içerip hücre canlılığı ile sonuçlanır. Kompleks II, apoptozu indükleyen TRADD, RIP1, FADD ve kaspaz-8'den oluşan sitoplazmik bir komplekstir. Kaspaz aktivasyonu yoluyla ölüm daha önce, TNF-a'nın neden olduğu apoptoz ile hücrelerin tedavisini takiben, TRAF1, TRAF2, c-IAP1 ve c-IAP2'nin ekspresyonunun arttırıldığı ve bu proteinlerin aşırı ekspresyonunun, hücre ölümüne bağlı TNF-a ile indüklenen apoptozu duyarlıdır (Gaur and Aggarwal 2003). Son zamanlarda, TNF reseptörlerinin ATRA ile tedavi edilen insan akciğer kanseri hücre hattını TNF- α kaynaklı apoptozu duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Manna and Aggarwal 2000).

2.3.1.1.3. Bcl-2 Ailesi

Memeli hücrelerinde kaspazlar, intrinsik veya ekstrinsik apoptotik yollarından aktive edilmektedir. İntrinsik yolak, DNA hasarı ve sitotoksik etmenler gibi çeşitli uyanlarla aktive edilip BCL-2 protein ailesi tarafından kontrol edilen mitokondri yoluyla etki eder (Gross, McDonnell, and Korsmeyer 1999).

Homeostatik koşullarda, anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleri, pro-apoptotik multi domain BCL-2 ailesi üyeleri Bax ve Bak'ın mitokondriyal hasara neden olmasını önleyerek mitokondriyal bütünlüğü korur. Hücrel stres sırasında, BCL-2-homoloji 3 (BH3) proteinleri aktive edilir ve anti-apoptotik. Sonuç olarak, Bax ve / veya Bak'ın inhibisyonu azalır, bu da bunların oligomerizasyonuna ve sitokrom c (cyt c) 'nin sitozole salındığı bir kanalın oluşmasına yol açar. Daha sonra cyt c,

Apop-1 ve ATP ile birleşerek apoptozom olarak da bilinen prokaspaz-9'un alımı ve aktivasyonu için bir platform oluşturur (Riedl and Salvesen 2007). Aktif kaspaz-9, apoptotik hücre ölümünün yürütülmesi için çok önemli olan aşağı akış uygulayıcı kaspazları-3, -6 ve -7'yi parçalar ve etkinleştirir (Fuentes-Prior and Salvesen 2004).

2.3.1.2. Apoptotik Yolaklar

Apoptotik hücre ölümüne yol açan iki anahtar moleküler sinyal yolağı vardır. Birincisi, B-hücresi lösemi/lenfoma 2 (BCL-2) protein ailesi ve aşağı akım mitokondriyal sinyallerinin üyeleri tarafından hücrenin içinden aktive edilen intrinsik yolaktır. İkincisi, özel hücre yüzeyi ölüm reseptörleri (DR) ile etkileşen pro-apoptotik ligantlar tarafından hücre dışından aktive edilen ekstrinsik yolaktır. Her iki yolakta da, apoptotik hücre ölüm programına aracılık eden çok sayıda proteolitik olay gerçekleştiren enzimatik kaspaz kaskadını aktive eder (Ashkenazi 2008).

2.3.1.2.1. İntrinsik Yolak

İntrinsik yolak, DNA hasarı ve sitotoksik ajanlar tarafından başlatılanlar gibi hücre içi ölüm sinyalleri ile uyarılır ve BCL-2 protein ailesi tarafından kontrol edilen mitokondri yoluyla etki eder (Lowe and Lin 2000) (Mignotte and Vayssiere 1998).

Homeostatik koşullarda, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, pro-apoptotik BCL-2 aile üyeleri Bax ve Bak'ın mitokondriyal hasara neden olmasını önleyerek mitokondriyal bütünlüğü korur. Hücrel stres sırasında, BCL-2-homoloji 3 (BH3) - only proteinleri aktive edilir ve anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyelerini antagonize eder (Crow ve ark. 2004).

Sonuç olarak, Bax ve/veya Bak aktive edilip oligomerizasyonlarına ve zarlar arası matrisin içinde yer alan bir iletme izin veren sitokrom c'nin sitoplazmaya yerleşmesine yol açar. Daha sonra sitokrom c, apoptozom olarak da bilinen prokaspaz-9'un aktivasyonu için bir platform oluşturan Apaf-1 ve ATP ile birleşir (Riedl and Salvesen 2007) (Eskes ve ark. 1998).

Aktif kaspaz-9, apoptotik hücre ölümünün yürütülmesi için çok önemli olan aşağı akış uygulayıcı kaspazları-3, -6 ve -7'yi parçalar ve etkinleştirir. Ek olarak, mitokondriden salınan diğer pro-apoptotik proteinler hücrel intihar mekanizmasına

katkıda bulunur. Örneğin Smac / Diablo, sonuçta kaspaza bağlı ve kaspazdan bağımsız sistemler olarak hücre ölümüne yol açan XIAP, cIAP1 ve cIAP2 gibi apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) inhibitörünün etkisini antagonize eder (Suen, Norris, and Youle 2008) (Sheridan and Martin 2010).

Smac / Diablo'nun XIAP'a bağlanması inhibitörlerini hafifletir. Kaspaz-9, -3 ve -7 ile etkileşim gerçekleşir. cIAP1 ve cIAP2, aksine XIAP, doğrudan kaspazları engellemez. Bunun yerine, tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) ile ilişkili olup (TRAF2), bu da TNFR1'in sürece dahil olmasına yol açar. RIP1'in her yerde bulunmasına aracılık ederek TNF'nin neden olduğu NF-kB aktivasyonuna katkıda bulunurlar. Anti-apoptotik genlerin NF-kB aracılı ekspresyonu, cIAP1 ve cIAP2'nin antiapoptotik işlevinden sorumlu olabilir (Susan 2009) (Chai ve ark. 2000).

Özet olarak BCL-2 ailesi üyelerinin BH1 ve BH2 alanları (BCL-2, BCL-XL ve Bax) mitokondri gibi organellerde gözenekler oluşturur; Bax ve Bak hücre ölümüne neden olurken; BCL-2 mitokondriyal bozulmayı önleyerek korunmasını sağlar. Bax ve Bax benzeri proteinler kanal oluşturma aktivitesi yoluyla kaspazdan bağımsız ölüme aracılık edebilir (Alirol and Martinou 2006).

2.3.1.2.2. Ekstrinsik yol

Ekstrinsik yol, apoptoz ligandı 2 / tümör nekrozu ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (Apo2L / TRAIL) gibi proapoptotik bir ligand, DR4 ve DR5 gibi özel proapoptotik membran reseptörlerine bağlandığında aktive edilir (Ashkenazi 2008b).

Aktivasyonda, her reseptör, Fas ile ilişkili ölüm domeni (FADD) adaptörünü alarak ölüm indükleyen sinyal kompleksini (DISC) bağımsız olarak oluşturabilir (Ashkenazi 2008b).

Bu komplekste, Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD), homotipik ölüm alanı etkileşimleri yoluyla başlatıcı kaspazları-8 ve / veya -10'u görevlendirir. Aktive edilen kaspaz-8, akış aşağı uygulayıcı kaspazlarını aktive eder, bu proteazlar hücrel ölüm substratlarını parçalayarak apoptotik hücrelerde gözlenen morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açar (Hengartner 2000).

Fas ve TRAIL-R tarafından indüklenen sinyalin aksine, TNFR1 agregasyonu iki kompleksin ardışık oluşumuna yol açar. Kompleks I, TNFR1, TNFR ile ilişkili ölüm bölgesi (TRADD), TRAF2, RIP1, cIAP1 ve cIAP2'den oluşur ve plazma zarında oluşturulur. Bu proteinler, NF-kB ve MAPK'ların TNF'nin neden olduğu aktivasyonunun önemli araçlarıdır. TNFR1'in endositozunu, FasL ve TRAIL tarafından indüklenen reseptör-proksimal DISC'ye benzer olan ve TRADD, FADD ve kaspaz-8 ve / veya -10'u içeren kompleks II'nin oluşumu takip eder. Kaspaz-8 ve -10'un aktivasyonu, akış aşağı yürütücü kaspazların aktivasyonuna yol açar. Ek olarak, sadece BH3 protein Bid'in kaspaz-aracılı bölünmesi, apoptozun mitokondriyal yolunu aktive ederek ölüm reseptörünün neden olduğu hücre ölüm programını güçlendirir. Son zamanlarda, TNF'nin hücre sel duruma bağlı olarak iki farklı kaspaz-8 aktivasyon yolundan birini indüklediği bulunmuştur (Sayers 2011).

Bu görevlendirme, kaspaz 8 ve 10'un indüklenmiş aktivasyonuna yol açar, bu da kendi kendine işlemeye uğrar ve aktif kaspaz moleküllerini sitoplazmaya salar. Bu enzimler daha sonra parçalanır ve böylece sonuçta apoptozu gerçekleştiren efektör kaspaz 3, 6 ve 7'yi uyarır (Sayers 2011).

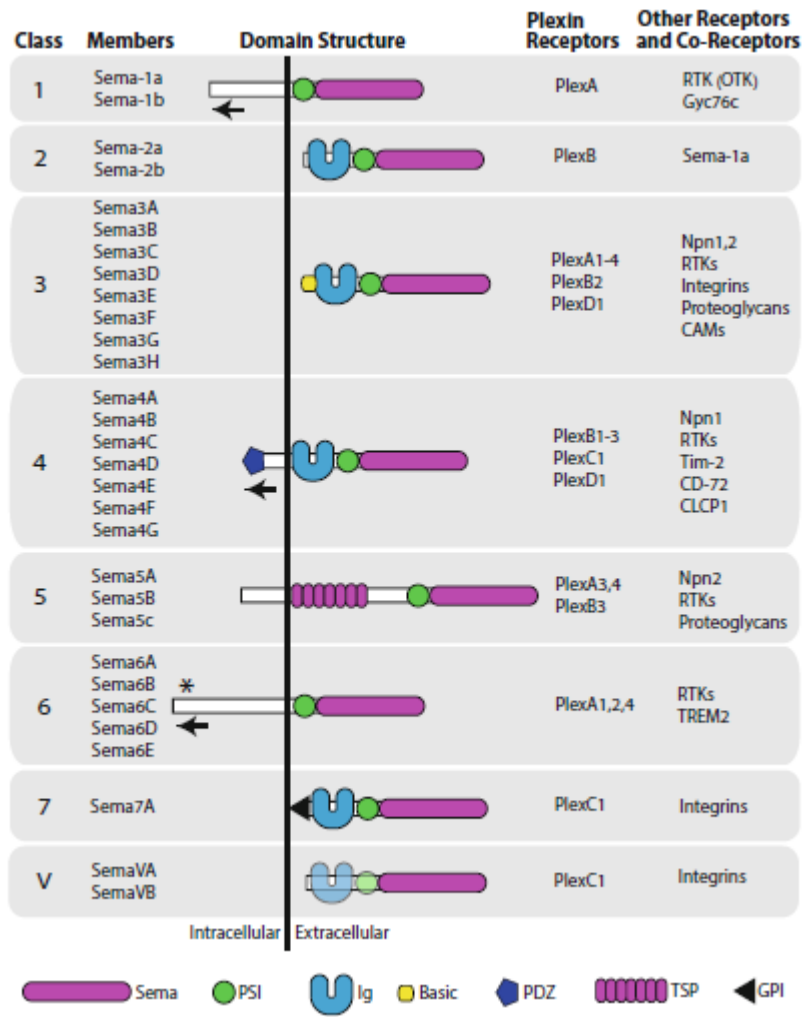
2.4. Semaforinler

Son zamanlarda, yapılan çalışmalarda bazı aksonlara rehberlik eden semaforin moleküllerinin kanserde çok önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Semaforinler, Kollapsinler olarak da bilinen proteinlerdir. Başlangıçta aksonal rehberliğe aracılık eden faktörler olarak tanımlanan geniş bir salgılanmış, membranöz ve plazma membranı ile ilişkili protein ailesi olarak tanımlanmıştır. Semalar, protein yapılarına göre sınıflandırılmış 7 alt sınıfa ait 20'den fazla salgılanan ve membrana bağlı semaforin vardır (Şekil;2.2). Semaforinler iki büyük reseptör ailesi ile sinyal verir: pleksinler ve nörofilin (RP veya NPN). Çoğu membranöz semaforin, nörofilin reseptörleri tarafından pleksinlere alınan, sınıf 3 semaforin hariç, pleksinlere bağlanır (Uslu 2018).

Semaforinler, N-terminallerine yakın yerleştirilmiş yaklaşık 500 amino asit uzunluğunda bir sema alanının varlığı ve sema alanına aşağı akışta yerleştirilmiş bir

pleksin-semaforin-integrin (PSI) alanı ile karakterize edilir. Sema alanı, semaforin aktivitesi için gereklidir ve reseptör bağlanma özgüllüğünün belirlenmesinde rol oynar (Neufeld et al. 2007).

Gu ve ark. Semalar ve reseptörlerinin, dolaylı olarak, immün hücreler ve tümörle ilişkili makrofajlar ve fibroblastlar dahil olmak üzere, tümör mikro-ortamındaki anjiyogenez ve diğer hücre tiplerinin fonksiyonlarını modüle ederek veya tümör hücrelerinin davranışını doğrudan etkileyerek tümör ilerleyişini kontrol ettiğini gösteren kanıtlar vardır (Gu and Giraudo 2013).



Şekil 2.1. Semaforin protein ailesi. Semaforin protein ailesi üyeleri, alan yapılarına göre sekiz sınıfa ayrılır. Sınıf 1 ve 2 Semalar ve Sema5c omurgasızlarda, Sınıf 3–7 Semalar omurgalılarda ve Sınıf V Semalar virüslerde bulunur. Semas için baskın reseptörler olan pleksin reseptörleri, dört sınıfa (A – D) gruplanır ve her pleksin reseptör sınıfı, sinyalleşmeye aracılık etmek için belirli bir Sema sınıfı veya sınıflarıyla etkileşime girer (Alto ve Terman 2017).

Pek çok kanser hücresi anormal semafor düzeyleri ve bunların reseptörlerini ifade eder. Sema3C, 3E, 4D, 5A, 5B ve 6D de dahil olmak üzere pro-tümörigenik semaforinler, çoklu kanserlerde yukarı doğru düzenlenmiştir. Bu Semaların'ın aşırı ifadeleri, tümör ilerlemesini, istila ve metastazı ve pro-anjiyojenik özellikleri sürdüren birçok mekanizmaya katkıda bulunur. Öte yandan, Sema3A, 3B, 3F ve 3G de dahil olmak üzere anti-tümörigenik semaforinler, kanserlerde çoğunlukla indirgenir. İlginç bir şekilde, bazı semaforinlerin bir kanser tipinde aşağı regüle edildiği veya silindiği, ancak birçok kanserde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur, bu durum Semaların farklı tümörlerde hem anti-tümör hem pro-tümör rolü olabileceğini düşündürmüştür (Abuetabh 2014) (Yazdani and Terman 2006).

Sema3F ayrıca başlangıçta akciğer kanserinin bir tümör baskılayıcısını kodlayan bir gen olarak tanımlanmıştır. Sema3F, nörofilin-2 reseptörüne ve çok düşük afinite ile ayrıca nörofilin-1 reseptörüne bağlanır. Bununla birlikte, nörofilin-1 reseptörünü kullanarak sinyalleri dönüştüremediği görülmektedir. Sema3F, bu tür hücrelerde ektopik olarak eksprese edildiğinde çeşitli ksenografıtlı akciğer kanseri hücrelerinden türetilen tümörlerin oluşumunu bastırmıştır. Bu hücrelerde sema 3F ifadesi büyümelerini baskıladı, bu da sema 3F'nin tümör hücrelerinin davranışını doğrudan etkileyebileceğini düşündürmüştür (Neufeld et al. 2015).

Brambilla E. ve arkadaşları akciğer tümörlerinde yüksek VEGF ekspresyonunun, azalmış SEMA 3F ekspresyonunun ve sitoplazmik delokalizasyon ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Dolayısıyla, SEMA 3F ve VEGF, ortak reseptörlerine bağlanmak için rekabet edebilir ve SEMA 3F'nin kaybı, tümörlere büyüme avantajı sağlayacaktır. Normal akciğerde, SEMA 3F sitoplazmik membrandaki tüm epitel hücrelerinde ve daha az oranda sitoplazmada bulunmuştur. Akciğer tümörlerindeki Sema 3F lokalizasyonu baskın olarak sitoplazmadadır ve seviyeleri nispeten düşüktür (Brambilla ve ark. 2000). Tüm tümörlerde, SEMA 3F'nin spesifik bir sitoplazmik lokalizasyonu, yüksek seviyelerde vasküler endotel büyüme faktörü ile ilişkilidir ve tümörün derecesine ve saldırganlığına bağlıdır (Nasarre and Constantin 2003).

VEGF, tümör anjiyogenezinde anahtar faktörlerden biridir. Çok sayıda benign ve malign tümörde yukarı doğru düzenlenir. VEGF'nin hücreler ve reseptörleri tarafından salgılandığı yönünde önemli gelişmeler saptanmıştır. VEGF

inhibisyonu, in vivo olarak tümör büyümesini baskılar ve neovaskülarizasyonu sınırlandırır. Bu nedenle VEGF esas olarak tümör gelişiminde rol oynamaktadır. İki transmembran VEGF reseptörü NP1 ve NP2 başlangıçta nöronal hücrelerde sınıf 3 semaforin reseptörleri olarak tanımlanmıştır. NP1 endotel hücreleri tarafından eksprese edilir ve VEGFR2 / KDR bağlanmasını, tümör anjiyogenezini ve ilerlemesini arttıran bir VEGF yardımcı ko-reseptörüne karşılık gelir. NP1 ekspresyonu ayrıca meme ve akciğer karsinoması gibi tümör kaynaklı hücrelerde tanımlanmıştır. Nörofilinlerin diğer ligandları, üçüncü sınıfta olan Semaforinlerdir. Semaforinlerin yaygın ekspresyonu, sinir sistemi dışında başka işlevleri olduğu ileri sürülmüş olup, daha sonra normal akciğer gelişiminde ve tümörigenezde gösterilmiştir. Sema 3f'nin bir tümör baskılayıcı gen olduğu öne sürülmüştür. SEMA 3F, NP1 ve NP2'yi NP2'ye 10 kat daha fazla afinite ile bağlar ve bu reseptörleri endotel ve tümör hücrelerinde VEGF165 ile paylaşır (Lantuejoul and Constantin 2003).

2.5. Flavonoidler

Flavonoidler, doğada birçok yerde bulunur. Kanser de dahil olmak üzere kronik hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynarlar. Bu polifenollerin antikanser etkileri çeşitli faktörlere bağlıdır: Kimyasal yapıları, konsantrasyonları ve kanser türü. Farklı dokulardaki malign hücreler, flavonoidlere karşı farklı hassasiyet gösterir (Sak 2014) (Lam ve ark. 2016).

Flavonoidler, bitki alemine dağılmış ve meyveler, sebzeler, tahıllar, fındık, tohumlar, çay ve geleneksel şifalı bitkilerde önemli miktarlarda bulunan doğal olarak oluşan polifenolik metabolitlerdir. Bitkilerin her kısmında ortaya çıkmalarına karşın genellikle yapraklarda ve çiçeklerde yoğun bulunurlar. Doğada renklendirmenin çoğundan sorumlu bitki pigmentleridir(George, Dellaire, and Rupasinghe 2017).

Doğada, kimyasal olarak en az bir hidroksil içeren bir fenilkromanon yapısı (C6-C3-C6) bulduran bileşikler olarak tanımlanan birkaç bin flavonoidin meydana geldiği bilinmektedir. Flavonoidler ayrıca merkezi piran halkasının doygunluk seviyesine ve açıklığına bağlı olarak flavonoller, flavonlar, flavanoller, flavanonlar,

antosiyandinler ve izoflavonoidlere ayrılabilir (Park and M. Pezzuto 2012) (Havsteen 2002).

Flavonoidler, hücre zarına kolayca bağlanabilir, in vitro hücrelere nüfuz edebilir ve hücrel metabolik aktiviteleri düzenleyebilir. Oksidatif hasarın hafifletilmesi, kanserojen inaktivasyonu, proliferasyonun inhibisyonu, farklılaşmanın teşvik edilmesi, hücre döngüsü durması ve apoptozun indüksiyonu, tümör anjiyogenezinin bozulması ve metastazın baskılanması flavonoidlerin antikarsinogenik aktivitelerine katkıda bulunur. Flavonoidlerin antikanser etkinliği, kısmen tümör hücrelerinin apoptozunu indükleme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır (George, Dellaire, and Rupasinghe 2017).

Malign hücrelerin ayırt edici özelliği olarak bilinen insan kanseri gelişimi için gereken en yaygın olaylardan biri, hücre döngüsünün dereglasyonudur. Hücre döngüsünün ilerlemesini inhibe edebilen ve hücre büyümesinin durmasına yol açabilen ajanlar kanser önleme ve tedavi çalışmalarında çok önemlidir ve diyet flavonoidlerinin hücre döngüsünün ilerlemesini önleme yeteneğine büyük önem verilmiştir. Flavonoidlerin, çoklu hücre döngüsü düzenleyici proteinleri düzenleyerek G1 / S veya G2 / M sınırlarında hücre döngüsü ilerlemesini durdurduğu bulunmuştur. Birkaç çalışmada, flavonoidlerin hücre döngüsünün birden fazla aşamasında hücre büyümesini engelleme yeteneğini göstermiştir (Abotaleb ve ark. 2019) (Sak 2014).

Polifenolik yapı nedeniyle, flavonoidlerin hem antioksidan hem de proksidan etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Antioksidan etkinin ve reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleme kabiliyetinin, fenolik bileşiklerin bildirilen biyolojik etkilerinin çoğunu açıkladığı gösterilmiştir, ancak son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar flavonoidlerin antikanser aktivitelerine prooksidan etki yoluyla aracılık edebileceğini ortaya koymuştur (George, Dellaire, and Rupasinghe 2017).

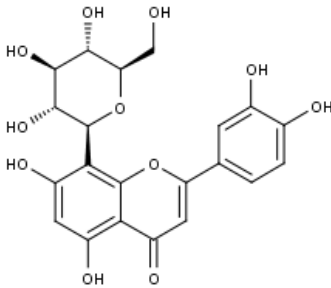
Orientin (Ot) ve vicenin-2 (Vc), Hint kutsal fesleğeninden ve dünyanın farklı bölgelerindeki bazı bitkilerden izole edilmiş suda çözünür flavonoidlerdir (Satyamitra ve ark. 2014). Bu küçük flavonoidlerin doğada antioksidan ve antikanser olduğu bilinmektedir (Sharma ve ark. 2016).

2.5.1. *Orientin*

Tıbbi bitkilerden izole edilen biyoaktif bileşiklerden oluşan Orientin, geniş terapötik özellikleri nedeniyle çalışmalarda sıklıkla kullanılır. Orientin, *Ocimum sanctum* (kutsal fesleğen), *Phyllostachys nigra* (bambu yaprakları), *Passiflora* türleri (tutku çiçeği), *Trollius* türleri (Altın Kraliçe), *Jatropha gossypifolia* (Bellyache Bush), *Linum usitatissimum* (keten), *Commelina communis* (gün çiçeği) gibi bazı tıbbi bitkilerden ekstrakte edilebilen suda çözünür bir flavonoid C-glikozittir (Lam ve ark. 2016).

2.5.1.1. *Orientin yapısı*

Orientin, IUPAC ismi 2- (3,4-dihidroksifenil) -5,7-dihidroksi-y-8 - [(2S, 3R, 4R, 5S, 6R) -3 4,5-trihidroksi-6- (hidroksimetil) oksan-2-il] kromen-4-on olan suda çözünür bir flavonoid C-glikozittir. C₂₁H₂₀O₁₁ molekül formülüne ve 448.3769 g / mol molekül ağırlığına sahiptir. Orientinin kimyasal yapısı çoğunlukla iki eter grubuna ve bir keton grubuna sahip fenol gruplarından oluştuğunu göstermektedir. Bu nedenle, tıbbi bitkilerden orientin çıkarmak için metanol, etanol veya su gibi bir polar çözücü gereklidir (Lam ve ark. 2016).



Şekil 2.2. Orientin yapısı (Thangaraj et al. 2018) .

2.5.1.2. Tıbbi özellikler

2.5.1.2.1. Antioksidan ve yaşlanma karşıtı etkisi

Orientin antioksidan özelliği nedeniyle geniş çapta çalışılmıştır Orientinin antioksidan özelliği, elektron afinitesi, elektronegatifliği ve elektrofilik indeksi çalışmasıyla açıklanabilir (An, Cao, ve ark. 2015) (Satyamitra ve ark. 2014).

2.5.1.2.2. Radyokoruyucu etkisi

Radyo-koruyucu bileşiklerin araştırılması, insan dokuları üzerindeki son derece zararlı gücü nedeniyle insanları radyasyona karşı korumak için hayati öneme sahiptir. Radyasyon DNA ve proteinlere zarar vererek hücresel apoptoz nekrozu, mitotik ölüm veya normal dokularda hücre döngüsünü durdurmasına neden olabilir. Ocimum kutsal, Orientin ve vicenin-2 yapraklarından izole edilen iki flavonoid, radyo-koruyucu etkileri açısından sıklıkla incelenmiştir. Veinda ve arkadaşları, radyasyona bağlı genomik değişikliklere karşı koruma sağlayarak, çok düşük toksik olmayan Orientin ve vicenin-2 konsantrasyonlarında optimum korumanın sağlandığını ve bunun da kanser radyoterapisinde normal doku koruması için mevcut tiyol koruyucularına karşı bir avantaj sağladığını bulmuşlardır (Vrinda ve Uma Devi 2001) (Uma Devi, Bisht, ve Vinitha 1998) (Uma Devi ve Satyamitra 2004).

2.5.1.2.3. Nöroprotektif veya antidepresan benzeri etki

Liu ve arkadaşları, orientinin CUMS ile indüklenen depresif farelerin davranışı üzerinde antidepresan benzeri etkiler sergilediğini göstermişlerdir (Liu ve ark., 2015). Orientin ayrıca oksidatif stresi azaltarak, monoamin nörotransmisyonunu iyileştirmiş ve stresli farelerin hipokampus ve prefrontal korteksindeki nörotrofin BDNF ve sinaps ilişkili proteinleri arttırmıştır (Oh ve ark. 2018) (Ortmann ve ark. n.d.).

2.5.1.2.4. Antiadipogenez etkisi

Adipogenez, farklılaşmamış öncü hücrelerin yağ hücrelerine farklılaştığı ve ayrıca toplum içinde obezite prevalansının artmasına neden olan süreçtir. Orientinin diğer bazı flavonoidlerle birlikte güçlü antiadipogenez aktivitesi sergilediği bildirilmiştir. Spirodela polyrhiza etanol ekstraktından izole edilen orientin, 3T3-L1

hücrelerinde lipit birikimi üzerinde antiadipogenez etkilere neden olmuştur (J. Kim ve ark. 2010).

2.5.1.2.5. Antinosiseptif etki

Orientin ağrıyı hafifleten etkisi, farelerde ağrı modellerinde gösterilmiştir. 6.5 mg / kg ID50'ye sahip Orientin, farelerde asetik asit kaynaklı kıvrınma ve kapsaisin ve glutamat kaynaklı ağrıyı azaltabilmiştir (Da Silva ve ark. 2010).

2.5.1.2.6. Antienflamatuvar etki

Yapılan birkaç çalışma orientin'in inflamasyonda yer alan anahtar molekülleri düzenlediğini göstermiştir. Örneğin, orientin, NF-κB ve ERK yollarının baskılanması ile ilgili olan LPS'nin neden olduğu vasküler enflamatuvar yanıtta IL-6 ve TNF-a üretimini baskılar (Sun ve ark. 2016) Ku ve ark. Çalışması, orientin veya izoorientin ile tedavinin, birincil insan endotel hücresinde NF-κB'nin inhibisyonu yoluyla HG'nin neden olduğu vasküler inflamasyonu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, orientin ve izoorientinin diyabetik komplikasyonlara ve ateroskleroza karşı da önemli terapötik yararları olduğunu göstermektedir (Ku, Kwak, and Bae 2014).

2.5.1.2.7. Antitümör etkisi

Orientinin onkogen p53 ekspresyonunu yukarı regüle ettiğini ve kanserin bcl-2 ekspresyonunu teşvik ettiğini ve daha sonra kanserli hücrelerde apoptozu indüklediği birçok kez kanıtlanmıştır (An, Wang, ve ark. 2015). Başka bir çalışma ayrıca orientin'in Bax / Bcl-2 oranında yukarı regüle ekspresyonunun ve Bcl-2'nin aşağı regüle ekspresyonunun arttığını gösterdi (Guo ve ark. 2014).

Ayrıca Thangari ve arkadaşları, sitotoksiste, morfolojik değişiklikler, kromatin yoğunlaşması, membran bozulması ve nükleer parçalanma yaparak orientinin insan CRC HT29 hücrelerine karşı anti-proliferatif potansiyelini göstermiştir. Genel bulgular, orientinin G0 / G1 fazındaki hücre döngüsünü durdurduğunu, hücre içi ROS'u indüklediğini ve aynı anda mitokondriyal zarı kaspaz bağımlı intrinsik apoptozu aktive etmek için depolarize ettiğini belirtmektedir. Bu nedenle, orientin insanda CRC'ye karşı umut verici bir kemoterapötik ajan olabilir. (Thangaraj ve ark. 2019) Diğer yandan, HeLa insan servikal karsinom hücrelerinde erken apoptoz oluşmadan önce, orientinin bloke edici etkisi, G1 / S geçişinde

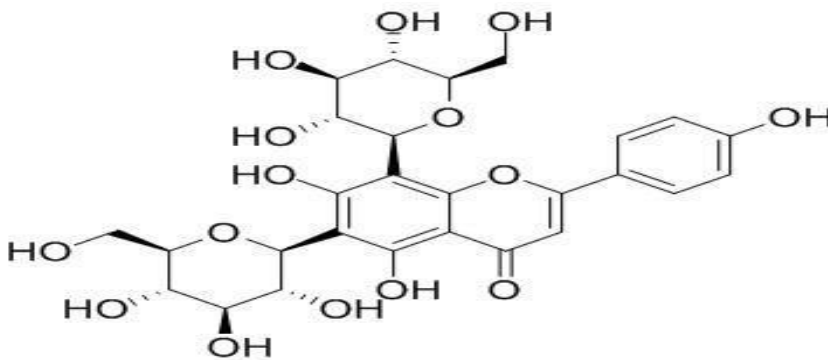
meydana gelen DNA ipliği kopmasını ve hücre döngüsü durmasını meydana getirmiştir (Guo ve ark. 2014).

2.5.2. Vicenin-2

Vicenin-2, Güney Asya bölgesinde yaygın olan *Ocimum sanctum* Linn ve *Moringa oleifera* bitkisinde bulunan toksik olmayan bir flavonoiddir. Vicenin-2'nin antioksidan, hepatoprotektif, antiinflamatuvar ve antikanser etkileri gibi birçok farmakolojik özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Vicenin-2, anjiyogenezi inhibe eder ve prostat kanserinde vasküler endotelial büyüme faktörü ekspresyonunu azaltır ve tümör gerilemesi ile ilişkili olan prelinik modellerde oral uygulamadan sonra etkili bir şekilde emildiği kanıtlanmıştır (Yang D, Zhang X 2018).

2.5.2.1. Vicenin-2'in yapısı

Vicenin-2, *A. capillaris*'ten izole edilen apigenin (şekil:2.3) 'in 6,8-di-C-glukozitidir. Vicenin-2 , *Citrus aurantium*, *Peperomia blanda*, *Ocimum sanctum*, *Perilla frutescens*, *Urtica dareselis* ve *Potentilla* gibi diğer birçok türde bildirilmiştir. Anti-oksidan, anti-hepatotoksik, tripanokidal, antispazmodik, fonksiyonel gastrointestinal rahatsızlığın iyileştirilmesi ve anti-nosiseptif etkiler dahil olmak üzere Vicenin-2 'nin yararlı etkileri birçok araştırmada bildirilmiştir (Islam ve ark. 2014) (Kang ve ark. 2015) (Ku ve Bae 2015).



Şekil 2.3. Vicenin-2 yapısı (Peter et al. 2015).

2.5.2.2. Tıbbi özellikler

2.5.2.2.1. Antiseptik etki

Le ve arkadaşları, Vicenin-2'in hem LPS hem de CLP aracılı HMGB1 salınımını, HMGB1 reseptörünün ekspresyonunu ve HMGB1 aracılı bariyer bozulmasını, bariyer bütünlüğündeki artışlar ve CAM ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla inhibe ettiğini gösterir. Ek olarak, Vicenin-2 insan nötrofil yapışmasını ve HUVEC'lere göçü azaltır. Vicenin-2'in bu bariyer koruyucu etkileri, vicenin-2 ile tedavinin HMGB1 ile indüklenen mortalitenin azalmasıyla sonuçlandığı bir fare modelinde doğrulanmıştır. Bu sonuçlar, Vicenin-2'in sepsis ve septik şok gibi ciddi vasküler inflamatuvar hastalıklar için potansiyel terapötik ajanlar olarak kullanılabilceğini göstermektedir (Lee ve ark. 2015).

2.5.2.2.2. Anti-enflamatuvar etkileri

Vicenin-2, bariyer bütünlüğünü artırarak ve CAM'lerin ekspresyonunu inhibe ederek LPS reseptörünün LPS aracılı ekspresyonunu (TLR4) ve LPS aracılı bariyer bozulmasını inhibe eder; Vicenin-2 ayrıca lökositlerin yapışmasını ve HUVEC'lerin EPCR atılmasına doğru göçünü azaltır. Vicenin-2'in bu bariyer koruyucu etkileri, Vicenin-2 ile tedavinin LPS kaynaklı mortalitenin azalmasıyla sonuçlandığı bir fare modelinde doğrulanmıştır. Vicenin-2, vasküler enflamatuvar hastalıkların tedavisi için potansiyel bir aday olarak kabul edilebilir (Kang ve ark. 2015).

2.5.2.2.3. Radyo-koruyucu etki

Vicenin-2 ve orientin, insan periferik kan lenfositlerinde radyasyona bağlı mikronükleuslara karşı doza bağımlı bir koruyucu etkiye sahiptir (Vrinda and Uma Devi 2001).

2.5.2.2.4. Antitrombotik ve antiplatelet Etkisi

Le ve arkadaşları, çalışmasında Vicenin-2'in HUVEC'lerde FXa ve trombin üretimini inhibe ederek ekstrinsik ve intrinsik kan pıhtılaşma yollarını inhibe ettiğini

ve VCN'nin TNF- α ile PAI-1 salgılanmasını inhibe ettiğini gösterdi (Lee ve ark. 2015).

2.5.2.2.5. Antitümör aktivitesi

Vicenin-2 ayrıca prostat hücrelerinin karsinomu üzerinde anti-proliferatif, anti-anjiyojenik ve pro-apoptotik etkilere neden oldu. (Islam ve ark. 2014)

Vicenin-2 uygulaması, zamana bağlı olarak Sitokrom C, Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunu artırdı ve antiapoptotik Bcl-2 ekspresyonunu azalttı. Vicenin-2, hücre canlılığını inhibe eder, apoptozu indükler ve HT-29 hücrelerinde hücre döngüsünü durmaya yol açar. Vicenin-2 β -katenin ekspresyonunu ve nükleer birikimi inhibe eder (Yang D, Zhang X 2018).

Nagaprashantha ve ark., Vicenin-2'nin kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla prostat kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini bildirmiştir (Nagaprashantha ve ark. 2011).

Vicenin-2 ayrıca, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde (NSLC) kaspaz 3 aktivitesini arttırırken, fibroblast hücrelerine toksik olmayan ve radyo-koruyucu olduğundan, NSLC tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Baruah and Kma 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Materyaller

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesinin Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

10, 200, 1000, 5000 µL mikropipet ucu (Axygen, İngiltere)
15 ve 50 ml santrifüj tübü (Isolab, Almanya),
25 ve 75 cm² hücre kültürü kabı (Greiner bio-one, A.B.D)
2 mL Eppendorf tüpleri (Greiner bio-one, A.B.D),
12 kuyucuklu plak (Isolab, Almanya)
5 ve 10 mL steril enjektör (Hayat, Türkiye)
5, 10 ve 25 ml steril tek kullanımlık pipet (Costar, Sigma-Aldrich, Almanya)
6-kuyucuklu hücre kültürü plakları (TPP, İsviçre)
96-kuyucuklu hücre kültürü plakları (TPP, İsviçre)
Lamel (Isolab, Almanya),
Filtre (Sartorius stedim, Almanya);
Parafilm (Pechiney, Fransa),
PH indikatörü (Macherey- Nagel, Almanya),
Thoma lamı (Marienfeld, Almanya),
A594 hücre hattı (ATCC, ABD)
CCD-19 Lu hücre hattı (ATCC, ABD)
MTT (3-(4,5- Dimetylthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromit %98'lik)
(Alfa Aesar, Almanya)
Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) (Sigma-Aldrich, Almanya)
Dimetil sulfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, Almanya)
Fetal Bovin Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya)
Penisillin- Streptomisin Çözeltisi (10.000 U/mL Penisillin / 10 mg/mL
Streptomisin) (PAN, Almanya)
Cis-Diamineplatium(II) diklorit (Sigma Aldrich, ABD)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Almanya);
Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Trypan mavisi (Biological Industries, İsrail)
Trypsin-EDTA çözeltisi (Biochrom, Almanya),
Anneksin V-FITC/PI Apoptoz tanımlama Kiti (BD Biosciences, ABD)
PE Aktif Kaspaz-3 tanımlama kiti (BD Biosciences, ABD)
MitoScreen (JC-1) membran potansiyel tanımlama kiti (BD Biosciences, ABD)
LumiTrans® PCI Biotech AS (Oslo, Norveç)
LB medium Bio 101
İnsan Semaforin 3F ELISA Kit (Shanghai, Çin)
İnsan Nörofilin 2 ELISA Kit (Shanghai, Çin)
İnsan Büyüme faktörü ELISA Kit (Shanghai, Çin)
Acridine orange
Ethidium Bromide
Orientin (HWI Analytik GmbH, Almanya)
Vicenin (HWI Analytik GmbH, Almanya)
2X Magic SYBR mix (Procomcure Biotech GmbH, Avusturya)
ViitaScript FirstStrand cDNA Synthesis Kit (Procomcure Biotech GmbH, Avusturya)
MicroAmp Hızlı Optik 96 Kuyucuklu Reaksiyon Plakası (Life Technologies)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Ters mikroskop (Leica, Almanya),
Mulltimod Mikroplaka Okuyucu Görüntüleme Sistemi (Cytation 5, BioTek, ABD)
Akış sitometresi (CytoFLEX Beckman Coulter)
Stratagene Mx3005P RT PCR Isıl Döngü Cihazı (Agilent Technologies, ABD)
Laminer Akış kabini (Mars Scanlaf, Labogene ApS, Danimark),
HeraSafe KS Moleküler Biyoloji Laminer Kabin (Thermo, Kanada)
Masaüstü soğutmalı santrifüj (Hettich Lab Teknoloji, Almanya),
Derin dondurucu buzdolabı (Nuair, U.S.A)
Steril CO2 inkübatörü (Binder, Almanya)
Sterilizatör (Heraeus, Almanya)
Su Banyosu (Nüvem Türkiye),

Sıvı nitrojen tankı (Taylor Wharton, ABD)
Hassas denge (Mettler Toledo, ABD),
Otoklav (Eryiğit A.Ş. Türkiye),
Orbital çalkalayıcı (Heidolph, Almanya)
Şarj edilebilir pipet kontrolü (Starlab, Almanya),
Otomatik mikropipetlerin farklı hacimleri (Thermo, FinnPet, Kanada),
Girdap (Heidolph, Almanya)
Distile su makinesi (Sartorius Stedim, Almanya)
Ultrasonik su banyosu (BD, ProbeTecET, ABD)
Bay Frosty (Nalgene, ABD)
Imaging System Iris (Logos Biosystems, Güney Kore)
StepOnePlus Real-Time PCR (Thermo Fisher, ABD)
NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher, ABD)
SimpliAmp Thermal Cyclers (Thermo Fisher, ABD)
Bioprep-24 Homojenizatör (Hangzhou Allsheng Instruments, Çin)

3.1.3. Hücre hatları

Çalışmada kullanılan bütün hücre hatları ATCC (ABD)'den temin edilmiştir. İnsan kanserli akciğer hücre hattı A549 (ATCC® CCL-185™), insan normal akciğer hattı ise CCD-19Lu (ATCC® CCL-210™) olarak tanımlanmıştır.

3.2. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması

3.2.1. Orientin hazırlanması

Orientin konsantrasyonunun hazırlanmasında literatürdeki IC₅₀ verilerinden yararlanılmıştır. Stok çözelti konsantrasyonu 10 mg/ml olarak hazırlanmış olup, her vialde 10 mg bulunan orientin 1 ml DMSO içinde çözülmüştür. Çalışmada kullanılan 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3.125 µg/ml konsantrasyonlar stok çözültiden seri dilüsyon ile elde edilmiştir. Konsantrasyondaki en yüksek DMSO oranı %0,1 olarak kullanılmıştır. Bütün adımlar her bir analiz için tekrarlanıp, taze çözültüler ile deneyler yürütülmüştür.

3.2.2. Vicenin-2 hazırlanması

Vicenin-2 konsantrasyonunun hazırlanmasında literatürdeki IC₅₀ verilerinden yararlanılmıştır. Stok çözelti konsantrasyonu 5mg/ml olarak hazırlanmış olup, her vialde 10 mg bulunan Vicenin-2 ml DMSO içinde çözünmüştür. Çalışmada kullanılan 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3.125 µg/ml konsantrasyonlar stok çözültiden seri dilüsyon ile elde edilmiştir. Konsantrasyondaki en yüksek DMSO oranı %0,1 olarak kullanılmıştır. Bütün adımlar her bir analiz için tekrarlanıp, taze çözültüler ile deneyler yürütülmüştür

3.2.3. Sisplatin hazırlanması

Toz halinde alınan (Acros Organics, Belçika) sisplatin, deneylerde pozitif kontrollerden biri olarak kullanılmıştır. Analizler için 20 mg tartılıp 500 µL DMSO içinde çözdürülerek ana stok olarak hazırlanmıştır. 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 ve 3.90625 µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Konsantrasyonlarda en yüksek DMSO oranı %0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her analiz için bu adımlar tekrarlanıp taze ana stoklar elde edilmiştir

3.3. Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Deneye Hazırlık

3.3.1. Materyal Sterilizasyonu

Deneyler steril ve tek kullanımlık malzemeler ile yürütülmüştür. Deneylerde kullanılan cam ve metal malzemeler her yeri kapanacak şekilde alüminyum folyoya sarılıp steril edilmiş, 200° C'de 2 saat boyunca kuru hava ile, sıvı malzemeler ise 121° C 1.5 atm basınç altında 20 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Otoklavlanamayan sıvılar ise 0,22 mikron filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir.

3.3.2. Hücrelerin stoklanması ve pasajlanması

Hücreler ihtiyaç duyulmadığı zaman uygun koşullarda stoklanmıştır. A549, CCD19-lu ve L929 hücreler PBS ile yıkanmış, tripsin ile kaldırıldıktan sonra santrifüjlenip yoğunluğu 1 x 10⁵ hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Hücreler 2

ml'lik viallere aktarılıp, donma koruyucu olarak 100 µl DMSO ilave edilmiştir. Gece boyunca -86 ° C derin dondurucuda tutulduktan sonra, sıvı azot tankına (-196 ° C) alınıp sonraki kullanım için stoklanmıştır.

Hücreler ihtiyaç oldukları zaman sıvı azot tankından alınıp, hızlıca (1 dakikanın altında) 37°C steril su banyosunda çözündürülmüştür. Hücreler çözdürüldükten sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, DMSO'dan arındırılmıştır. Sonrasında hücre hatları inkübatöre yerleştirilip, besi ortamı 2-3 günde bir yenilenmiştir. Kültür kapları %70 doluluk oranına ulaştığında, alt kültür elde edilip pasajlanmıştır.

3.3.3. Hücre hatları sayımı

Deneyler için kültürü yapılan hücre hatları 1x PBS (phosphate salin buffer) ile ikişer kez yıkanmıştır. Kültür flasklarının boyutu ve hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak 0,5-1 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklenmiş ve inkübatörde bekletilerek hücrelerin flaskın yüzeyi ile olan bağlantısının kesilmesi beklenmiştir. Tripsin-EDTA inhibisyonunu sağlayabilmek için flasklara 5mL ilgili besi yeri eklenip, hücreler 15mL'lik falkon tüplere alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda, süpernatant dökülerek, kalan pellete 1 mL uygun besiyeri eklenerek pipetleme yardımıyla homojenize edilmiştir. Yapılan bütün deneylerden önce hücreler sayılarak hesaplanmıştır. Hücre sayımı için tripan mavisi solüsyonundan bire bir oranında karıştırılarak Thoma lamında sayılmıştır. Sayım için (1) formül kullanılmıştır.

- (1) Toplam hücre sayısı=16 büyük karedeki hücre sayısı x 10,000 x dilüsyon sayısı

3.4. Metodlar

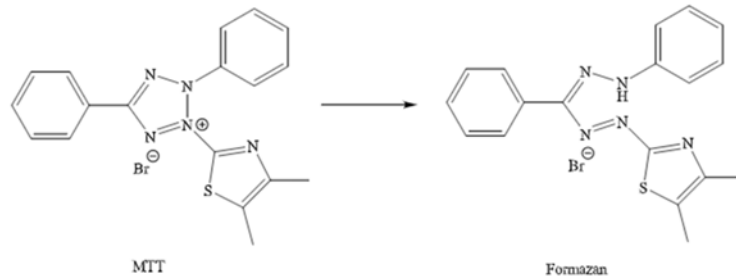
3.4.1. Hücre kültürü

A549 ve CCD-19lu hücreleri her iki haftada bir RPMI 1640 ve %10 fetal sığır serumu, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 2 mM glutamin (tam büyüme besi yeri) ilaveli DMEM besi yerinde 37°C'de 5 % CO2 içeren nemli

atmosferde ile alt kültür elde edilmiştir. Deneylerden önce hücreler tripsin ile kaldırılarak pellet haline getirilmiş (1200 rpm’de 4 dakika santrifuj edilerek), sonrasında tam büyüme besiyerinde tekrardan askıya alınmıştır. Süspansiyondaki hücre miktarı “glasstic®slide 10 with grids” (Hycor Biomedical Inc., Garden Grove, CA, ABD) kullanılarak sayılmıştır ve uygun miktarda hücre deney için ekilmiştir.

3.4.2. MTT analizi

MTT analizi, hücrenin yaşayabilirliği, proliferasyonu ve sitotoksosite göstergesi olarak hücrenin metabolik aktivitenin ölçümü olarak kullanılmaktadır. Bu kolorimetrik analiz, sarı tetrazolium tuzunun (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromit ya da MTT) pembe formazan kristallerine metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenmesi temeline dayanır. Yaşayan hücreler, NAD(P)H-bağımlı oksidoreduktaz enzimleri içerir ve bu enzimler MTT’yi formazan tuzuna dönüştürmektedirler. Çözünmeyen formazon kristaller, çözücü yardımıyla çözülür ve çoklu-hücre spektrofotometresi ile 540nm’de absorbans vererek miktar tayini yapılabilir. Çözelti ne kadar koyu renkli olursa, yaşayan hücre sayısının (metabolik olarak aktif hücrelerin) o kadar fazla olduğu söylenebilir.



Şekil 3.1. MTT molekülünün mitokondriyal redüktaz analiz sonunda formazan kristaline dönüşümü (Sukhramani et al. 2011).

3.4.2.1. Yöntemin uygulanması

Hücreler 96’lık düz tabanlı kuyucuklara besi yeri içinde ekilmiştir ve kuyucuklardaki hücre yoğunluğu 1×10^4 olarak ayarlanmıştır. 24 saat sonra besi yeri

değiştirilmiş ve hücrelerin ilgili belirlenen konsantrasyondaki kimyasal bileşikler ile 24 saat etkileşimi sağlanmıştır. İlaç ile inkübasyonun sonunda her kuyucuğa MTT (0.5 mg/mL son konsantasyon) ilave edilmiş ve 4 saat boyunca tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Çözünmeyen formazan kristallerinin 100 mL %100(h/h) DMSO ile çözünmesi sağlanmıştır. Plaklar otomatik plak okuyucu ile 570 nm’de okunmuş ve absorbans değerleri hesaplanmıştır.

İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi spektrofotometrinin sağlamış olduğu absorbans değerler ile hücre canlılığı arasında bağlantı bulunmaktadır.

Hesaplama işlemi (x) ‘de verildiği gibidir.

$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \times 100 \quad (x)$

Hesaplama sonuçlarına göre, hücre popülasyonunun %50’sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon IC50 ve %50 inhibisyonun yarısını sağlayan IC50/2 değerleri belirlenmiştir. Bulunan konsantrasyonlar apoptoz belirleme ve gen aktivasyon / inhibisyon deneylerinde kullanılmıştır.

3.4.3. Akım sitometri

Apoptoz sürecinin karakterizasyonu, tayini ve tanımlaması için bir çok teknik bulunmaktadır. Fakat, akış sitometresi (Flow cytometry; FCM) apoptik kaskatın hücre tipi, zaman ve tetiklenmesi ile ilişkisinin ortaya çıkarılmasında en çok tercih edilen metottur.

3.4.3.1. JC-1 boyama ile hücrelerin mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi

Mitokondri aracılığıyla apoptozun en erken indikatörleri, mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimlerdir. Bu depolarizasyonu, membran geçirgenliğinde artış ve sitokrom c, AIF, mac/DIABLO ve çeşitli pro-kaspaz gibi çözünen hücreler arası proteinlerinin sitoplazmaya salınımı takip eder. The BD™ MitoScreen Kiti (JC-1 içeren) erken dönem apoptozda apoptotik hücrelerin sayımı için floresans temelli analiz sağlamaktadır.

3.4.2.1.1. Yöntemin uygulanması

Hücre yoğunluğu, her hücrede 1×10^6 olacak şekilde geliştirildikten sonra, 0 – 50 Amol/L DMSO konsantrasyon aralığında Vicenin-2 ve Orientin ile %5 CO₂ varlığında 37°C’de 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. 24 saatlik işlemin sonunda, hücreler nazıkçe kazınıp 1200rpm’de oda sıcaklığında 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice alınıp atılmış, hücre PBS ile ikişer kere yıkanmış ve 0,5 ml taze hazırlanmış JC-1 çalışma çözeltisi her bir pellete ilave edilip tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. JC-1 çalışma çözeltisindeki hücreler 37°C 10-15 dakika boyunca CO₂ inkübatöründe muhafaza edilmiştir. İnkübasyonun ardından yapılan yıkama sonrasında, ilk yıkama: 2ml hacimde 1 x Assay Tamponu her tüpe ilave edilip tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Hücreler 1200 rpm 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. 2. Yıkama: 1 ml 1 x Assay Tamponu her bir tüpe ilave edilmiş ve aynı şartlarda santrifüj edildikten sonra hücreler akış sitometrisi ile analiz edilmiştir.

3.4.2.2. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

Plazma membranındaki değişimler apoptozun erken özelliklerindedir. Apoptotik hücrelerde, membrane fosfolipiti ve fosfatidilserin (PS) plazma membranının iç ve dış tarafında yer değiştirir. Böylelikle, PS dış hücresel çevre ile maruz kalır. Annexin V 35-36kDa boyutunda ve Ca⁺² bağımlı fosfolipit bağlanan proteindir. PS’e karşı yüksek afinitesi bulunur ve açıkta PS bulunan hücreler ile bağlanır. Annexin V FITC ve PE, ya da biotin ve işaretli EGFP (Arttırılmış yeşil floresans protein) gibi florokromlar ile konjugat oluşturur. Bu yapı PS’e karşı yüksek afinitesini kaybeder ve bu sebeple apoptoza giden hücrelerin akış sitometrik analizi için duyarlı bir prob olarak hizmet eder. PS’in dışsallaştırılmasının apoptozun erken safhalarında gerçekleşmesinden dolayı, Annexin V boyaması, erken safha apoptozu olarak tanımlanabilir ve DNA fragmentleşmesi gibi çekirdekdeki değişiklik zamanına dayanır. Annexin V boyaması, membranın bütünlüğünü kaybetmesine yol açar ve bununla beraber apoptoz ya da nekrotik süreç ile son evrelerdeki hücre ölümlerine eşlik eder. Bu sebeple, propidium iodat(PI) ya da 7-amino-aktinomisin D (7-AAD) gibi boyalarla bağlanan Annexin V ile boyama işlemi, erken apoptotik hücreler ile ölü ya da apoptozun son safhasındaki hücreler ayırt edilmesine yardımcı olur.

3.4.2.2.1. Yöntemin uygulanması

Kısaca, hücreler, altı oyuklu kültür plakalarında 1×10^6 hücre yoğunluğunda büyütüldü ve 24 saat boyunca farklı vicenin-2 ve Orientin konsantrasyonları (DMSO'da 0-50 Amol / L) ile işleme tabi tutuldu ve 37°C 'de muhafaza edildi. Nemlendirilmiş % 5 CO2 atmosferi. 24 saatlik muamelelerin ardından, Hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve daha sonra 1×10^6 hücre / ml'lik bir konsantrasyonda 1X Bağlama Tamponu içinde yeniden süspense edildi. 100 ul solüsyon (1×10^5 hücre) 5 ml'lik bir kültür tüpüne aktarılır.

3.4.2.3. Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

Apoptozun en erken ve en tutarlı olarak gözlemlenen özelliklerinden biri, bir dizi sitozolik proteazın, çoklu protein substratını toplu halde parçalayan kaspazların aktivasyonudur, bu da hücre yapısı ve fonksiyon kaybına yol açar ve sonuçta hücre ölümüyle sonuçlanır. Özellikle, -3, -8 ve -9 kaspazlarında apoptozla ilişkilendirilmiştir: mitokondriyaldeki kaspaz-9 yolu, Fas / CD95 yolunda kaspaz-8 ve kaspaz-3 akış aşığı, birden çok yolla etkinleştiriliyor.

Aktif kaspaz-3, apoptoz geçiren hücrelerin güçlü bir belirteci olarak ortaya çıkmıştır ve varlığının apoptozun göstergesi olduğu düşünülmektedir. Kaspaz-3, apoptozun erken aşamalarında aktive olan anahtar bir proteazdır. Aktif formunda, diğer kaspazların yanı sıra sitoplazma (örn., D4-GDI) ve çekirdekteki (örn., PARP) ilgili hedefleri proteolitik olarak ayırır ve aktive eder.

3.4.2.3.1. Yöntemin uygulanması

BD Perm / Wash TM tamponu (1X) ve antikör miktarı belirlendi ve örnek sayısına göre hazırlandı. Hücreler iki kez soğuk 1X PBS ile yıkandı, daha sonra 1×10^6 hücre / 0.5 ml konsantrasyonda BD Cytotfix / Cytoperm TM solüsyonunda yeniden süspense edildi ve ardından 20 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Hücreler santrifüjlendi, BD Cytotfix / Cytoperm TM solüsyonu atıldı ve oda sıcaklığında 0.5 ml

tampon / 1×10^6 hacimde BD Perm / Wash™ tamponu (1X) ile iki kez yıkandı. Hücreler, yukarıda hesaplanan BD Perm / Wash™ tamponu (1X) artı antikor içinde yeniden süspansiyon edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Her test 1.0 ml BD Perm / Wash™ tamponunda (1X) yıkandı, ardından 0.5 ml BD Perm / Wash™ tamponunda (1X) yeniden süspansiyon edildi ve akış sitometrisi ile analiz edildi.

3.4.3. RT-PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile BCL-2, BAX, CYD1, ERK, pERK, VEGF, Sema 3F AND NP2 genlerinin ifadelerinin (ekspresyon) belirlenmesi

Bilimsel, tıbbi ve teşhis topluluklarına, kantitatif nükleik asit analizi için en güçlü araç sunulmuştur: gerçek zamanlı PCR. Bu yeni teknik, Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen orijinal Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) geliştirilmiş halidir. 80'lerin ortasında, Kary Mullis kimyada 1993 yılı Nobel ödülüne layık görüldü. PCR ile, esasen karmaşık bir numunede bulunan herhangi bir nükleik asit dizisi, kolaylıkla analiz edilebilen çok sayıda özdeş kopya üretmek için bir dögüsel işlemde amplifiye edilebilir.

Gerçek zamanlı PCR'de, oluşan ürün miktarı ile orantılı olan reaksiyona katılan boyaların veya problemlerin floresansının izlenmesiyle reaksiyon sırasında izlenir ve bir elde etmek için gerekli amplifikasyon döngülerinin sayısı belirli miktarda DNA molekölü kaydedilir. Tipik olarak amplifikasyon döngüsü başına moleköl sayısının ikiye katlanmasına yakın olan belirli bir amplifikasyon verimliliği varsayıldığında, amplifiye dizinin numunede başlangıçta mevcut olan DNA moleküllerinin sayısını hesaplamak mümkündür. Günümüzde mevcut olan yüksek verimli tespit kimyaları, hassas enstrümantasyon ve optimize edilmiş tahlillerle, karmaşık bir örnekteki belirli bir dizideki DNA moleküllerinin sayısı, benzeri görülmemiş bir şekilde belirlenebilir. tek bir molekölü tespit etmek için yeterli doğruluk ve hassasiyet. Gerçek zamanlı PCR'nin tipik kullanımları arasında patojen tespiti, gen ekspresyon analizi, tek nükleotid polimorfizm (SNP) analizi, kromozom sapmalarının analizi ve en son olarak da gerçek zamanlı immüno PCR ile protein tespiti yer alır.

Moleköl biyoloji tekniklerinde en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu teknikte seçilen DNA dizisi, diğer diziler baskılanırken çoğaltılır. Böylece, istenen

DNA dizisini belirlemek daha kolaydır. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisini içeren bir şablon DNA tamamlayıcısı olarak tasarlanan oligonükleotid primerler, Taq polimeraz enzimlerinin sıcaklığa karşı en önemli bileşenleridir. PCR ürünleri analiz edilerek 3 çeşit bilgiye ulaşılabilir.

1. Hedef DNA dizisinin varlığının ve varyasyonunun belirlenmesi,
2. Başlangıç materyali olarak kullanılan DNA veya RNA miktarını belirlemek için çoğaltılan PCR ürünü miktarının belirlenmesi,
3. Dizi analizi.

Ek olarak, PCR 3 temel adımdan oluşur.

1. Denatürasyon (94 ° C-98 ° C / 15 saniye): DNA sarmalını yüksek sıcaklıklarda birbirinden ayırma adımı.
2. Hibridizasyon) (37 ° C-65 ° C / 30 saniye): Sentezlenen oligonükleotid primerlerinin istenen bölgeye bağlanması.
3. Uzama (72 ° C / 1.5 saniye): Mg iyonlarının varlığında sıcaklık yükseldikçe, Taq DNA polimeraz primerleri genişletir ve yeni DNA zinciri sentezlenir.

PCR ürününün miktarı, bu 3 adımın tekrar sayısına bağlıdır. İlk aşamada yüksek sıcaklıklara çıkmanın nedeni, DNA'nın spiral yapısını koruyan nükleotidler arasındaki hidrojen bağlarının birbirinden koparak denatürasyona uğramasıdır. İkinci aşamada, Taq polimeraz enziminin tamamlayıcı primerleriyle (oligonükleotidler) DNA molekülüne karışması için sıcaklık düşürülür. Primerlerin bağlanmasıyla oluşturulan ikinci sarmalın oluşumu, Taq polimerazın d-NTP (nükleotid trifosfatlar) kullanılarak uzatılmasıyla devam eder. Bu aşama polimerizasyon aşamasıdır. Primer uzatılır ve astarlar arasındaki alan temizlenir. DNA yeniden denatüre edilir, yeni primerler eklenir ve DNA sentezi tekrar devam eder. DNA parçasının miktarı her döngüde ikiye katlanır. Ek olarak, Mg ++ iyonu bir kofaktör görevi görür, eksikliğinde yanlış eşleşmeler olabilir.

Primer tasarımı PCR analizi yapılmadan önce yapılmalıdır. Hedeflenen bölgeyi yeniden üretmek için orada benzersiz primerler tasarlanmalıdır. Ortalama

primerin boyutu 18-22 baz çiftinden oluşur. Düşük baz çiftlerine sahip primerler özgülüğü azaltırken, çok sayıda baz çiftinden oluşan primerlerin DNA'ya bağlanması zorlaşır.

Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR), Reverse transkriptaz enzimi yardımıyla hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi sonucunda gen ekspresyon analizlerinin yapıldığı bir yöntemdir.

PCR, 5 önemli bileşenden oluşur. Bunlar şunları içerir: Kalıp DNA, DNA polimerazlar, Primerler, dNTP karışımı, tamponlar ve Magnezyum.

1. RNA izolasyonu

PCR analizinden önce atılması gereken ilk adım RNA izolasyonudur. Bu aşamada A549 hücre hattı kullanıldı.

Herhangi bir ilaç içermeyen A549 hücre hattının şişeleri kontrol grubu olarak seçildi. Deney grubu olarak seçtiğimiz A549 hücre hattı gruplarına MTT analiz sonuçlarına göre belirlenen IC50 dozları uygulandıktan sonra 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Kit protokolünde RNA izolasyonu yapıldı.

Hücreler bağlı oldukları yüzeyden Tripsin-EDTA ile çıkarıldı, tripsin inhibisyonu ortam ilave edilerek yapıldı. Hücreler 15 mL tüplere yerleştirildi, santrifüjlendi ve süpernatant çıkarıldı.

Hücreler mikrosantrifüj tüplerine bölündü. Tüpler, 2000 rpm'de t 4 ° C'de santrifüjlendi ve süpernatant çıkarıldı, 100 uL Script RT-PCR numune hazırlama reaktifi (sitoplazmik RNA'nın izolasyonu ve stabilizasyonu için liziz tamponu) ilave edildi. Daha sonra 30 saniye vortekslendi ve tekrar 15,000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi ve süpernatant dikkatlice toplandı.

PCR analizi, Bio-Rad'ın IQTM SYBR® Green Supremix veya IQTM supermix'te verilen talimatlarına göre yapıldı. İşlemler için deney olarak kullandığımız hücre hatlarına uygun Housekeeping geni olan beta-aktin seçilerek uygun primerler kullanıldı.

Tablo 3.1. RT-PCR analizi primerleri

Gen sembolü	Sekanslar	Primer	Ürün uzunluğu (bp)
Bcl-2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC	Forward	20
	TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC	Reverse	
Bax	CGGGTTGTGCGCCCTTTTCTA	Forward	20
	TGGTTCTGATCAGTTCCGGC	Reverse	
CYD1	CAGATCATCGCGAAACACGC	Forward	20
	AAGTTGTTGGGGCTCCTC	Reverse	
ERK	CCCTGCCTGTGTGCACTTAT	Forward	20
	CTTGGTCCGTAGCCAGTTGT	Reverse	
pERK	ATGAGACAGAGTTGCGACCG	Forward	20
	TGGATGACACCAAGGAACCG	Reverse	
VEGF	CCACACCATCACCATCGACA	Forward	20
	CTTCCGGGCTCGGTGATTTA	Reverse	
SEMA 3F	GGGTCCGGCTCTCATTCAAA	Forward	20
	TCGGTTGTGTTGAGCAGGAA	Reverse	
NP-2	ATAGCCCCTCCTCCTGTTGT	Forward	20
	TTTTTCAGGGAATCCGGGGG	Reverse	

Kendi hücre dizilerimizin analizi sonucunda, sonuçlar, etkili RNA miktarını görmek için değerlendirildi ve Ct değerleri, IScript RT tarafından işlenebilecek maksimum hücre konsantrasyonunu belirlemek için hücre konsantrasyonunun loguna karşı çizildi. -qPCR numune hazırlama reaktifi.

2. Tamamlayıcı DNA (c-DNA) sentezi

RT-PCR analizi için c-DNA, hem kontrol grubu hem de deney gruplarının analizi için A549 hücre hatlarından izole edilen RNA'lardan sentezlendi. c-DNA sentezi, kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

2 µL nükleaz içermeyen (DNA / RNA içermeyen) tüpler kullanılmıştır.

Deney grupları olarak ayrılan tüplere 4 µL, 5x IScript reaksiyon karışımı, 1 µL IScript Gerçek zamanlı, 7.5 µL RNA şablonu (1 µg RNA) ve 7.5 µL nükleaz içermeyen su (DNA / RNA içermeyen su) eklenmiştir. Toplam hacim 20 uL'ye tamamlandı.

Daha sonra örnekler PCR cihazına yerleştirilerek 25 ° C'de 5 dakika, 42 ° C'de 30 dakika, 85 ° C'de 5 dakika ve 4 ° C'de sonsuz termal profil oluşturularak PCR başlatıldı.

Analizin sonunda, tüpler gerçek zamanlı kantitatif PCR'de kullanılmak üzere 20 ° C'de saklandı.

3. Supermix, Taqman problemleri ve primerlerinin hazırlanması.

Hazırlama ve yeniden yapılandırma, süpermix, Taqman problemleri ve primerlerinin protokollerine göre gerçekleştirildi. Supermix hazırlanırken liyofilize pelet şeklindeki tüpe 1 mL seyreltme solüsyonu eklenmiş ve vorteksenerek 2x süpermix solüsyonu hazırlanmıştır. Kullanılincaya kadar -20 ° C'de saklandı. RT-PCR sırasında, ekli primerler nihai konsantrasyondan 0.5 uM (pmol / uL) olacak şekilde ayarlanarak çalışma tamamlandı.

4. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizi

RT-PCR analizi, Bio-RAD SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix kit kontrolüne göre yapılmıştır. Buradaki SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, herhangi bir gerçek zamanlı PCR cihazında boya bazlı gerçek zamanlı PCR için optimize edilmiş 2x konsantre, kullanıma hazır bir reaksiyon süper karışımıdır. Antikor aracılı sıcak başlatma Sso7d füzyon polimeraz, dNTP'ler MgCl₂, SYBR® Green I boya, güçlendiriciler, stabilizatörler ve pasif referans boyaların bir karışımını içerir.

Tablo 3.2. RT-PCR bileşenleri

Bileşen	20 µL reaksiyon başına hacim	Final konsantrasyon
SsoAdvancedTM	10 µL	1x
Universal SYBR® Green Supemix (2x)		
Forward ve Reverse Primerler	1 µL	0,5 uM (pmol/uL)
DNA template	7,5 µL	100 ng-100 fg
Nükleaz-Free H ₂ O	1,5 µL	-
Total reaksiyon hacmi	20 µL	-

Böylece AdvancedTM Universal SYBR® Green Supermix ve diğer donmuş reaksiyon bileşenleri oda sıcaklığına getirilir ve iyice karıştırılır, tüpün dibinde kalan solüsyonları toplamak için kısa süre santrifüjlenir, korurken ışıktan korunur ve buz üzerinde saklanır.

Yukarıdaki Tablodaki bilgilere göre, DNA şablonu dışında gerekli tüm bileşenler eklenir, tüm qPCR reaksiyonları için (buz üzerinde veya oda sıcaklığında) yeterli reaksiyon karışımı hazırlanır.

Reaksiyon karışımı, homojenliği sağlamak ve her qPCR tüpüne veya bir qPCR plakasının oyuklarına eşit kısımlar dağıtmak için iyice karıştırılır. Tüm bu işlemler sırasında iyi pipetleme gereklidir.

Tüplere veya kuyucuklara DNA örnekleri ve DNA'sız H₂O eklenmiştir.

Yuvaları olan plakalar veya tüpler, optik olarak geçirgen bir filmle kaplanır ve reaksiyon bileşimlerinin karışmasına izin vermek için 30 saniye vortekslenir. Tüpler ve plakalar, hava kabarcıklarını çıkarmak ve reaksiyon karışımını kabın altından toplamak için döndürülür.

QPCR tüplerini veya plakasını RT-PCR'ye yükledikten sonra, cihazın PCR protokolü başlatılır ve veri analizi gerçekleştirilir.

3.4.4. Etidyum Bromür ve Akridin Oranj ile çift boyama

Bu prosedür, morfolojik değişiklikleri bir apoptoz kanıtı olarak saptamak için yapıldı, A549 hücreleri, her biri için 1×10^4 hücre / ml yoğunlukta sterilize lam kapak slipleri üzerinde kültürlendi ve 24 saat 37 C° ve % 5 CO₂'de inkübe edildi, ardından orientin ve vicenin-2 ile ayrı ayrı 24 saat daha tedavi edildi. Hücreler daha sonra (1X) PBS ile üç kez, bir kez % 70 etanol ile 5 dakika süreyle yıkandı ve damıtılmış su ile iyice yıkandı. Daha sonra hücreler 1800 ul PBS içinde 200 ul Akridin turuncusu (100 ug / ml) ve Etidyum bromür karışımı (100 ug / ml) ile boyandı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Hücreler (1X) PBS ile üç kez yıkandı ve Iris dijital görüntüleme sistemi kullanılarak incelendi.

3.4.5. ELISA

ELISA, ilk olarak Engvall E. ve diğerleri tarafından tanımlanan immünolojik bir yöntemdir. Peptidlerin, proteinlerin, hormonların ve antikorların tespiti ve ölçümü için bir yöntemdir. Testte özel bir antikor veya antijen türü ile kaplı 96 oyuklu bir polistiren ELISA plakası kullanılır. Birkaç ELISA testi türü vardır, ancak en yaygın olanı, iki antikor arasındaki analiti yakalayan sandviç prensibidir. Kuyucuklar, ilgi konusu proteinlerin veya antijenlerin bağlanabileceği birincil antikorlarla kaplanır. Proteinler çukurlara bağlandığında enzime konjuge ikincil antikorlar eklenir. İkincil antikorlar, antijenlere özgüdür. Bağlanmayan türleri uzaklaştırmak için bir yıkama adımı yapılır. Son olarak, konjuge enzim tarafından saptanabilir bir ürüne dönüştürülen bir substrat eklenir.

3.4.5.1. Yöntemin tanımlaması

Hücrelerin lizati, hücrelerin 24 saat, 48 saat farklı zaman aralıklarında her bir ilaç sisplatin, orientin ve vicenin-2'den üç konsantrasyonla ($IC_{50} / 2$, IC_{50} , $IC_{50} * 2$) işlenmiş ve dondurma-çözme yöntemi ile toplanmış, daha sonra kullanım için -80 C° de depolanmış.

3.4.5.1.1. ELISA ile İnsan Nörofilini-2'nin kantitatif tespiti

Bu protokol, kitin test prosedürüne göre gerçekleştirildi. Plaka, insan NP-2 antikoru ile önceden kaplanmıştır. Numunede bulunan NP-2 eklenir ve kuyucuklar üzerine kaplanmış antikorlara bağlanmıştır. Ve sonra biyotinlenmiş insan NP-2 antikoru eklenir ve numunedeki Np-2'ye bağlanmıştır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenmiş ve Biotinylated Np-2 antikoruna bağlanmıştır. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış Streptavidin-HRP, bir yıkama adımı sırasında yıkanmıştır. Substrat solüsyonu daha sonra eklenmiş ve insan Np-2 miktarı ile orantılı olarak renk gelişmiş. Reaksiyon, asidik durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve absorbans, 450 nm'de ölçülmüştür.

3.4.5.1.2. İnsan Semaforini 3F'nin ELISA ile kantitatif tespiti

Bu kit bir Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testidir (ELISA). Plaka, insan SEMA 3F antikoru ile önceden kaplanmıştır. Numunede bulunan SEMA 3F eklenir ve kuyucuklar üzerine kaplanan antikorlara bağlanmıştır. Ve sonra biyotinlenmiş insan SEMA 3F Antikoru eklenmiş ve örnekteki SEMA 3F'ye bağlanmıştır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenmiş ve Biotinylated SEMA 3F antikoruna bağlanmıştır. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış Streptavidin-HRP, bir yıkama adımı sırasında yıkanmıştır. Substrat solüsyonu daha sonra eklenmiş ve insan SEMA 3F miktarı ile orantılı olarak renk gelişir. Reaksiyon, asidik durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılmış ve absorbans, 450 nm'de ölçülmüştür.

3.4.5.1.3. ELISA ile İnsan Büyüme faktörünün kantitatif tespiti

Bu kit bir Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testidir (ELISA). Plaka, insan VEGF antikoru ile önceden kaplanmıştır. Numunede bulunan VEGF eklenir ve kuyucuklar üzerine kaplanan antikorlara bağlanmıştır. Ve sonra biyotinlenmiş insan VEGF Antikoru eklenir ve örnekteki VEGF'ye bağlanmıştır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve Biotinylated VEGF antikoruna bağlanmıştır. İnkübasyondan sonra, bağlanmamış Streptavidin-HRP, bir yıkama adımı sırasında yıkanmıştır. Substrat solüsyonu daha sonra eklenir ve insan VEGF miktarı ile orantılı olarak renk gelişmiş. Reaksiyon, asidik durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılmış ve absorbans, 450 nm'de ölçülmüştür.

4. BULGULAR

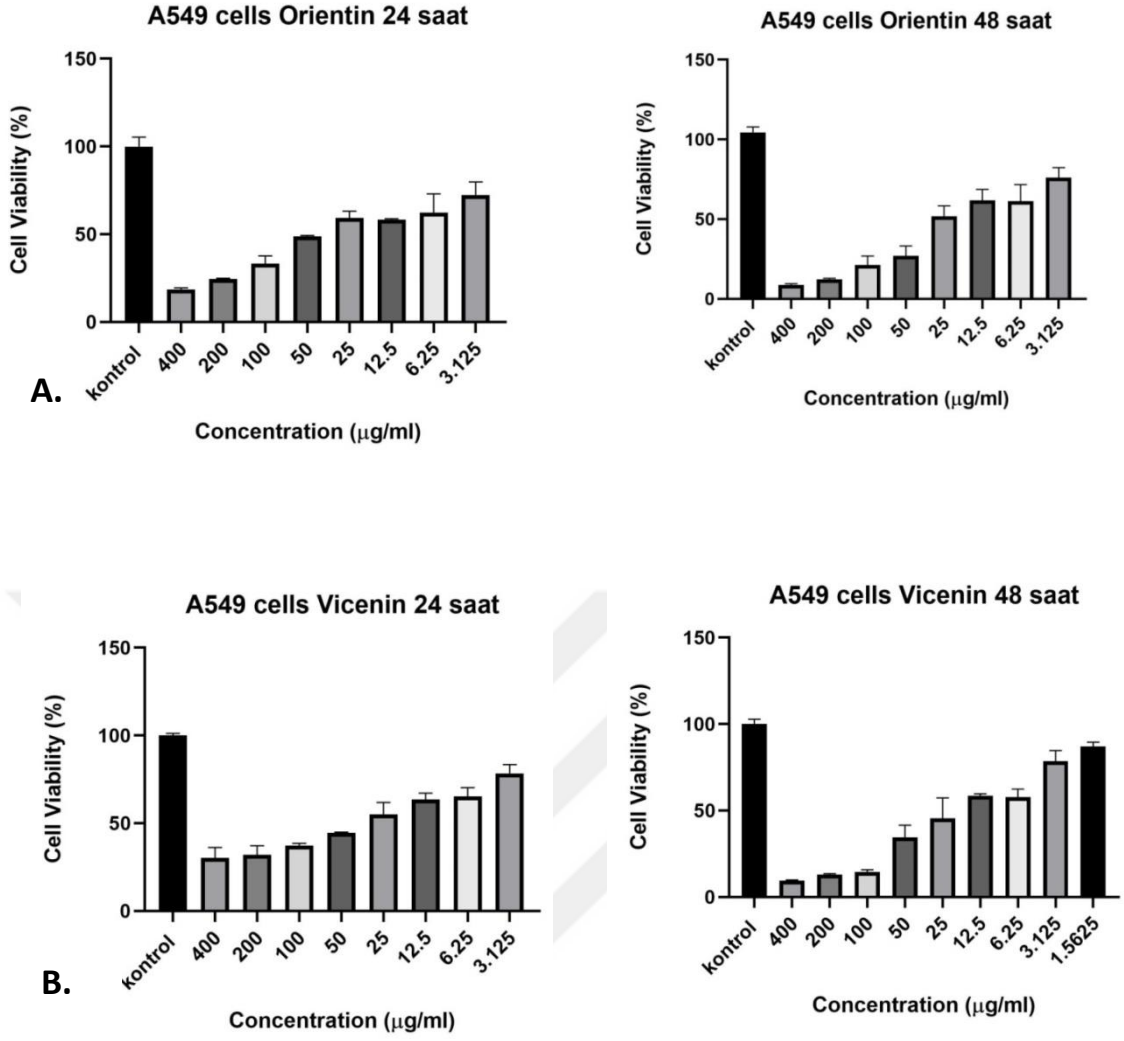
4.1. MTT Sonuçları

4.1.1. *Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 bileşiklerin A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri*

A549 hücre hatlarına, sisplatin, orientin ve vicenin-2 bileşiklerin 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3.125 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulanarak, hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler MTT boyası ile boyanarak tekrar 3 saatlik inkübasyona bırakılmış ve ELISA Reader cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır. Hesaplamalar kontrol canlılığını %100 kabul edilerek, her kuyucuk için ayrı ayrı yapılmıştır. Bileşiklerin 24 ve 48 saatlik etkilerinin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri Microsoft Excel programında grafiksel olarak hesaplanmıştır. Deneyler 6'er kuyucuklu ve tekrarlı olarak yapılmış, pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılmıştır.

Tablo 4.1. *Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 A549 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyon değerleri.*

Uygulanan bileşik	A549 hücre hattı 24. saat IC ₅₀ değerleri	A549 hücre hattı 48 saat IC ₅₀ değerleri
Cisplastin	15 µg/ml	5 µg/ml
Orientin	25 µg/ml	15 µg/ml
Vicenin-2	30 µg/ml	20 µg/ml



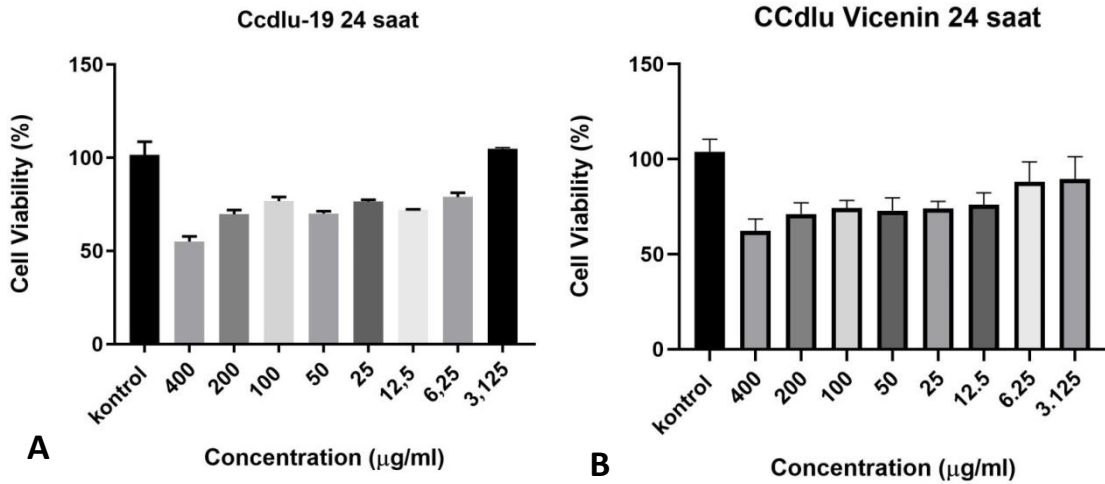
Şekil:4.1 A. Orientin B. Vicenin-2'in MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra A549 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri, Canlılık verileri ortalama \pm SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda $n = 3$). Hem Orientin hem de Vicenin-2i tarafından A549 hücrelerinde hücre proliferasyonu inhibisyonu gözlemlendi. Tek yönlü Anova ile $P < 0.0001$.

4.1.2. *Orientin ve Vicenin-2 bileşiklerin CCD-19Lu akciğer sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri*

CCD-19Lu hücre hatlarına, orientin ve vicenin-2 bileşiklerin 400; 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25,3.125 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulanarak, hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler MTT boyası ile boyanarak tekrar 3 saatlik inkübasyona bırakılmış ve ELISA Reader cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır. Hesaplamalar kontrol canlılığını %100 kabul edilerek, her kuyucuk için ayrı ayrı yapılmıştır. Bileşiklerin 24 ve 48 saatlik etkilerinin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri Microsoft Excel programında grafiksel olarak hesaplanmıştır. Deneyler 6'er kuyucuklu ve tekrarlı olarak yapılmış, pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılmıştır.

Tablo 4.2. *Orientin ve Vicenin-2 CCD-19Lu hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyon değerleri.*

Uygulanan bileşik	CCD-19Lu hücre hattı 24. saat IC ₅₀ değerleri	CCD-19Lu hücre hattı 48 saat IC ₅₀ değerleri
Orientin	>400 µg/ml	>400 µg/ml
Vicenin-2	>400 µg/ml	>400 µg/ml



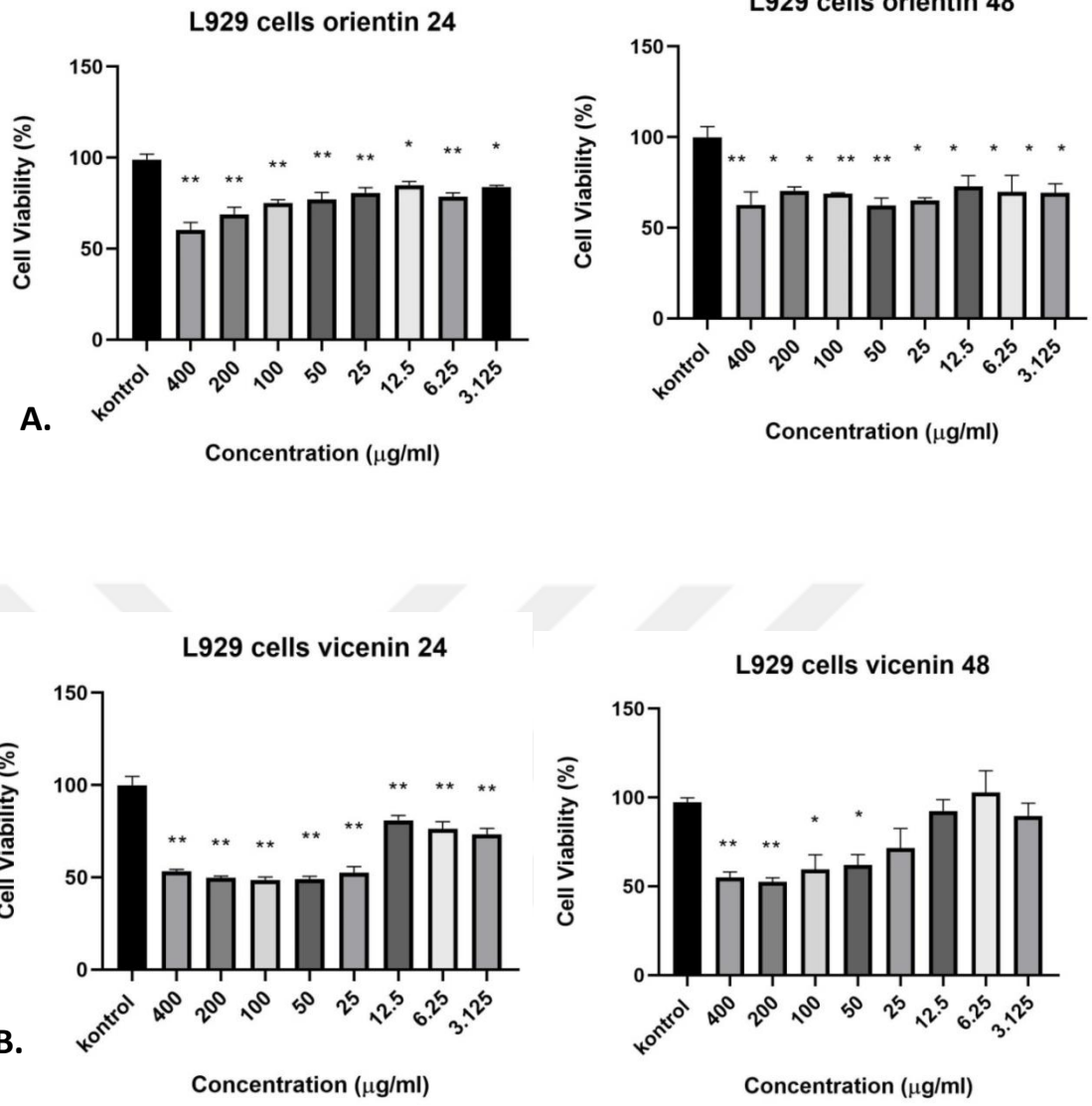
Şekil 4.2. *A. Orientin B. Vicenin-2'in MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra CCD19-Lu hücrelerinin çoğalmasında üzerindeki etkileri, Canlılık için veriler ortalama ± SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda n = 3). P < 0.0001 tek yönlü anova.*

4.1.3. *Orientin ve Vicenin-2 bileşiklerin L929 sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri*

L929 hücre hatlarına, orientin ve vicenin-2 bileşiklerin 400; 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25,3.125 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulanarak, hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler MTT boyası ile boyanarak tekrar 3 saatlik inkübasyona bırakılmış ve ELISA Reader cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır. Hesaplamalar kontrol canlılığını %100 kabul edilerek, her kuyucuk için ayrı ayrı yapılmıştır. Bileşiklerin 24 ve 48 saatlik etkilerinin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri Microsoft Excel programında grafiksel olarak hesaplanmıştır. Deneyler 3'er kuyucuklu ve tekrarlı olarak yapılmış, pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılmıştır.

Tablo 4.3. *Orientin ve Vicenin-2 L929 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyon değerleri.*

Uygulanan bileşik	L929 hücre hattı 24. saat IC ₅₀ değerleri	L929 hücre hattı 48 saat IC ₅₀ değerleri
Orientin	>400 µg/ml	>400 µg/ml
Vicenin-2	100 µg/ml	300 µg/ml



Şekil 4.3 A. Orientin B. Vicenin-2'in MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra L929 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri, Canlılık verileri ortalamalar \pm SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda $n = 3$). (** $P < 0.0001$, * $P < 0.001$)

4.1.4. A549 hücre hattının CCD-19Lu hücre hattına göre selektivite indeksi

Bileşiklerin MTT analiz sonuçlarına göre selektivite indeksi belirlenmektedir. Bunu belirlemek için sağlıklı hücre ile yapılan deneyin IC₅₀ değeri, kanserli hücrenin IC₅₀ değerine bölünerek yapılır. Selektivite indeksi için 24. Saat IC₅₀ değerleri alınmıştır.

Tablo 4.4. 24. Saat IC₅₀ değerlerine göre A549 hücre hatlarının CCD-19Lu hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC₅₀ değeri /Kanserli hücre IC₅₀ değeri).

Hücreler	Cisp	Orientin	Vicenin-2
CCd-19Lu	300	>400	>400
A549	15	25	30
S.I.	20	>16	>13.3

4.1.5 A549 hücre hattının L929 hücre hattına göre selektivite indeksi

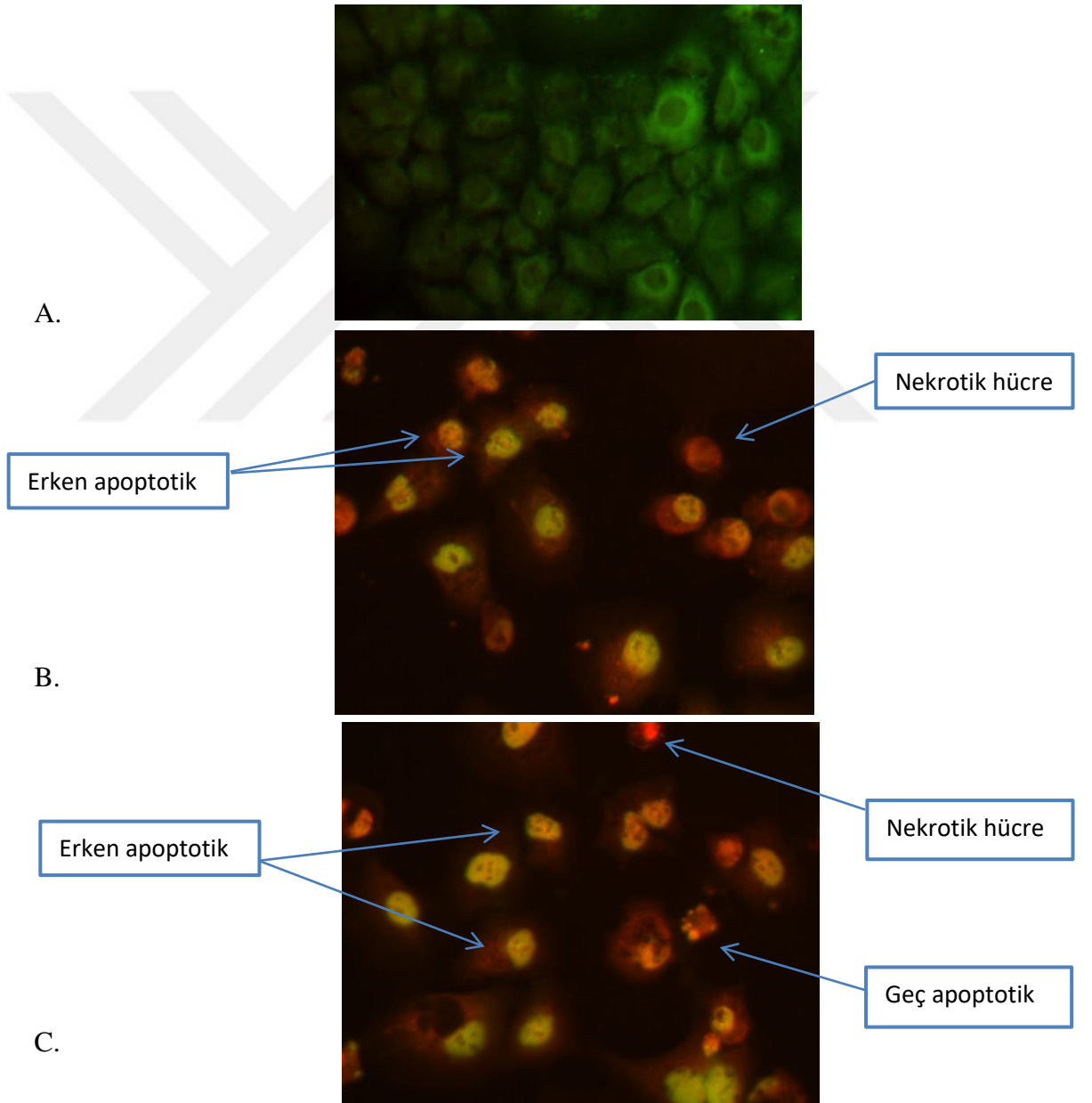
Bileşiklerin MTT analiz sonuçlarına göre selektivite indeksi belirlenmektedir. Bunu belirlemek için sağlıklı hücre ile yapılan deneyin IC₅₀ değeri, kanserli hücrenin IC₅₀ değerine bölünerek yapılır. Selektivite indeksi için 24. Saat IC₅₀ değerleri alınmıştır.

Tablo 4.5. 24. Saat IC₅₀ değerlerine göre A549 hücre hatlarının L 929 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC₅₀ değeri / Kanserli.

Hücreler	Cisp	Orientin	Vicenin-2
CCd-19Lu	100	>400	300
A549	20	25	30
S.I.	5	>16	10

4.2. Hücre Ölümünün Floresan Mikroskobu Analizi Akridin turuncusu / Etidyum bromür (AO / EB) Çift Boyama

Orientin IC_{50} ile tedavi edilen hücreler esas olarak turuncu kırmızı renkli çekirdek, nüklear parçalanma ve yan yoğunlaşma (erken apoptotik) sergilerken, bazı hücreler, zar bütünlüğünde bir kayıp, hücre küçülmesi, zar kabarcıklaşması (geç apoptotik) ve daha az miktarda nekrotik olarak ortaya çıktı. Hücreler gözlemlenirken, tedavi edilmeyen hücreler önemli morfoloji değişiklikleri göstermedi.

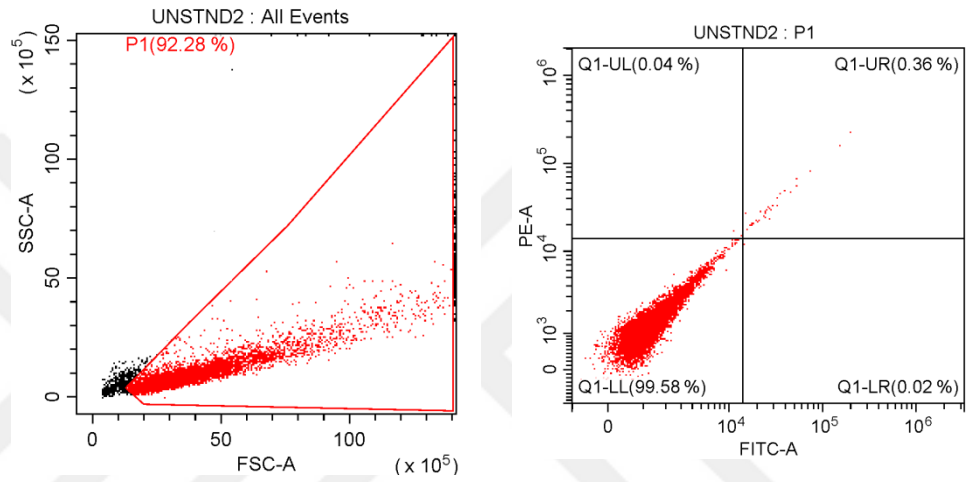


Şekil 4.4. Orientin'in varlığında veya yokluğunda insan akciğer kanseri hücrelerinin akridin turuncusu / etidyum bromürü kullanılarak (Double staining) hücresel boyanması. a) Tedavi olmayan A549 hücreleri b) ve c) Orientin IC_{50} dozu ile tedavi edilen A549 hücreleri

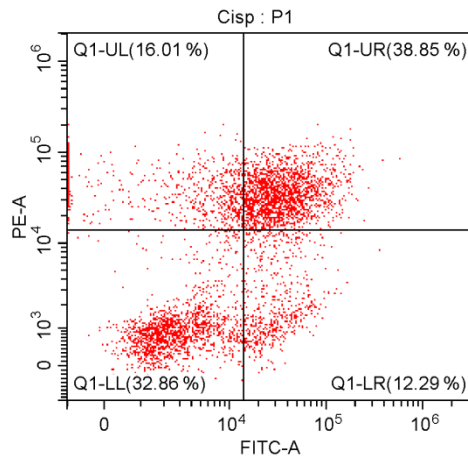
4.3. Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2, Akım Sitometrisi Yöntemleri ile A549 Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi

4.3.1. Akım sitometrisinde Annexin-V FITC-PI analizi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

4.3.1.1. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin, orientin ve Vicenin-2 uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi

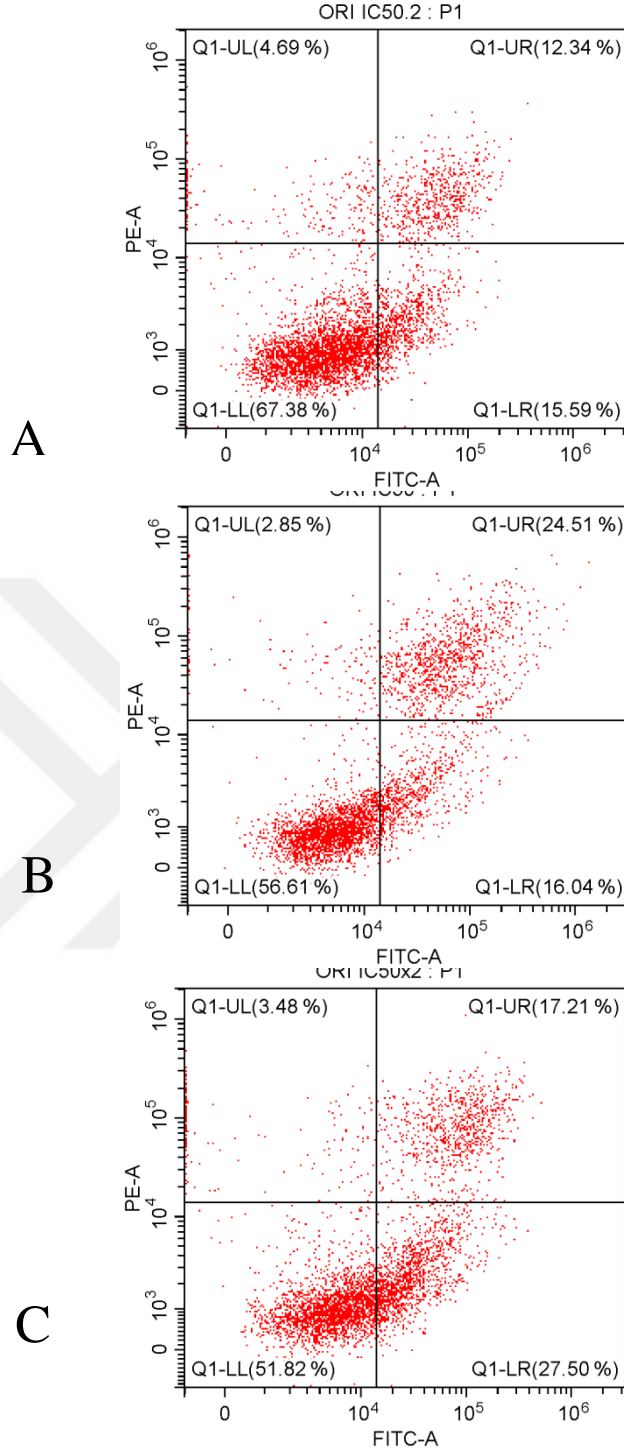


Şekil 4.5. A549 Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol.



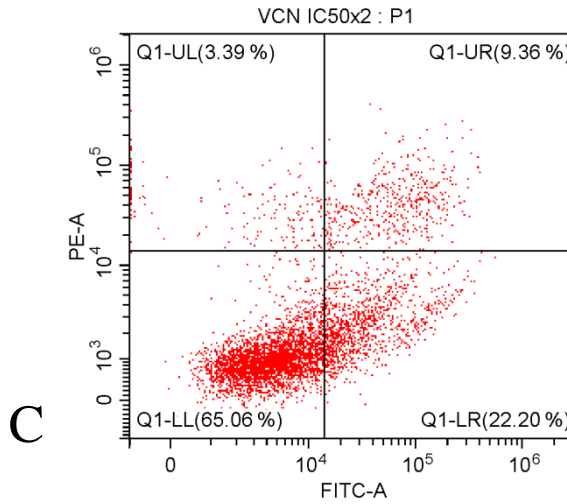
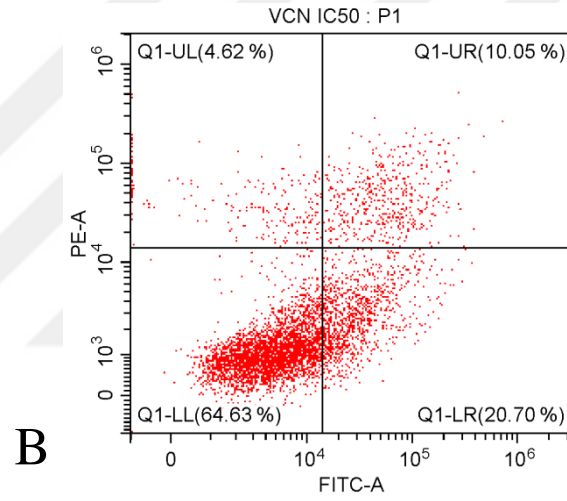
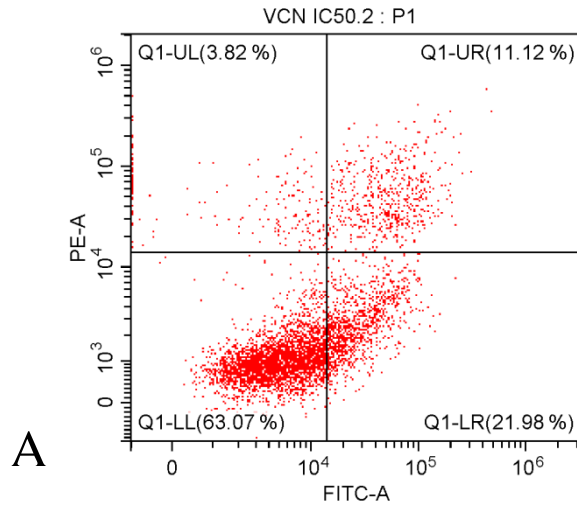
Şekil4.6. Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC₅₀ konsantrasyonunun apoptotik etkiler.

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)



Şekil 4.7. Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, A) IC_{50/2} B) IC₅₀ C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının apoptotik etkiler.

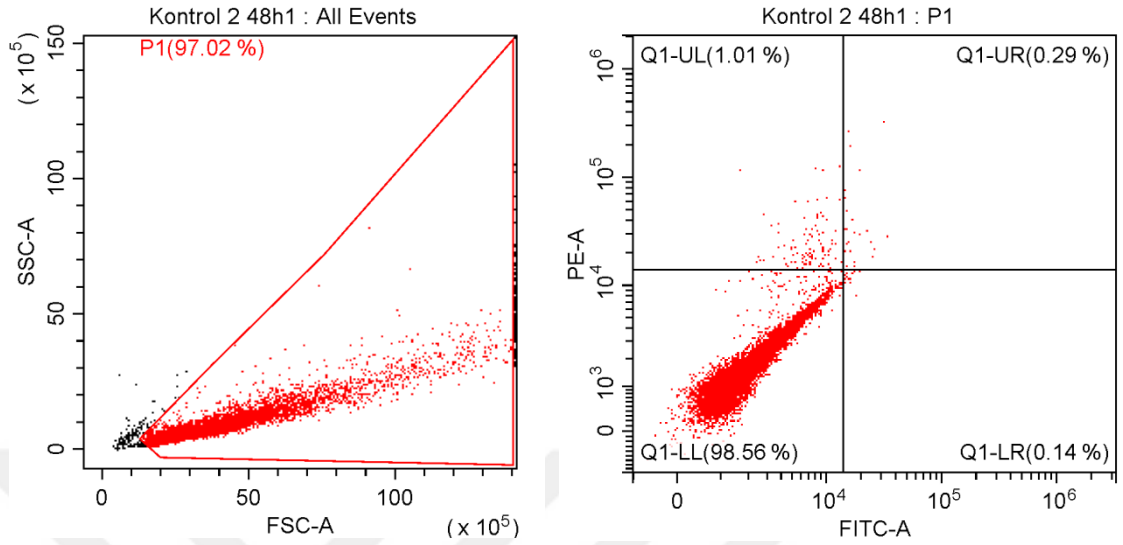
(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)



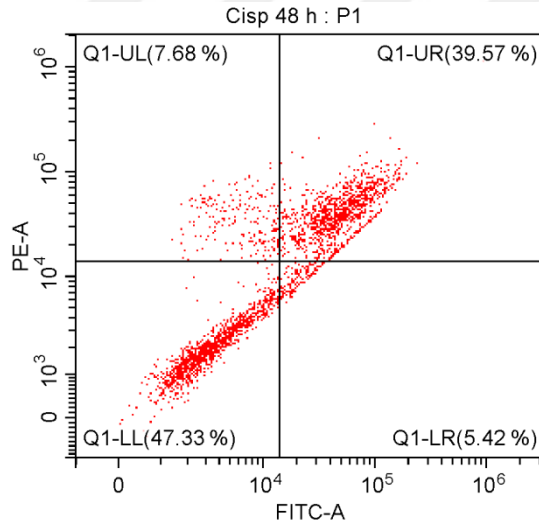
Şekil 4.8. Vicenin-2 A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, A) $IC_{50/2}$ B) IC_{50} C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının poptotik etkiler.

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)

4.3.1.2. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi

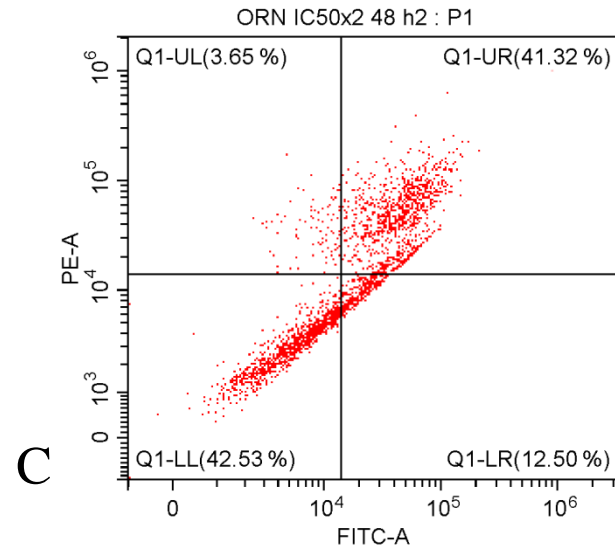
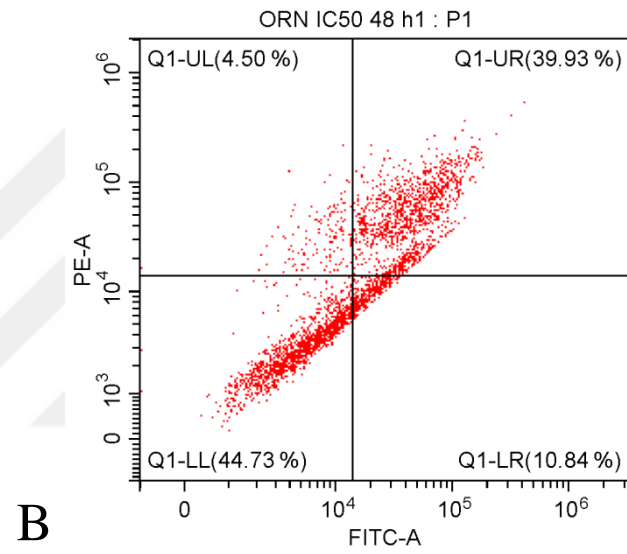
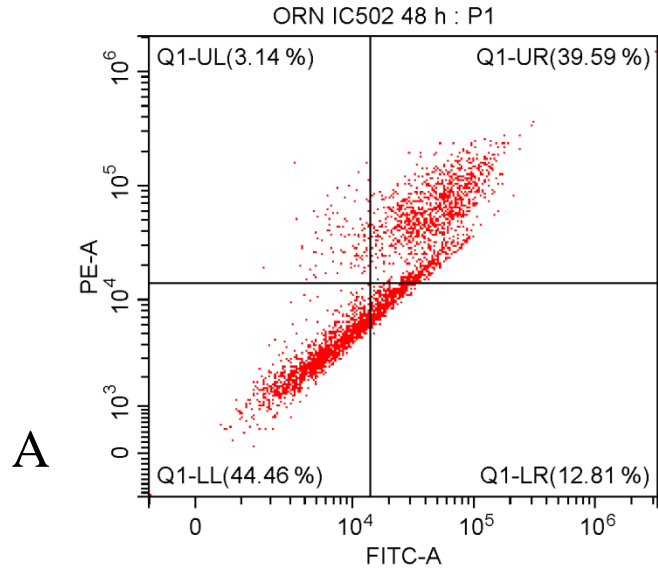


Şekil 4.9. A549 Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol.



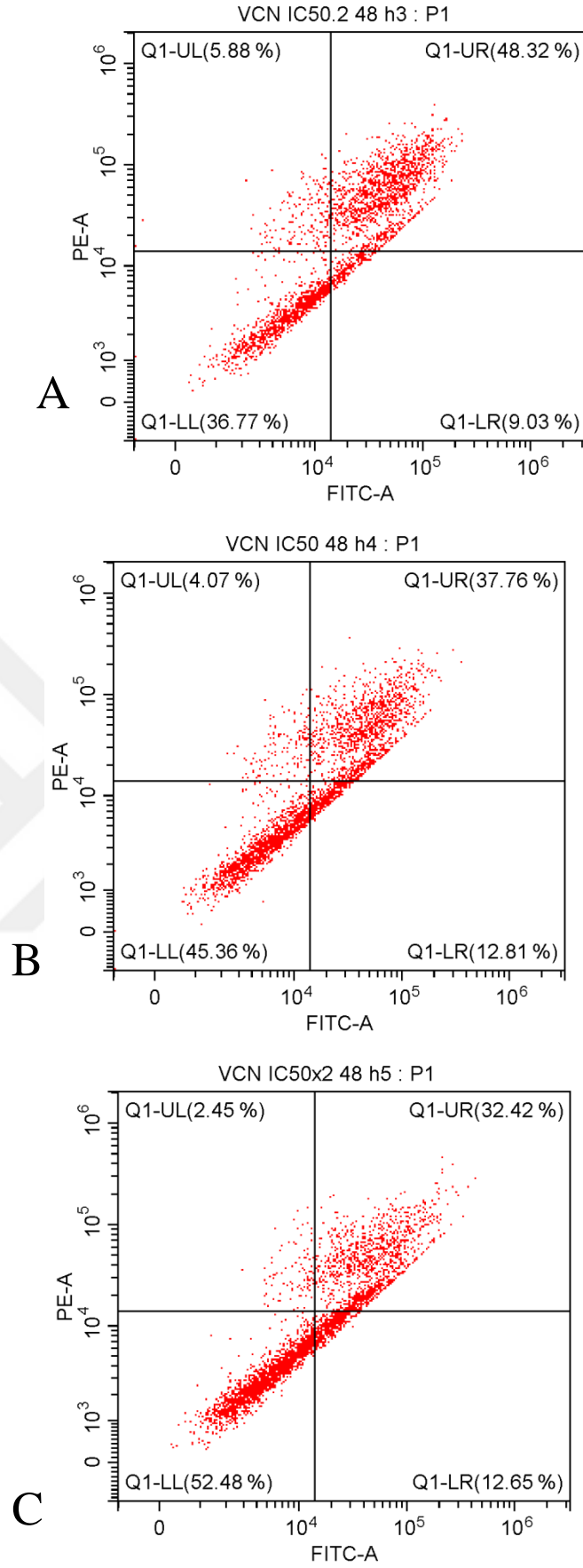
Şekil 4.10. Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki IC₅₀ konsantrasyonunun apoptotik etkiler .

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)



Şekil 4.11. *Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, A) IC_{50/2} B) IC₅₀ C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının apoptotik etkiler*

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)



Şekil 4.12. Vicenin-2'n A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, A) $IC_{50/2}$ B) IC_{50} C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının apoptotik etkiler.
(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)

Tablo 4.6. A549 hücre hatlarının 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)

24.Saat	LL	UL	UR	LR
K	99.58	0.04	0.36	0.02

Tablo 4.7. Sisplatinin A549 hücre hatlarının üzerindeki 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)

24.Saat	LL	UL	UR	LR
SisplatinIC ₅₀	32.86	16.01	38.85	12.29

Tablo 4.8. Orientin A549 hücre hatlarının üzerindeki 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)

24.Saat	LL	UL	UR	LR
Orientin IC _{50/2}	67.38	4.69	12.34	13.90
Orientin IC₅₀	56.61	2.85	24.51	16.04
Orientin IC _{50*2}	51.82	3.48	17.21	27.5

Tablo 4.9. Vicenin-2 A549 hücre hatlarının üzerindeki 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin.

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)

24.Saat	LL	UL	UR	LR
Vicenin-2	63.07	3.82	11.12	21.98
IC _{50/2}				
Vicenin-2	64.63	4.62	10.05	20.7
IC ₅₀				
Vicenin-2	65.06	3.39	9.36	22.2
IC _{50*2}				

Tablo 4.10. A549 hücre hatlarının 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)

24.Saat	LL	UL	UR	LR
K	98.56	1.01	0.29	0.14

Tablo 4.11. Sisplatinin A549 hücre hatlarının üzerindeki 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)

24.Saat	LL	UL	UR	LR
Sisplatin IC ₅₀	47.33	7.68	39.7	5.42

Tablo 4.12. *Orientin A549 hücre hatlarının üzerindeki 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.*

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)

24.Saat	LL	UL	UR	LR
Orientin	44.46	3.14	39.59	12.81
IC_{50/2}				
Orientin IC₅₀	44.73	4.50	39.93	10.84
Orientin	42.55	3.65	41.32	12.50
IC_{50*2}				

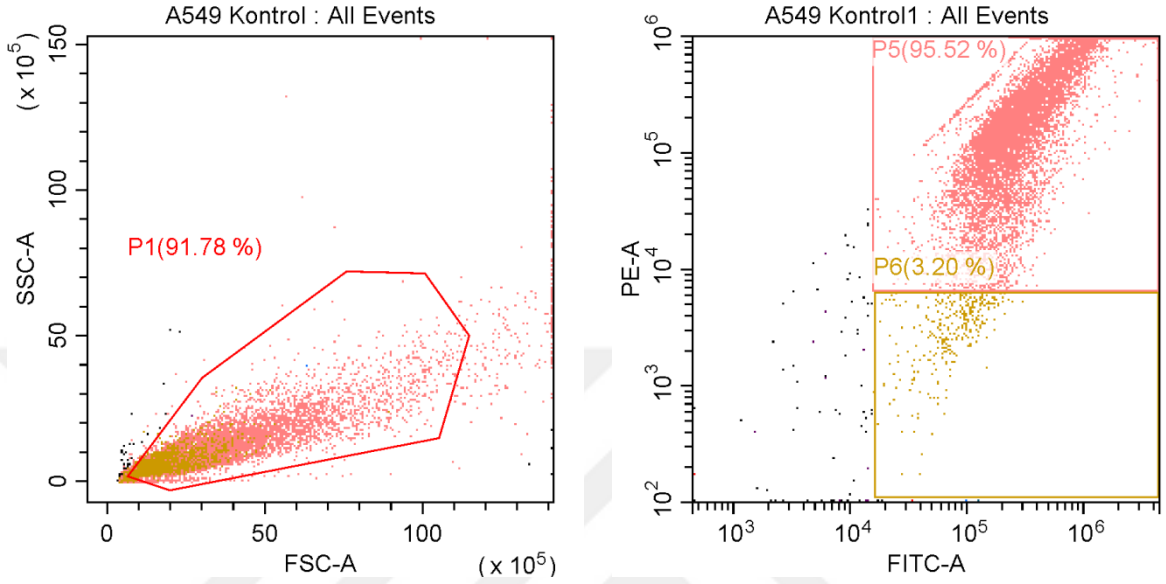
Tablo 4.13. *Vicenin-2 A549 hücre hatlarının üzerindeki 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin. V FITC.*

(LL = Canlılık UL= Nekroz UR=Geç apoptoz LR=Erken apoptoz)

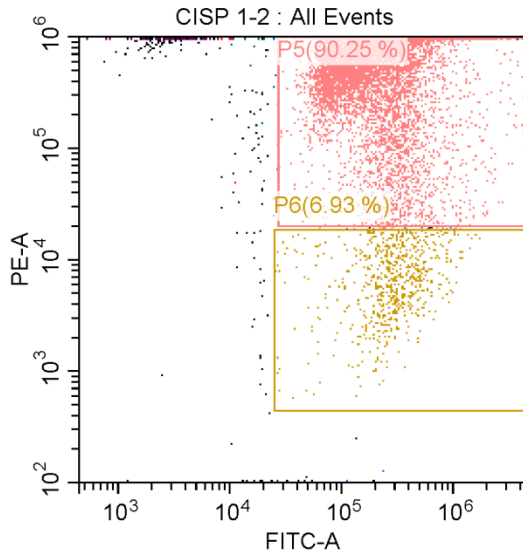
24.Saat	LL	UL	UR	LR
Vicenin-2	48.32	5.88	48.32	9.03
IC_{50/2}				
Vicenin-2	45.36	4.07	37.67	12.81
IC₅₀				
Vicenin-2	52.48	2.45	32.42	12.65
IC_{50*2}				

4.3.2. Akım sitometrisinde JC-1 analizi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

4.3.2.1. A549 hücre hattı üzerinde Sisplatin, Orientin ve Vicenin-2 uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi

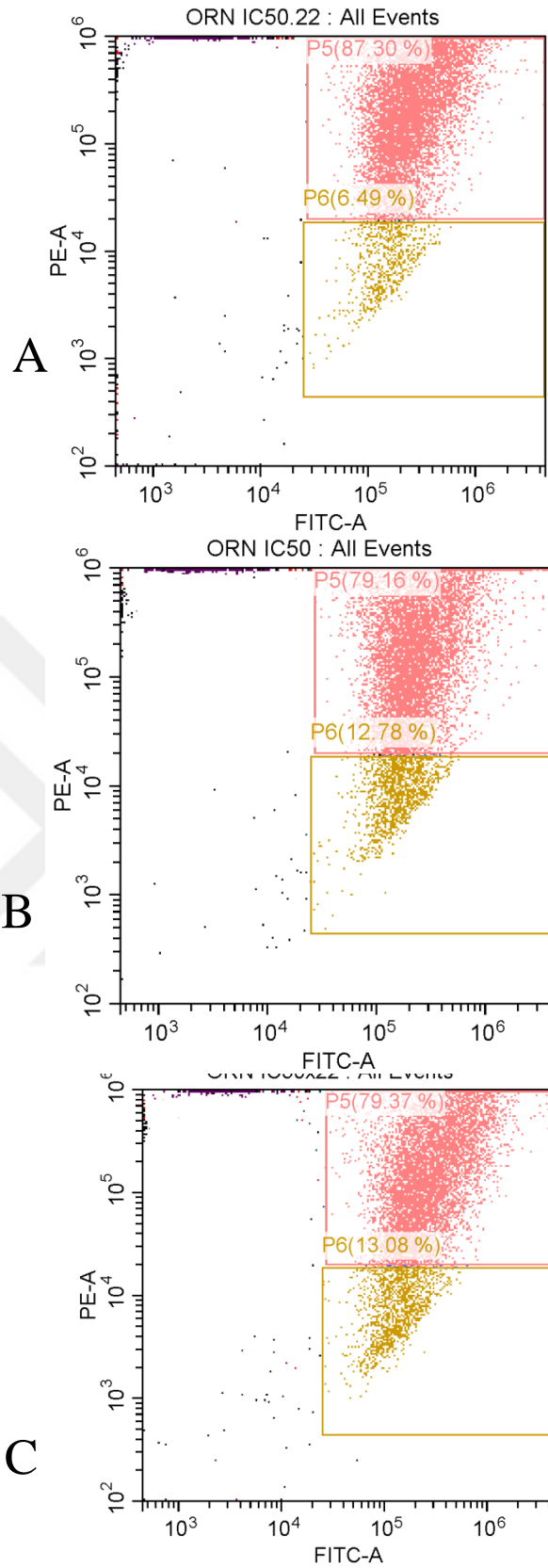


Şekil 4.13. Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve control.

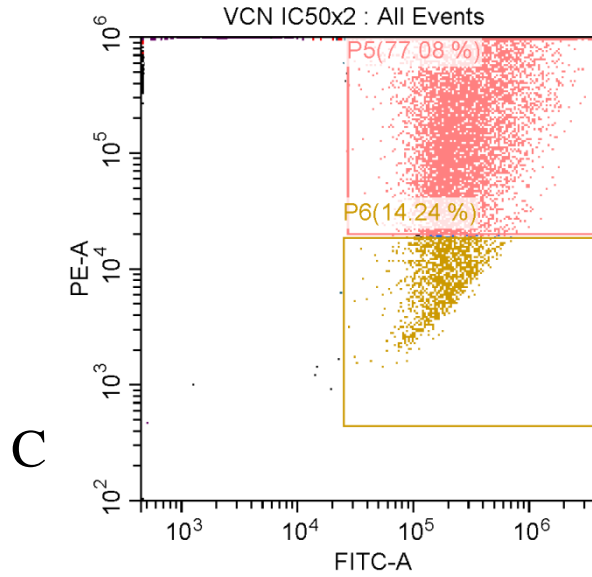
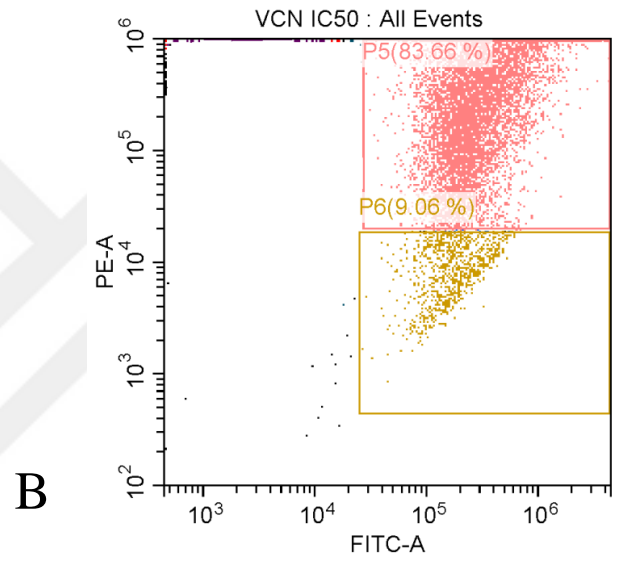
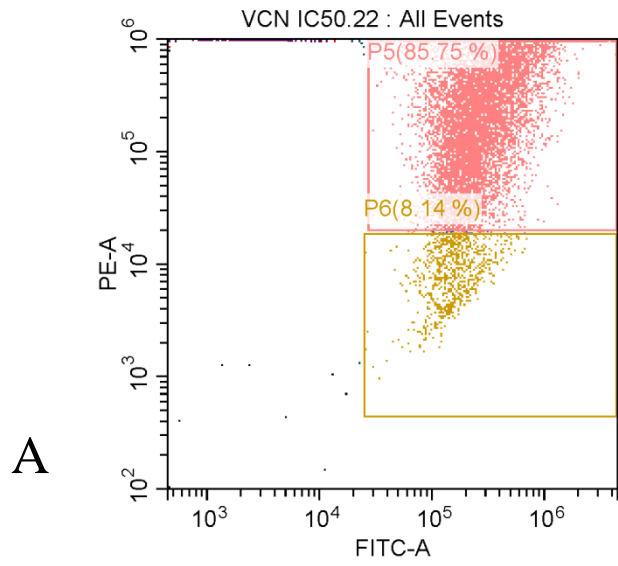


Şekil 4.14. Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki IC₅₀ konsantrasyonunun mitokondriyal membran aktiviteleri .

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

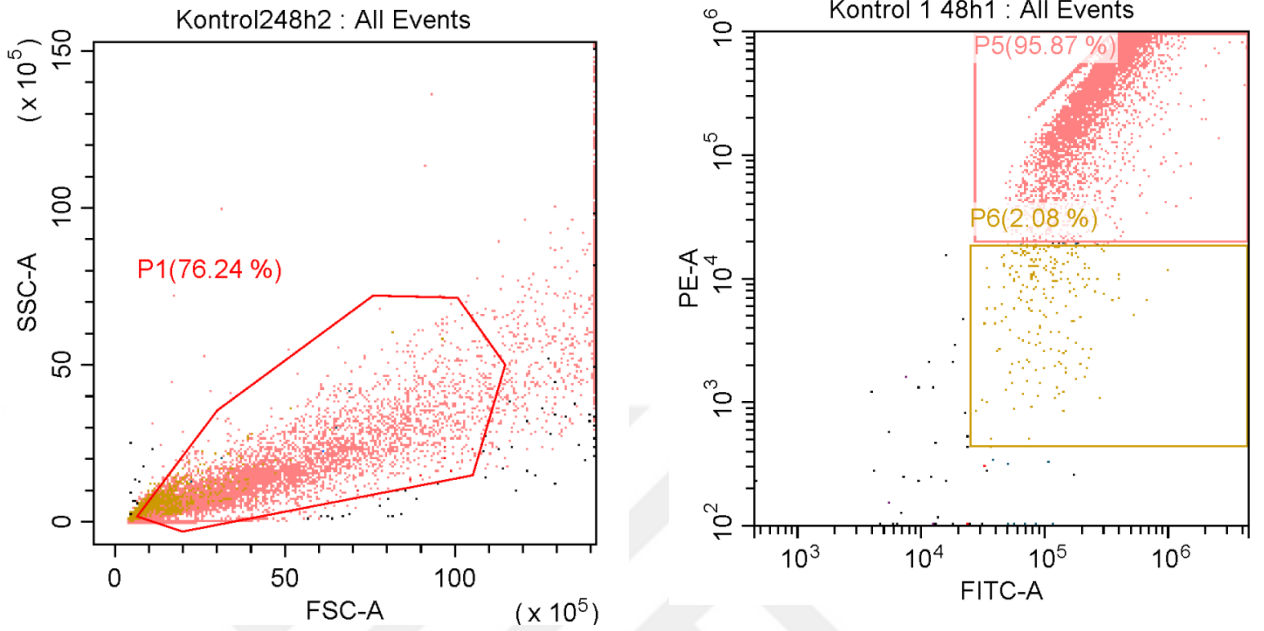


Şekil 4.15. *Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, A) IC_{50/2} B) IC₅₀ C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri (P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)*

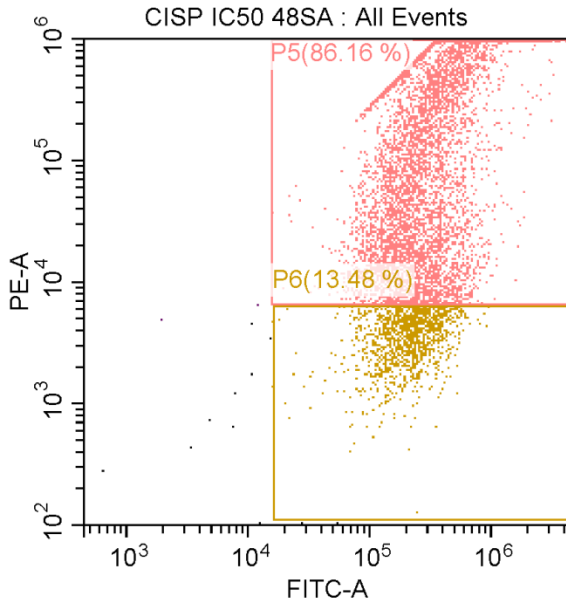


Şekil 4.16. Vicenin-2in A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, A) IC50/2 B) IC50 C) IC50*2 konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri . (P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

4.3.2.2. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin, orientin ve vicenin-2 uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi

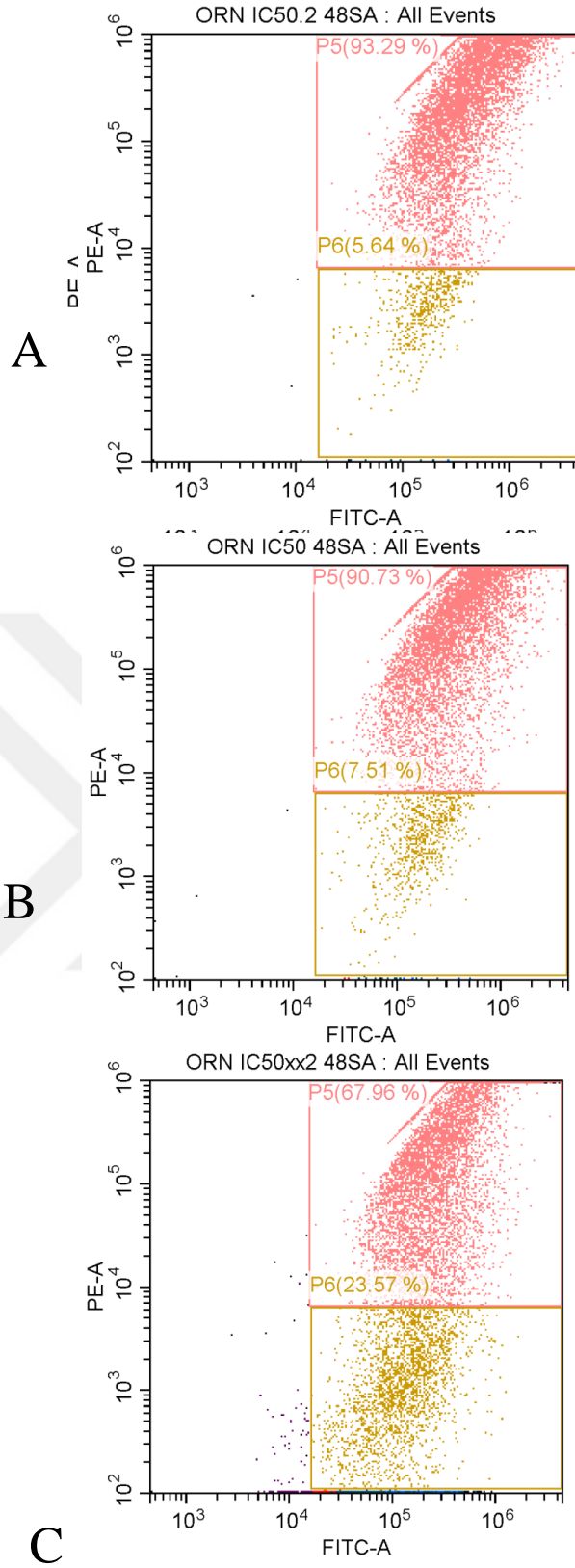


Şekil 4.17. Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol .

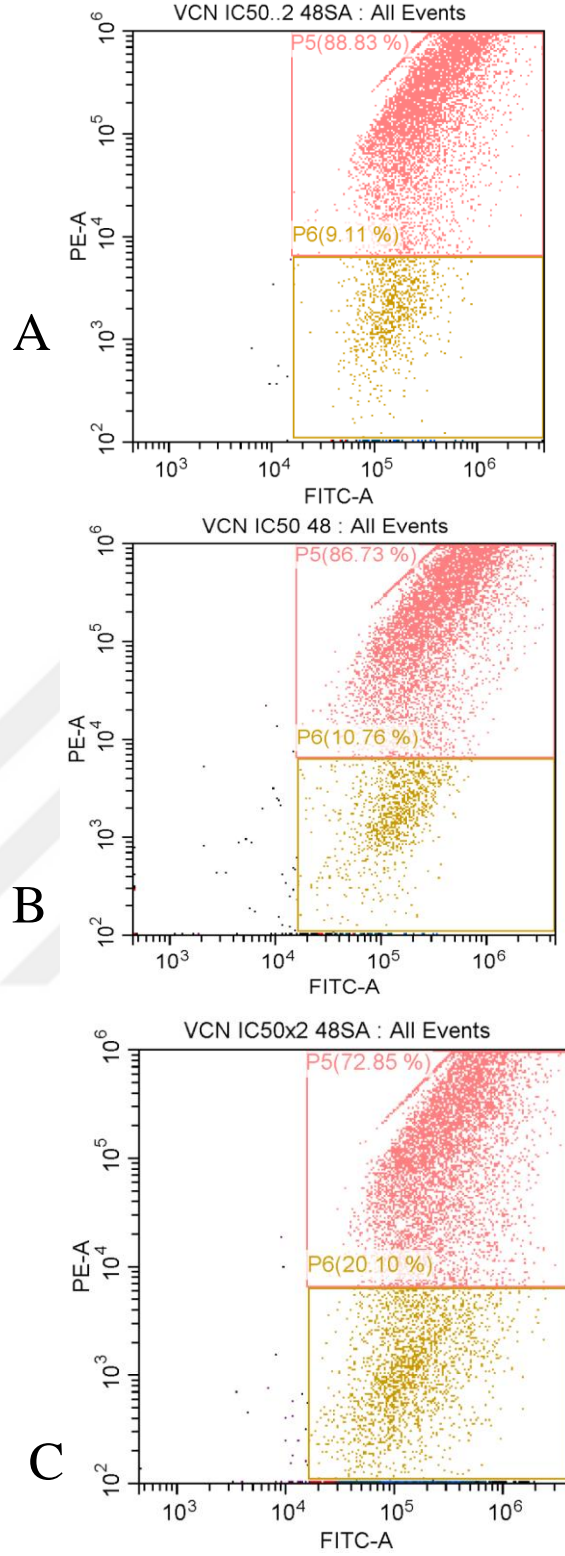


Şekil 4.18. Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki IC₅₀ konsantrasyonun mitokondriyal membran aktiviteleri

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



Şekil 4.18. Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, A) $IC_{50/2}$ B) IC_{50} C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının mitokondriyal aktiviteleri . (P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



Şekil 4.20. Vicenin-2 A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, A) $IC_{50/2}$ B) IC_{50} C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

Tablo 4.14. A549 hücre hatlarının 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri.

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

	P5	P6
K	84.99	13.65

Tablo 4.15. Sisplatin A549 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri.

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

24. Saat	P5	P6
Sisplatin IC₅₀	76.67	22.36

Tablo 4.16. Orientin A549 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası %

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

	P5	P6
Orientin IC_{50/2}	87.3	6.49
Orientin IC₅₀	79.16	12.78
Orientin IC_{50*2}	79.37	13.08

Tablo 4.17. *Vicenin-2 A549 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası %*

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

	P5	P6
Vicenin-2 IC_{50/2}	85.75	8.14
Vicenin-2 IC₅₀	83.66	9.06
Vicenin-2 IC_{50*2}	77.08	14.24

Tablo 4.18. *A549 hücre hatlarının 48. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri*

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

	P5	P6
K	95.87	2.08

Tablo 4.19. *Sisplatin A549 hücre hatları üzerindeki 48. Saat analizi sonrası %*

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

	P5	P6
Sisplatin IC₅₀	86.16	13.48

Tablo 4.20. *Orientin A549 hücre hatları üzerindeki 48. Saat analizi sonrası %*

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

	P5	P6
Orientin IC_{50/2}	93.29	5.64
Orientin IC₅₀	90.73	7.51
Orientin IC_{50*2}	67.96	23.57

Tablo 4.21. *Vicenin-2 A549 hücre hatları üzerindeki 48. Saat analizi sonrası %*

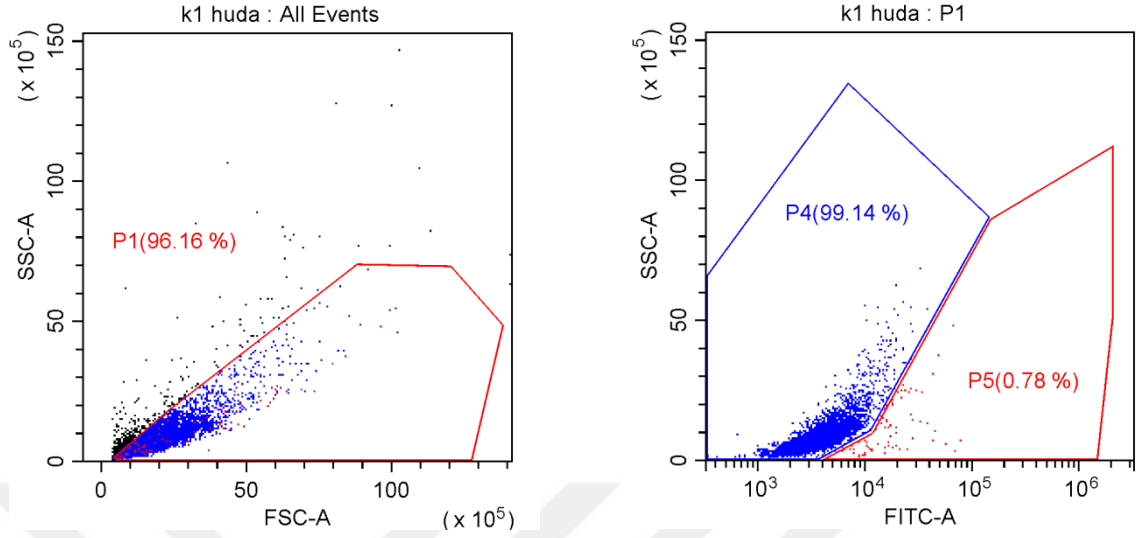
mitokondriyal aktivite değerleri

(P5= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P6= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

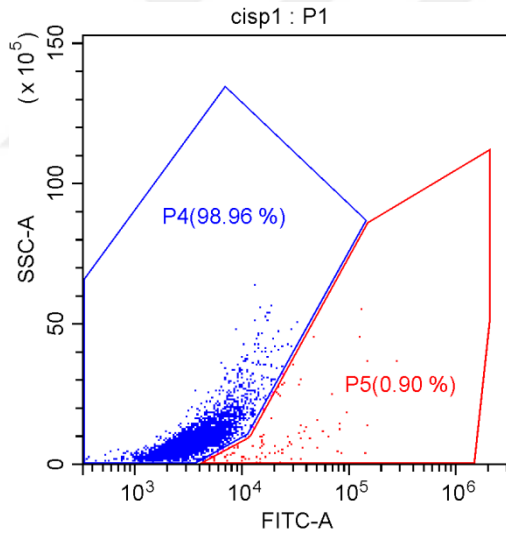
	P5	P6
Vicenin-2 IC_{50/2}	88.83	9.11
Vicenin-2 IC₅₀	86.73	10.76
Vicenin-2 IC_{50*2}	72.85	20.10

4.3.3. Akım sitometrisinde kaspaz-3 analizi ile kaspaz aktivitesinin belirlenmesi

4.3.3.1. A549 hücre hatları üzerinde 24. saatte kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi

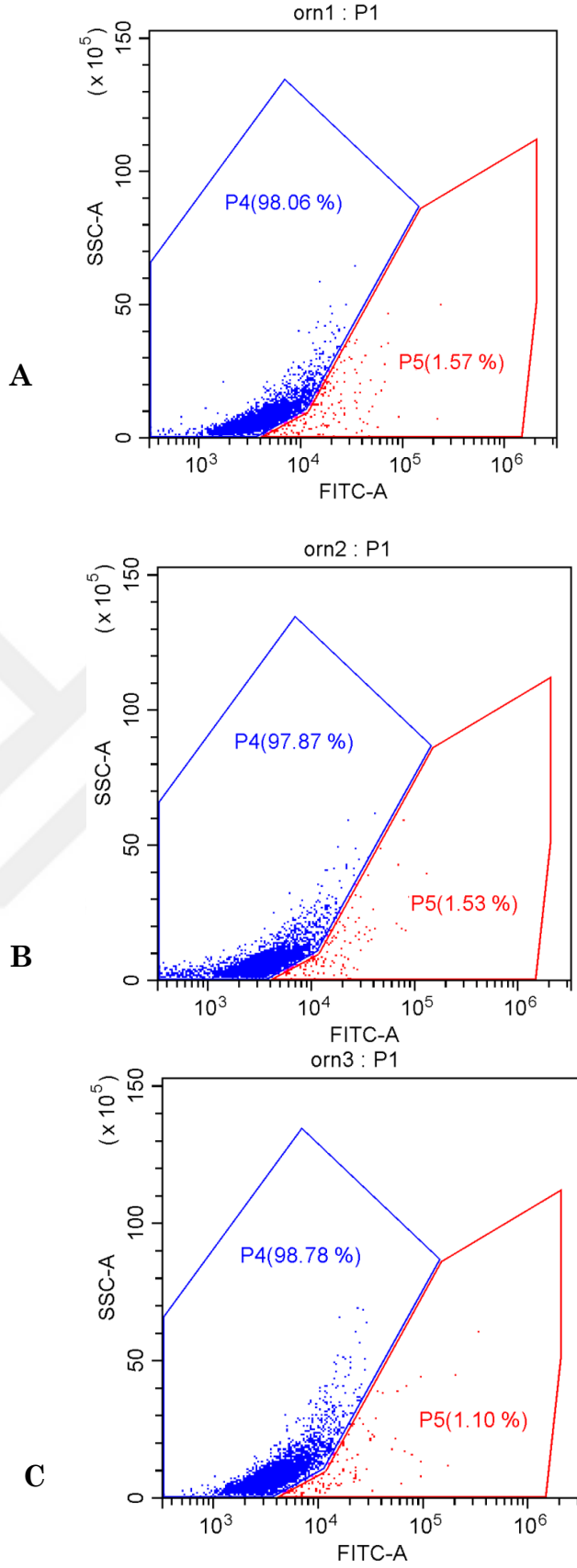


Şekil 4.21. Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol.



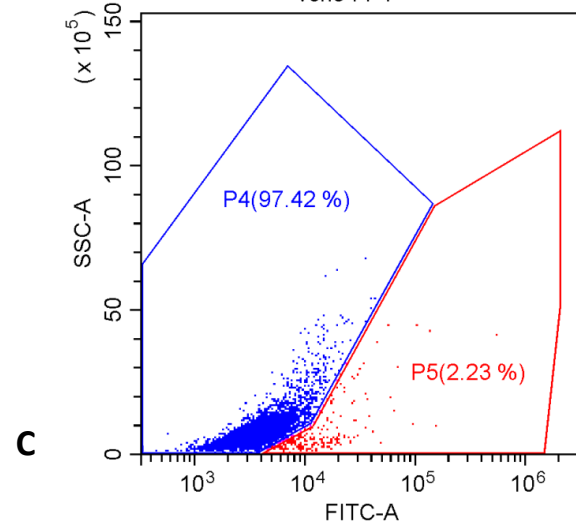
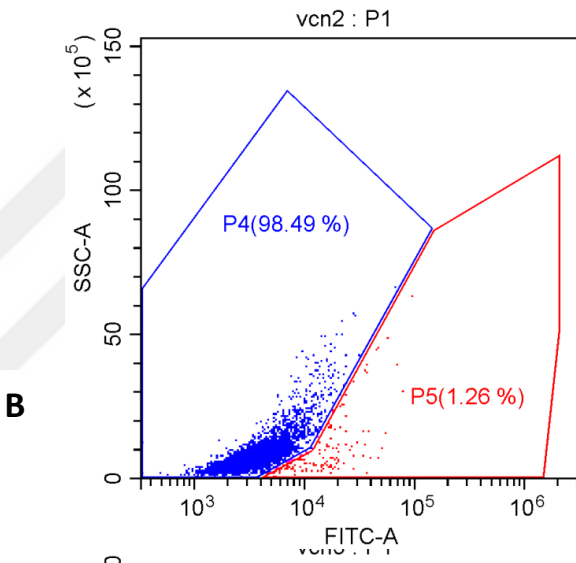
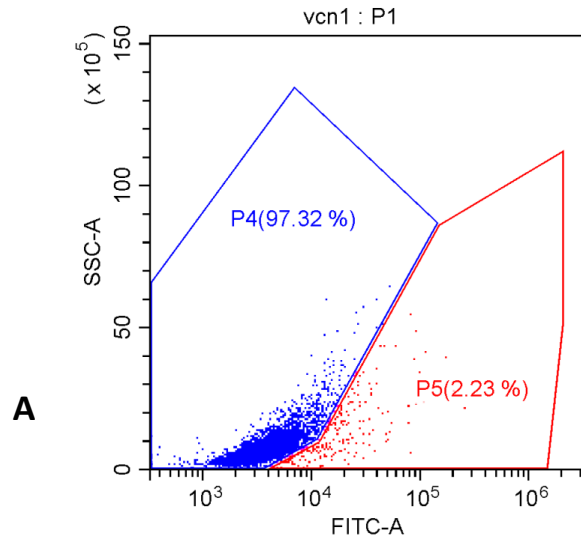
Şekil 4.22. Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki kaspaz-3 aktiviteleri

(**P4**= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, **P5**= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)



Şekil 4.23 .Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki A) IC_{50/2} B) IC₅₀ C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının kaspaz-3 aktiviteleri .

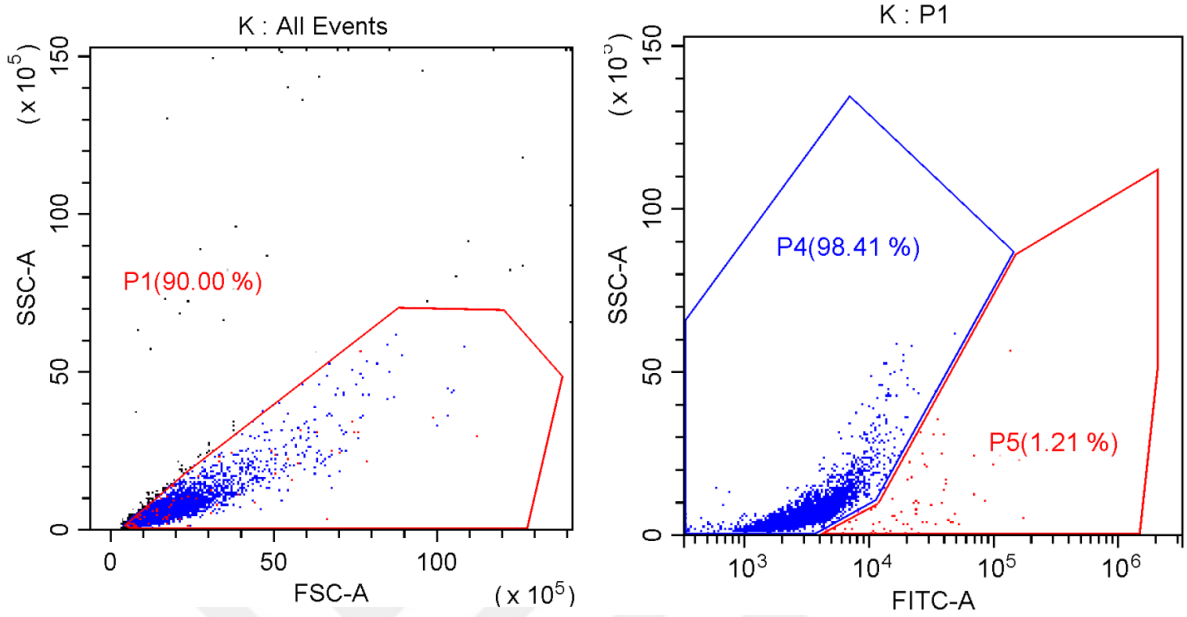
(**P4**= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, **P5**= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)



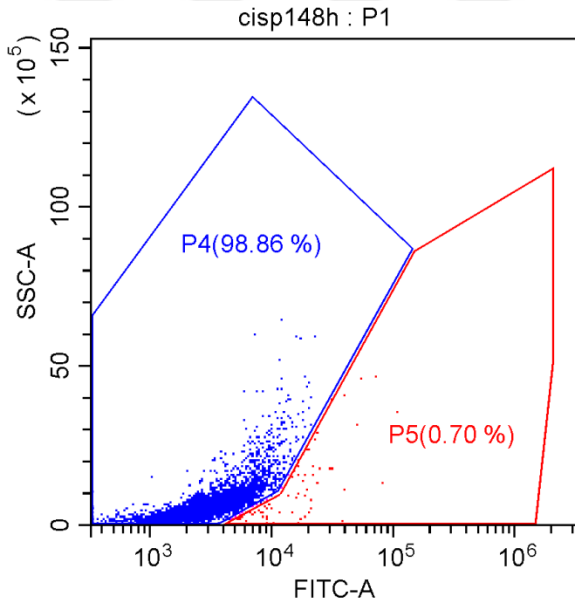
Şekil 4.24. Vicenin-2in A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki A) $IC_{50/2}$ B) IC_{50} C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının kaspaz-3 aktiviteleri.

(**P4**= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, **P5**= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)

4.3.3.2. A549 hücre hatları üzerinde 48. Saatte kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi

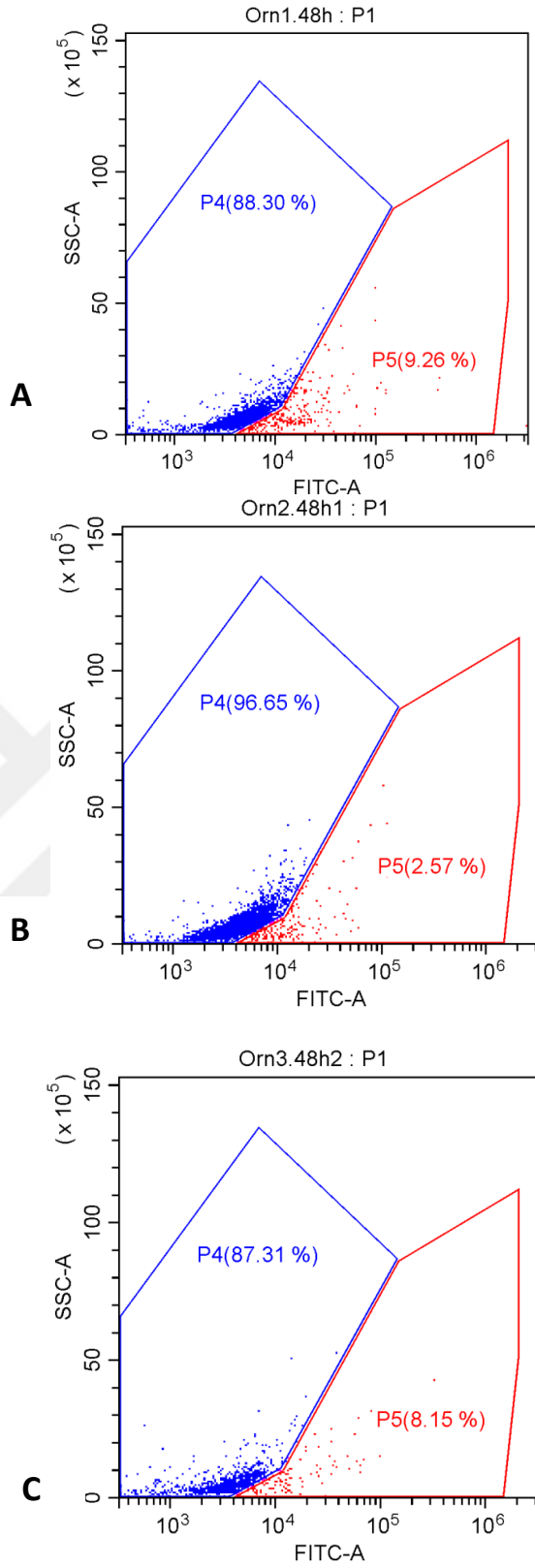


Şekil 4.25. Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol



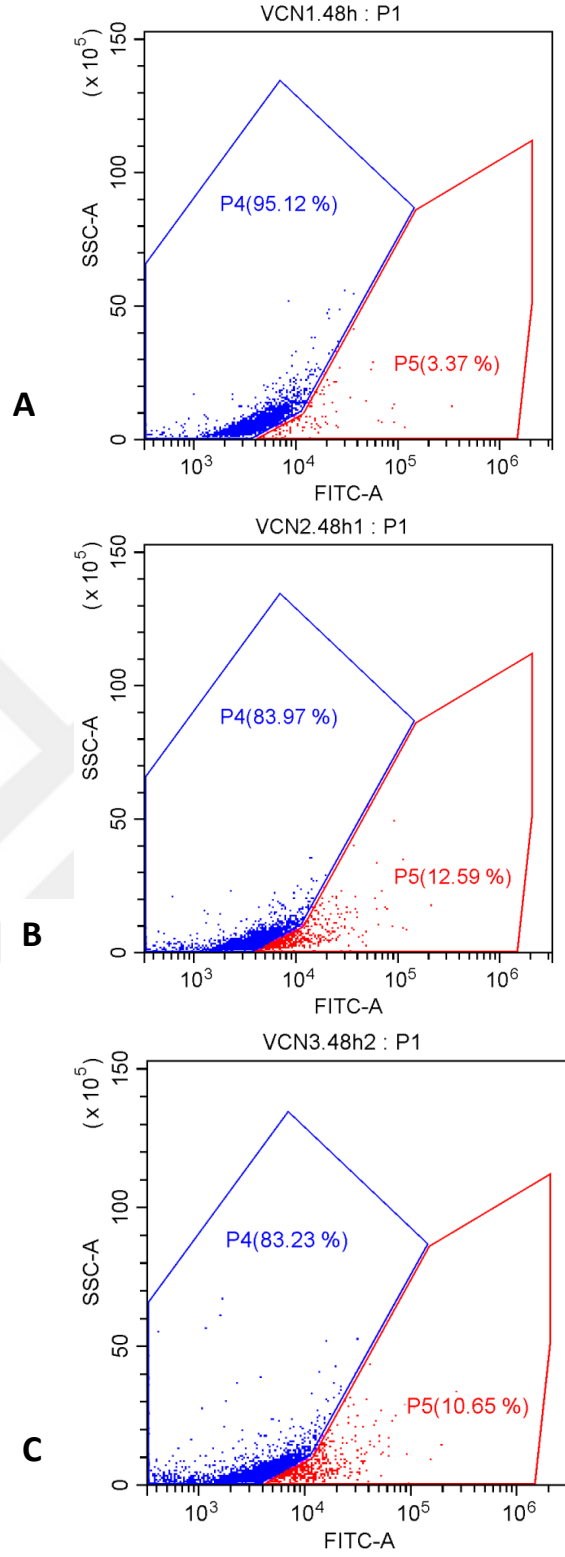
Şekil 4.26 .Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki IC_{50} konsantrasyonun kaspaz-3 aktiviteleri

(P4= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, P5= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)



Şekil 4.27. Orientinin A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki A) $IC_{50/2}$ B) IC_{50} C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının kaspaz-3 aktiviteleri

(P4= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, P5= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)



Şekil 4.28. Vicenin-2in A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki A) $IC_{50/2}$ B) IC_{50} C) IC_{50*2} konsantrasyonlarının kaspaz-3 aktiviteleri (P4= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, P5= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)

Tablo 4.22. A549 hücre hattındaki (kontrol) kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.

(**P5**= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, **P6**= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)

	P4	P5
K	99.14	0.78

Tabli 4.23. Sisplatin A549 hücre hattındaki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.

(**P5**= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, **P6**= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)

24. Saat	P4	P6
Sisplatin IC₅₀	99.82	0.84

Tablo 4.24. Orientin A549 hücre hattındaki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.

(**P5**= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, **P6**= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)

24. Saat	P4	P5
Orientin IC_{50/2}	98.06	1.57
Orientin IC₅₀	97.87	1.53
Orientin IC_{50*2}	98.78	1.10

Tablo 4.25. *Vicenin-2 A549 hücre hattındaki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonlar (P2= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, P4= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)*

24. Saat	P4	P5
Vicenin-2 IC_{50/2}	97.32	2.23
Vicenin-2 IC₅₀	98.97	12.59
Vicenin-2 IC_{50*2}	97.42	2.23

Tablo 4.26. *A549 hücre hattındaki (kontrol) kaspaz-3 48. Saatteki % aktivasyonları*

(P2= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, P4= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)

	P4	P5
K	98.40	1.21

Tablo 4.27. *Sisplatin A549 hücre hattındaki kaspaz-3 48. Saatteki % aktivasyonları*

(P2= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, P4= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)

24. Saat	P4	P5
Sisplatin IC₅₀	98.41	1.21

Tablo 4.28. *Orientin A549 hücre hattındaki kaspaz-3 48. Saatteki % aktivasyonları*

(P2= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, P4= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)

24. Saat	P4	P5
Orientin IC_{50/2}	88.3	9.26
Orientin IC₅₀	96.65	2.75
Orientin IC_{50*2}	87.31	8.15

Tablo 4.29. *Vicenin-2 A549 hücre hattındaki kaspaz-3 48. Saatteki % aktivasyonlar*

(P2= Negatif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık, P4= Pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren canlılık)

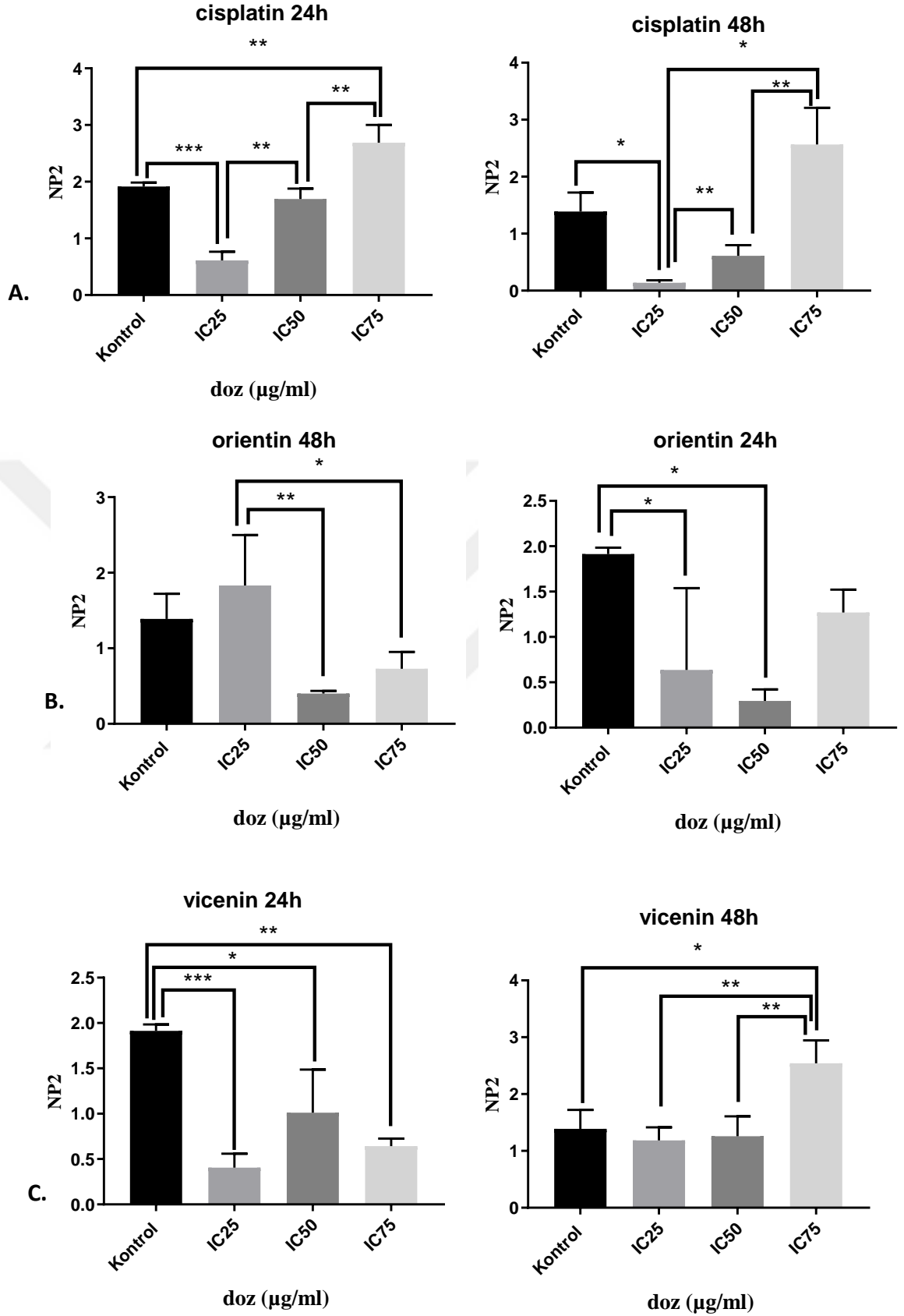
24. Saat	P4	P5
Vicenin-2 IC_{50/2}	95.12	3.37
Vicenin-2 IC₅₀	83.97	12.59
Vicenin-2 IC_{50*2}	83.23	10.65

4.4. Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi

4.4.1. ELISA ile İnsan Nörofilini-2'nin kantitatif tespiti

Tablo 4.30. A549 hücrelerinde Neurophillin-2'nin ELISA analizinin istatistiksel analizi

NP2	GRUPLAR	Median	%25	%75	P	Çoklu Karşılaştırmalar
NP-2 IC _{50/2} 24 S	1 Kontrol	1,92	1,88	1,95	0,066	Ns
	2 Orientin	0,13	0,11	0,90		
	3 Vicenin-2	0,44	0,34	0,49		
	4 Cisp	0,64	0,54	0,69		
NP-2 IC ₅₀ 24 S	1 Kontrol	1,92	1,88	1,95	0,023	1-2
	2 Orientin	0,22	0,22	0,33		
	3 Vicenin-2	0,76	0,74	1,16		
	4 Cisp	1,64	1,59	1,77		
NP-2 IC _{50*2} 24 S	1 Kontrol	1,92	1,88	1,95	0,016	3-4
	2 Orientin	1,39	1,18	1,42		
	3 Vicenin-2	0,69	0,62	0,69		
	4 Cisp	2,80	2,57	2,86		
NP-2 IC _{50/2} 48 S	1 Kontrol	1,37	1,22	1,55	0,057	Ns
	2 Orientin	1,63	1,46	2,10		
	3 Vicenin-2	1,20	1,08	1,31		
	4 Cisp	0,13	0,12	0,16		
NP-2 IC ₅₀ 48 S	1 Kontrol	1,37	1,22	1,55	0,029	1-2
	2 Orientin	0,39	0,38	0,42		
	3 Vicenin-2	1,08	1,06	1,37		
	4 Cisp	0,62	0,52	0,71		
NP-2 IC _{50*2} 48 S	1 Kontrol	1,37	1,22	1,55	0,025	2-3
	2 Orientin	0,83	0,65	0,86		
	3 Vicenin-2	2,69	2,39	2,77		
	4 Cisp	2,36	2,20	2,82		

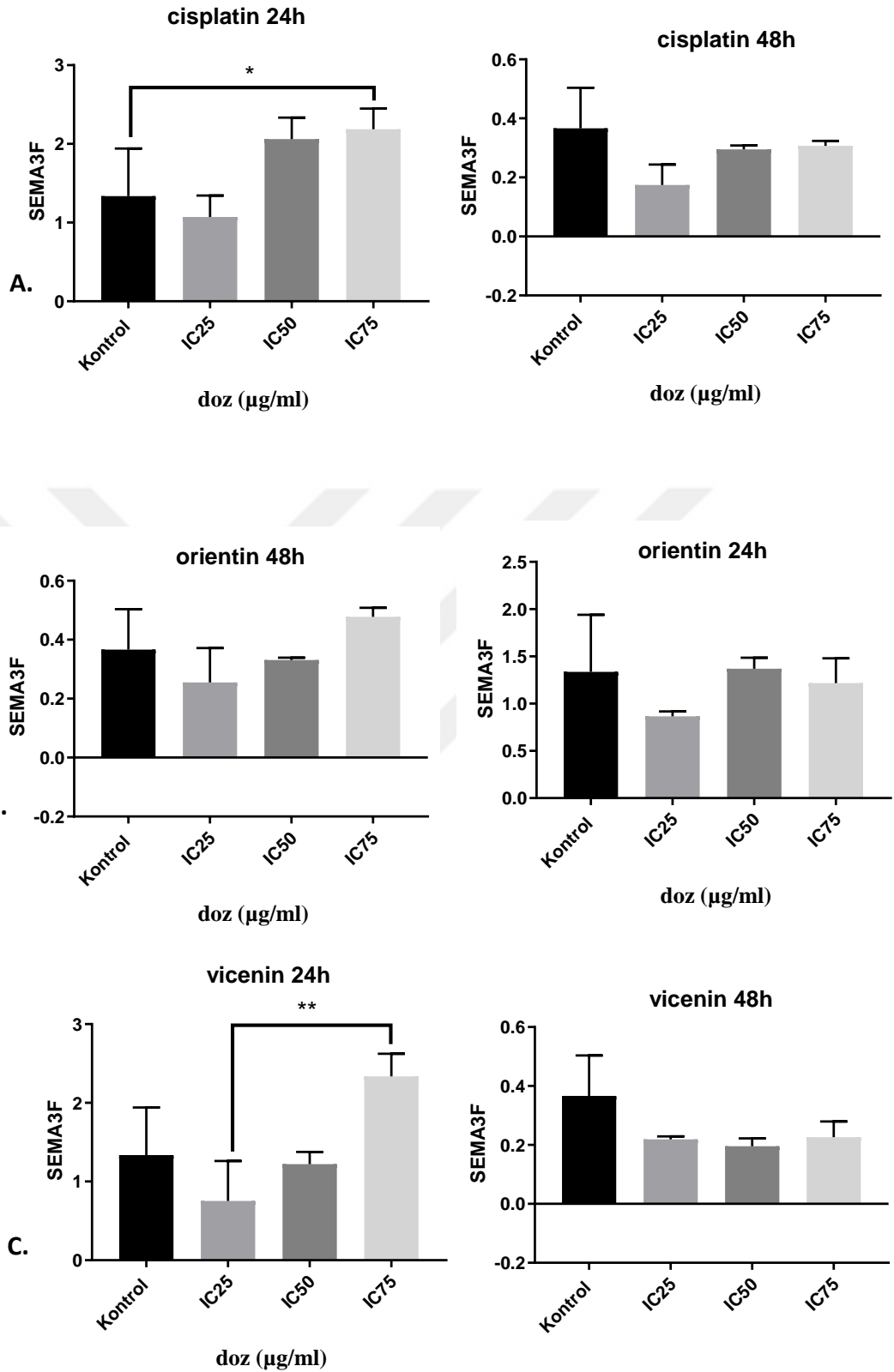


Şekil 4.29. A. Cisplatin ile muamele edilmiş hücrelerde B. Orientin ile muamele edilmiş hücrelerde C. Vicenin-2 ile muamele edilmiş hücrelerde Nörofilin-2'nin ELISA analizinin istatistiksel analizi

4.4.2. ELISA ile İnsan SEMA 3F'nin kantitatif tespiti

Tablo 4.31. A549 hücrelerinde Sema 3F'nin ELISA analizinin istatistiksel analizi

Sema 3F	GRUPLAR	Median	%25	%75	P	Çoklu Karşılaştırmalar
SEMA 3F IC_{50/2} 24 S	1 Kontrol	1,30	1,03	1,63	0,644	Ns
	2 Orientin	0,88	0,84	0,89		
	3 Vicenin-2	0,89	0,54	1,03		
	4 Cisp	0,96	0,92	1,17		
SEMA 3F IC₅₀ 24 S	1 Kontrol	1,30	1,03	1,63	0,121	Ns
	2 Orientin	1,33	1,31	1,42		
	3 Vicenin-2	1,15	1,13	1,27		
	4 Cisp	2,10	1,93	2,21		
SEMA 3F IC_{50*2} 24 S	1 Kontrol	1,30	1,03	1,63	0,053	Ns
	2 Orientin	1,21	1,08	1,35		
	3 Vicenin-2	2,25	2,17	2,45		
	4 Cisp	2,18	2,05	2,32		
SEMA 3F IC_{50/2} 48 S	1 Kontrol	0,29	0,29	0,41	0,161	Ns
	2 Orientin	0,22	0,19	0,30		
	3 Vicenin-2	0,21	0,21	0,22		
	4 Cisp	0,19	0,14	0,21		
SEMA 3F IC₅₀ 48 S	1 Kontrol	0,29	0,29	0,41	0,050	2-3
	2 Orientin	0,33	0,33	0,33		
	3 Vicenin-2	0,20	0,18	0,21		
	4 Cisp	0,30	0,29	0,30		
SEMA 3F IC_{50*2} 48 S	1 Kontrol	0,29	0,29	0,41	0,075	Ns
	2 Orientin	0,49	0,47	0,49		
	3 Vicenin-2	0,21	0,20	0,25		
	4 Cisp	0,31	0,30	0,32		

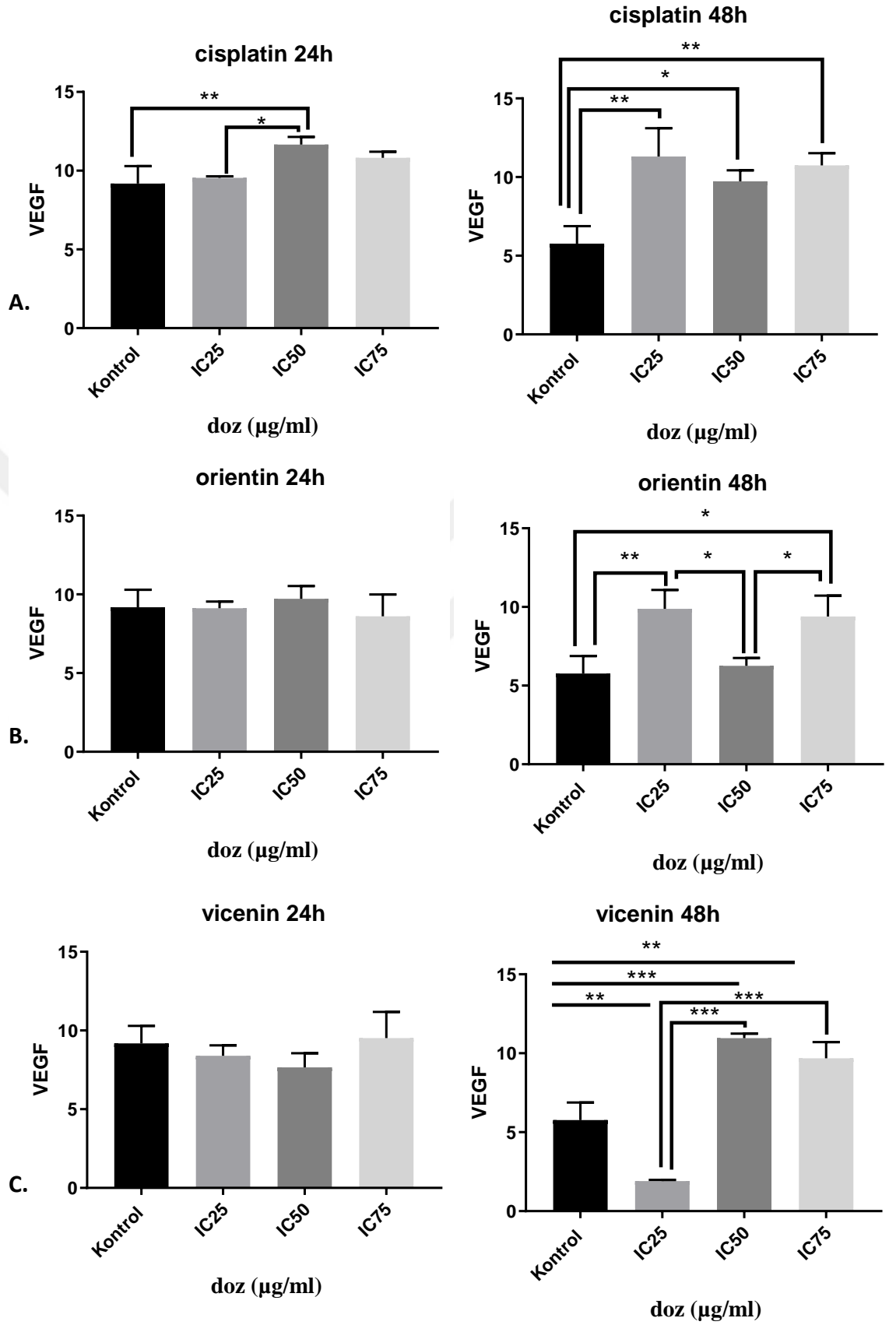


Şekil 4.30. A. Cisplatin ile muamele edilmiş hücrelerde B. Orientin ile muamele edilmiş hücrelerde C. Vicenin-2 ile muamele edilmiş hücrelerde Sema 3F'nin ELISA analizinin istatistiksel analizi

4.4.3. ELISA ile VEGF'nin kantitatif tespiti

Tablo 4.32. VEGF'in A549 hücrelerinin ELISA analizinin istatistiksel analizi

Kruskal–Wallis equality-of-populations rank test for ELISA experiment						
VEGF	GRUP	Median	%25	%75	P	Çoklu Karşılaştırmalar
VEGF IC _{50/2} 24 S	1 Kontrol	8,88	8,56	9,65	0,161	Ns
	2 Orientin	9,33	8,98	9,36		
	3 Vicenin-2	8,37	8,05	8,72		
	4 Cisp	9,52	9,49	9,59		
VEGF IC ₅₀ 24 S	1 Kontrol	8,88	8,56	9,65	0,022	3-4
	2 Orientin	9,52	9,26	10,07		
	3 Vicenin-2	8,18	7,41	8,18		
	4 Cisp	11,76	11,44	11,93		
VEGF IC _{50*2} 24 S	1 Kontrol	8,88	8,56	9,65	0,287	Ns
	2 Orientin	9,14	8,08	9,39		
	3 Vicenin-2	9,01	8,59	10,19		
	4 Cisp	10,87	10,64	11,03		
VEGF IC _{50/2} 48 S	1 Kontrol	5,87	5,23	6,35	0,022	3-4
	2 Orientin	9,33	9,20	10,29		
	3 Vicenin-2	1,86	1,86	1,93		
	4 Cisp	12,21	10,73	12,34		
VEGF IC ₅₀ 48 S	1 Kontrol	5,87	5,23	6,35	0,025	1-3
	2 Orientin	6,44	6,06	6,54		
	3 Vicenin-2	11,12	10,87	11,12		
	4 Cisp	10,03	9,49	10,13		

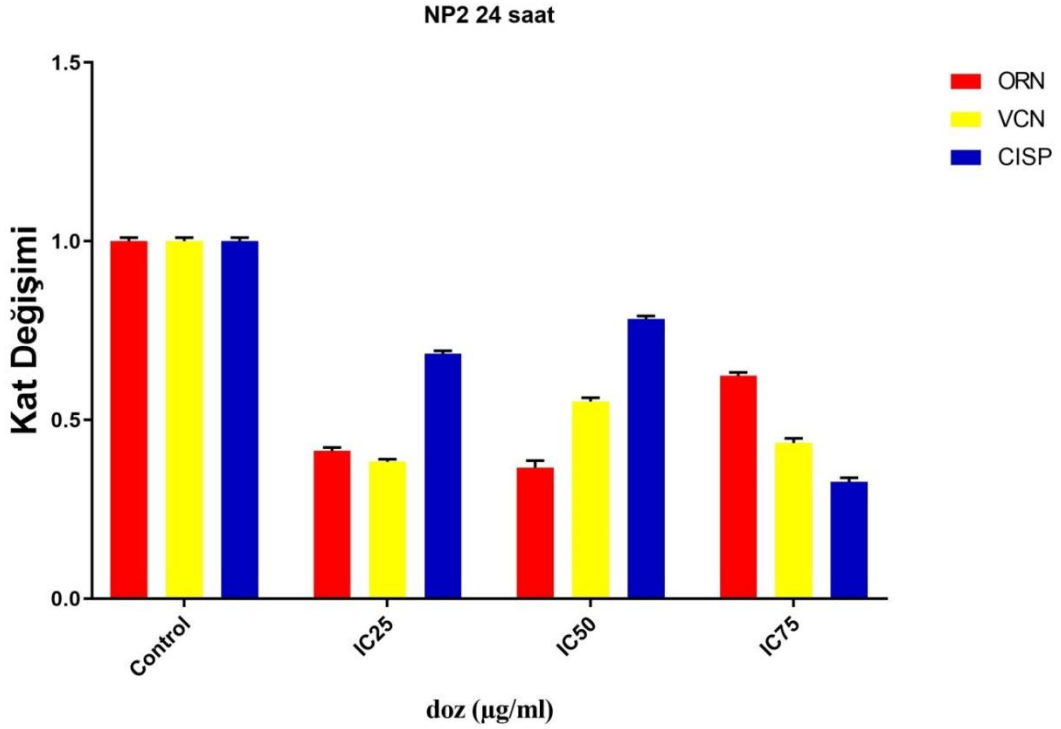


Şekil 4.31. A. Cisplatin ile muamele edilmiş hücrelerde B. Orientin ile muamele edilmiş hücrelerde C. Vicenin-2 ile muamele edilmiş hücrelerde VEGF'nin ELISA analizinin istatistiksel analizi

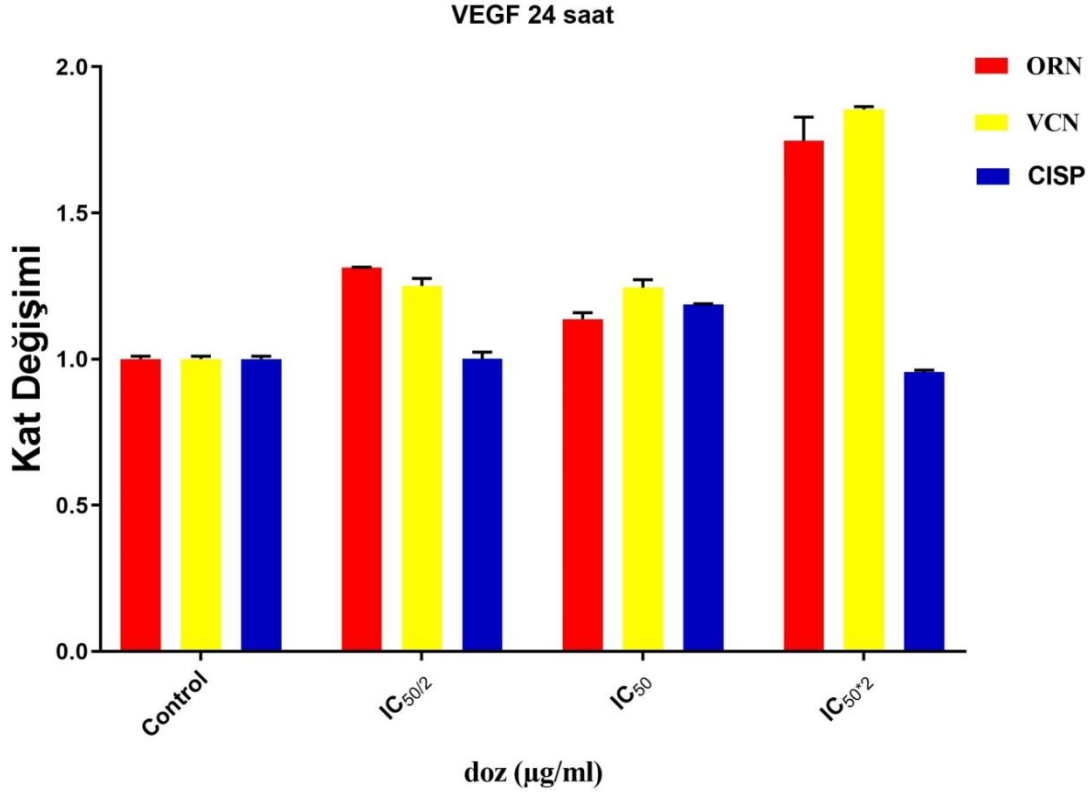
4.5 RT-PCR (Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analiz Sonuçları

A549 hücrelerinde eksprese olduğu VEGF, NP-2, SEMA 3F, Bcl-2, Bax, CYD1, ERK, pERK genlerinin ve Beta Actin house keeping geninin orientin, Vicenin-2'in ve pozitif kontrol olarak kullandığımız sisplatinin MTT deneyi sonucu bulunan $IC_{50/2}$, IC_{50} , IC_{50*2} değerleri hücreler uygulanmış ve 24, 48 saat inkübasyon süresi sonrasında RT-PCR analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda kontrol 1 olarak ifade edilmiş buna göre bileşiklerin ve sisplatinin VEGF, NP-2, SEMA 3F, Bcl-2, Bax, CYD1, ERK, pERK genlerinin ifade düzeyleri 1'in üzerinden kat değişimi olarak hesaplanmıştır. 1'in üzerindeki değerler over eksprese altındaki değerler ise down eksprese olarak belirlenmiştir.

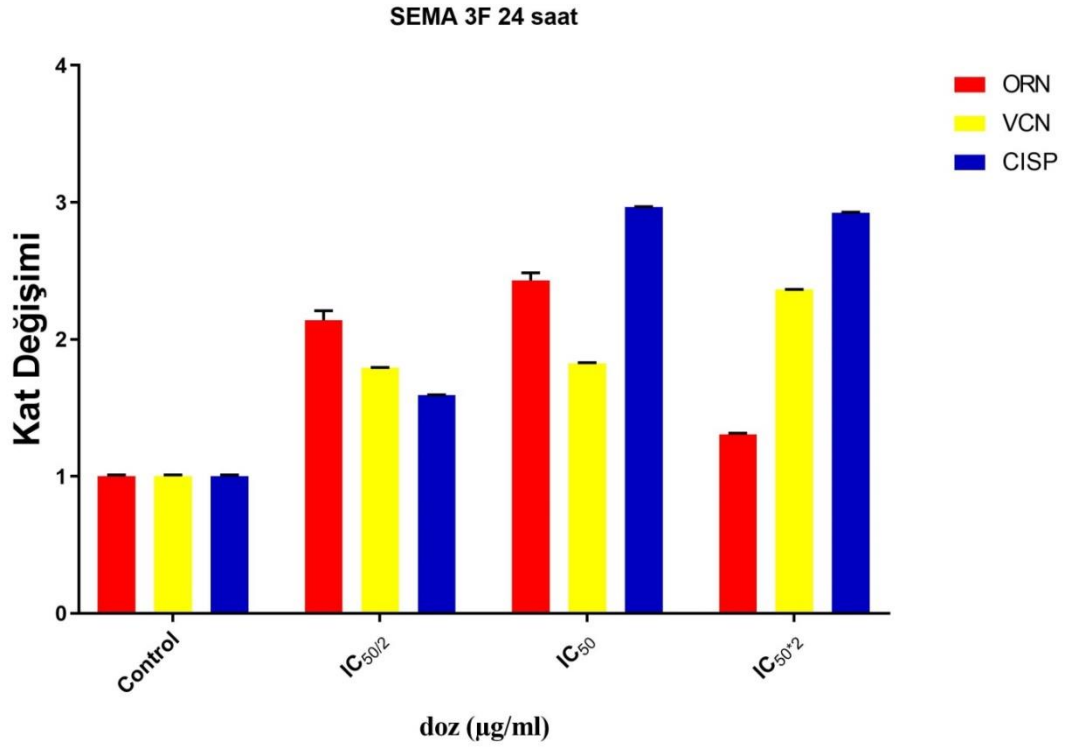
4.5.1. RT-PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) 24. Saattaki analiz sonuçları



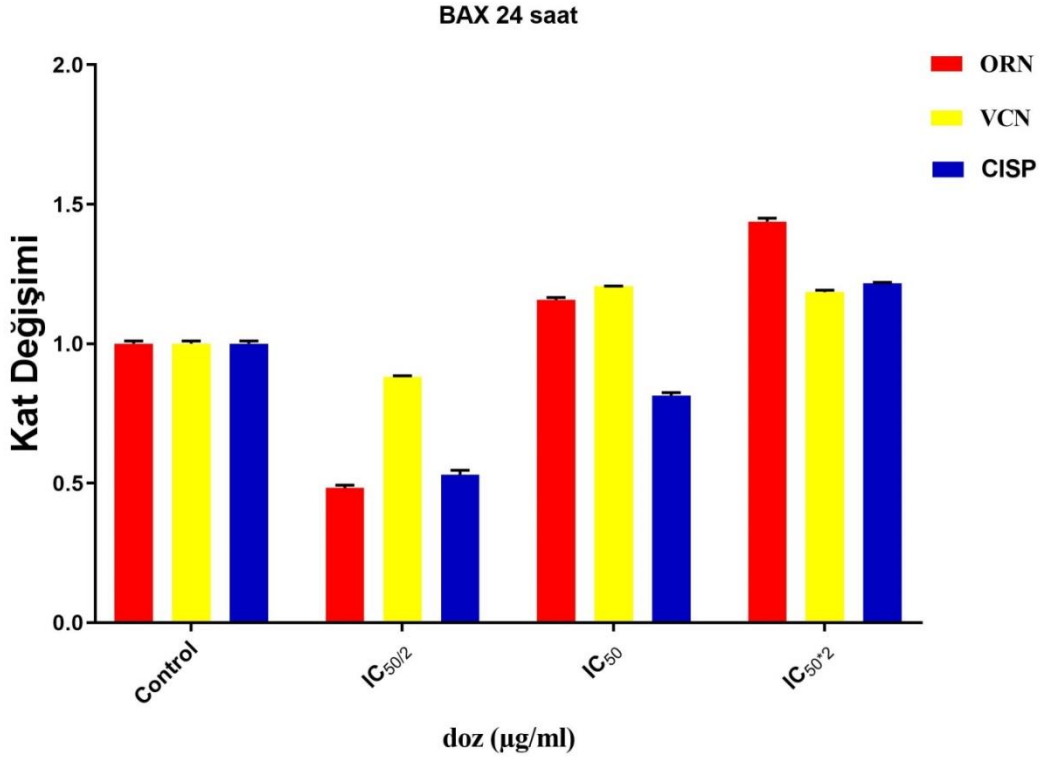
Şekil 4.32. 24 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in NP-2 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



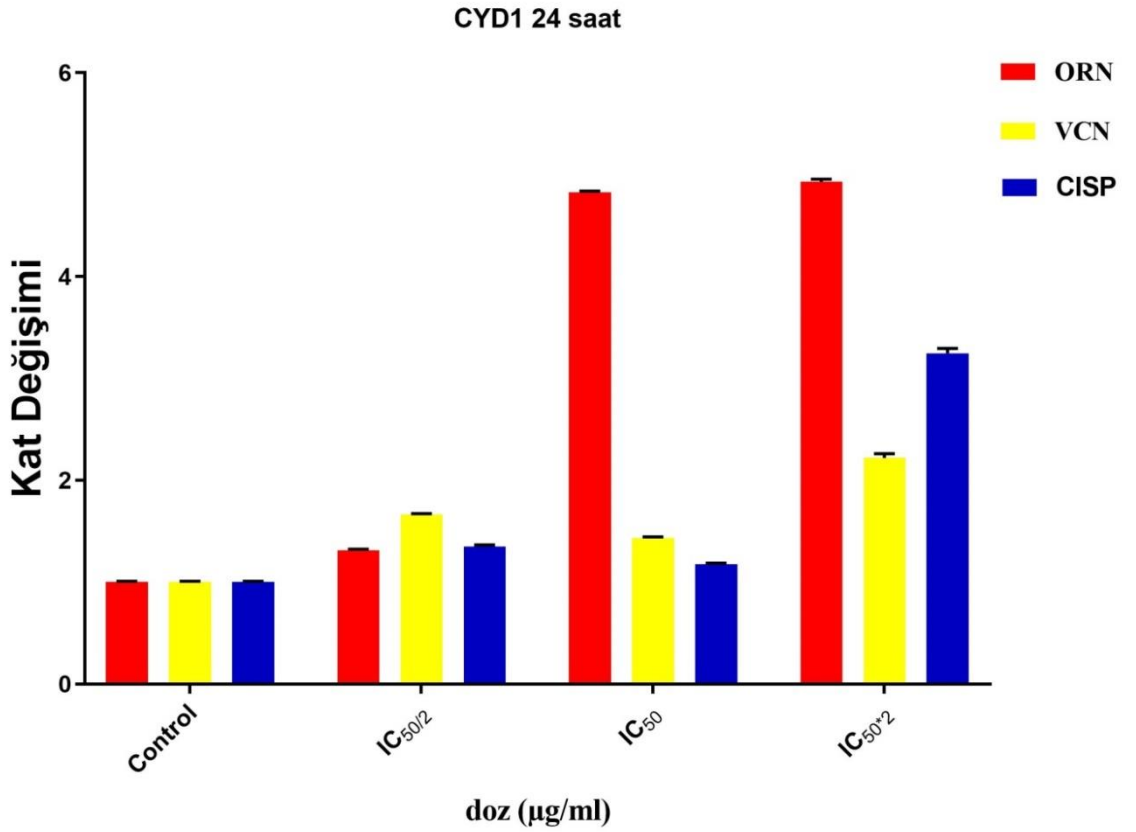
Şekil 4.33. 24 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in Bax geninin VEGF genin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



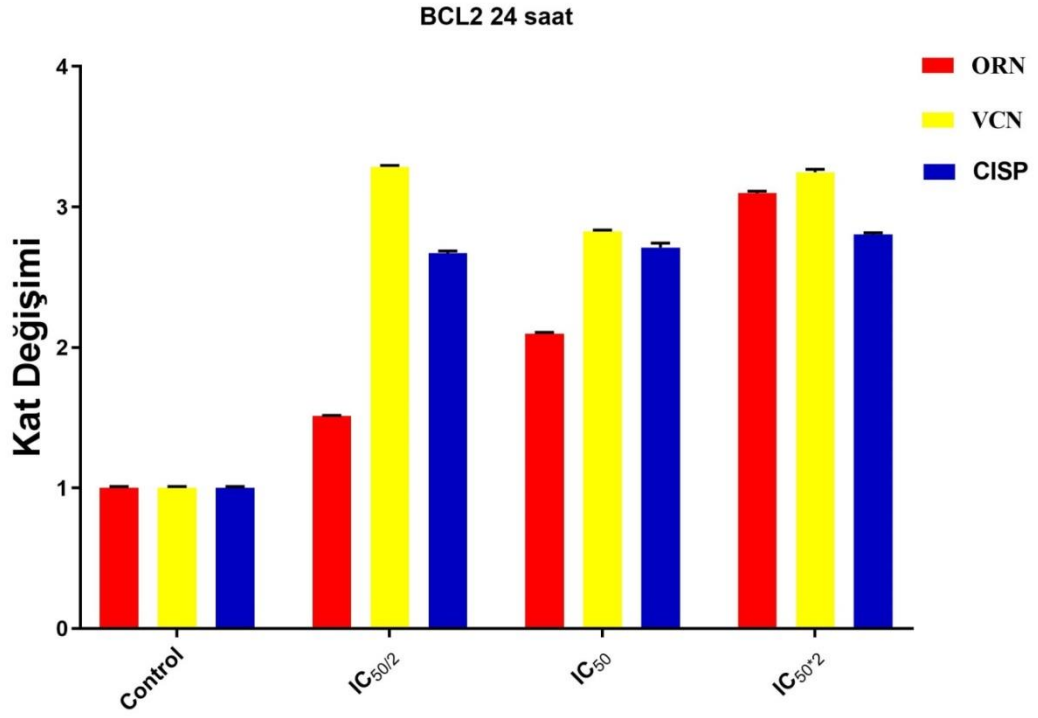
Şekil 4.34. 24 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in SEMA 3F geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



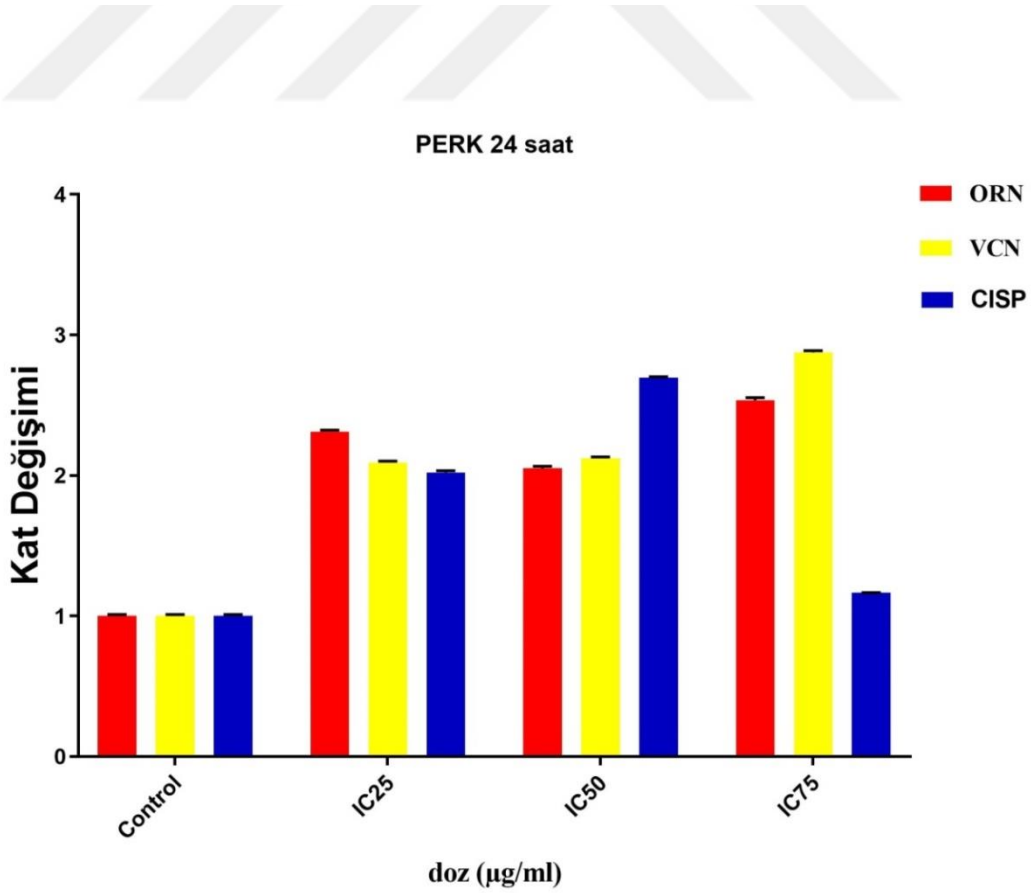
Şekil 4.35 .24 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in Bax geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



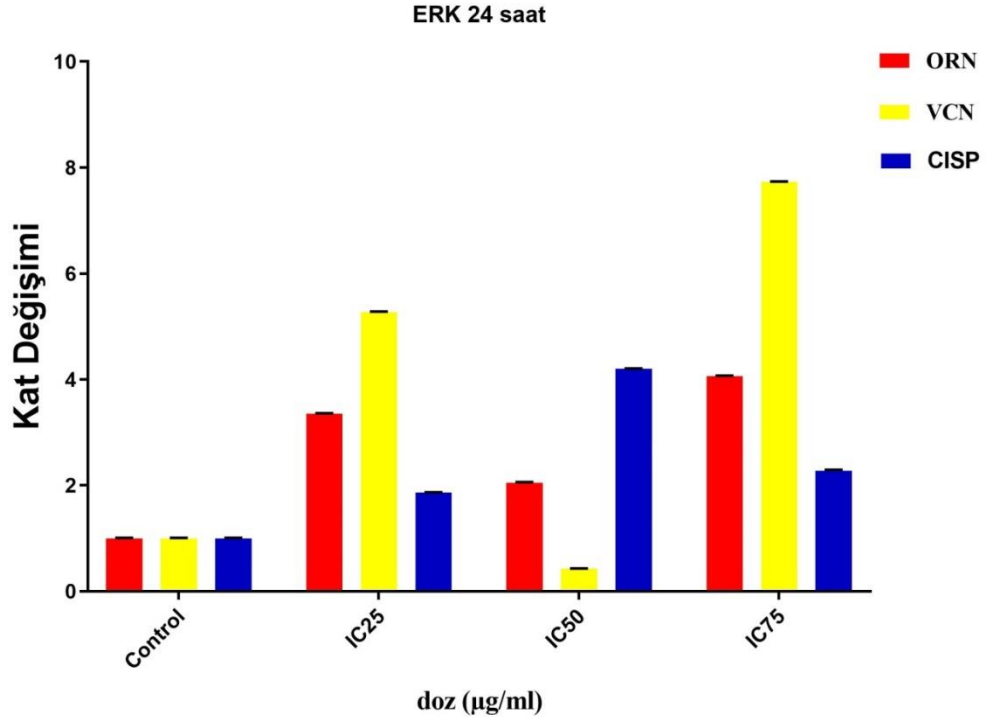
Şekil 4.36. 24 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in CYD1 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



Şekil 4.37. 24 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in Bcl-2 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

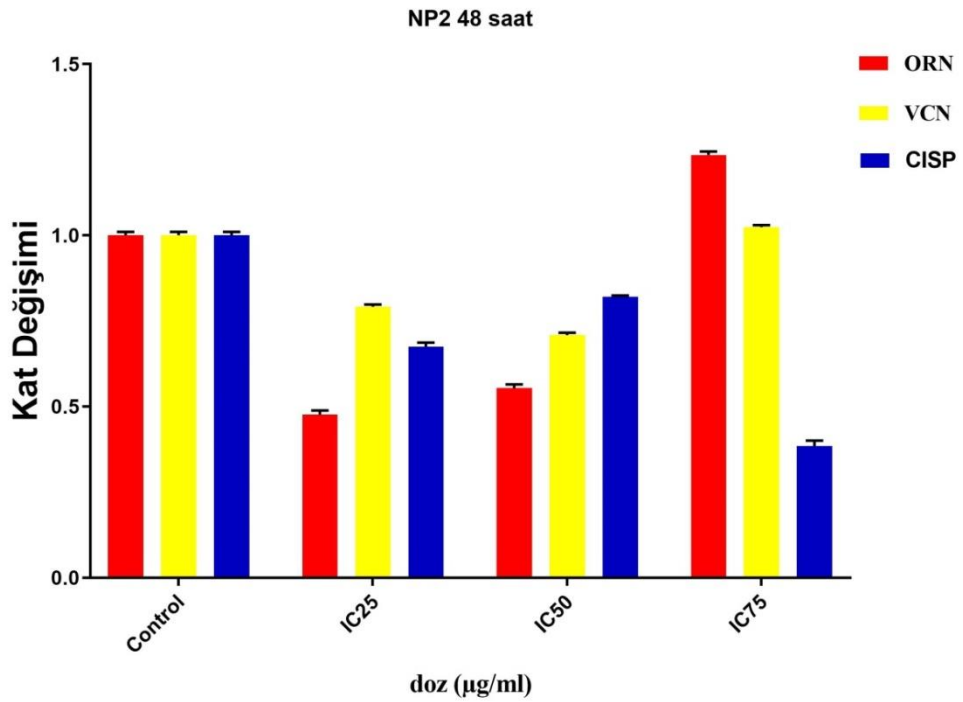


Şekil 4.38. 24 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in PERK geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

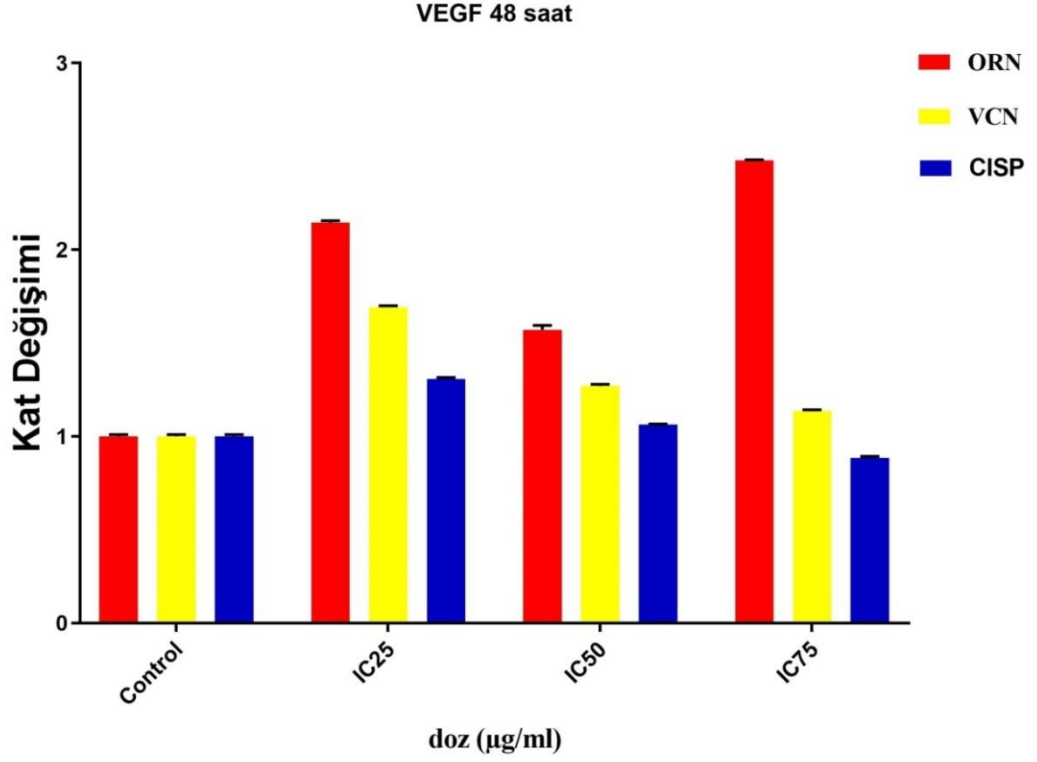


Şekil 4.39. 24 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in ERK geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

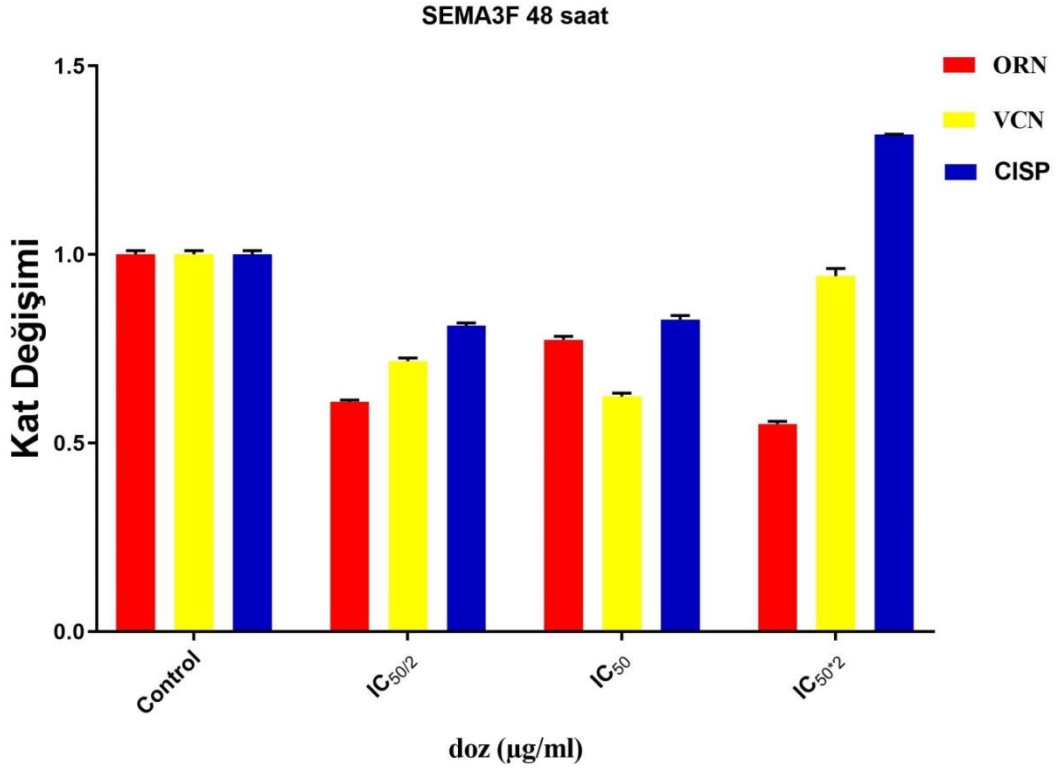
4.5.2. RT-PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) 48. Saattaki analiz sonuçları



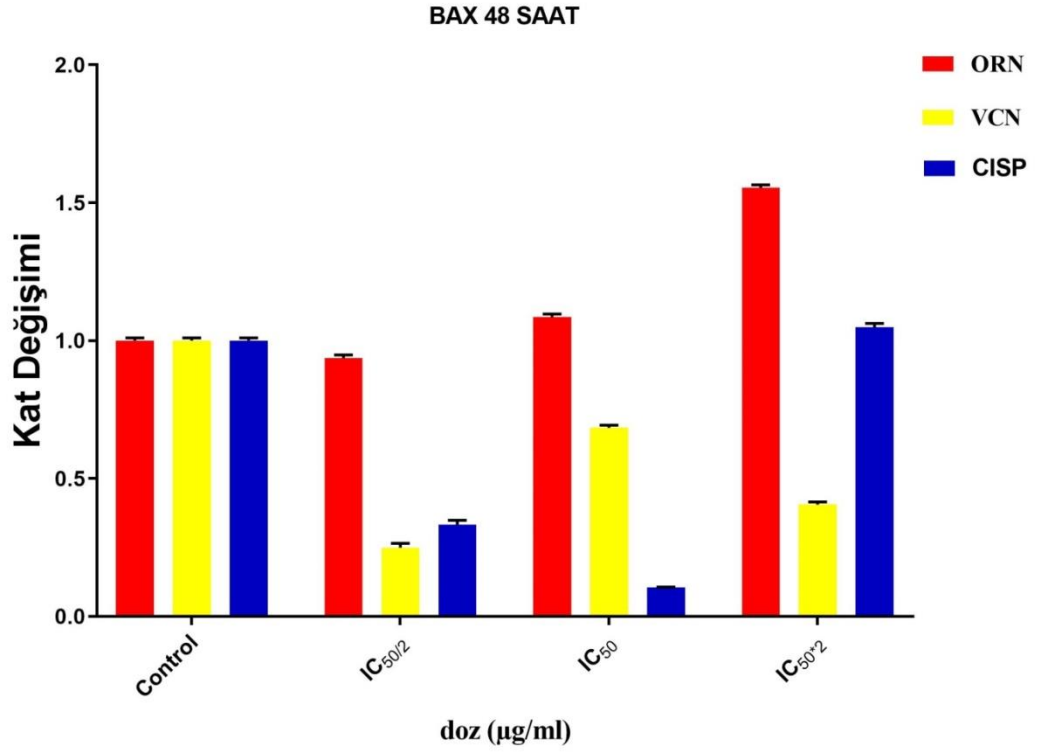
Şekil 4.40. 48 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in NP-2 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



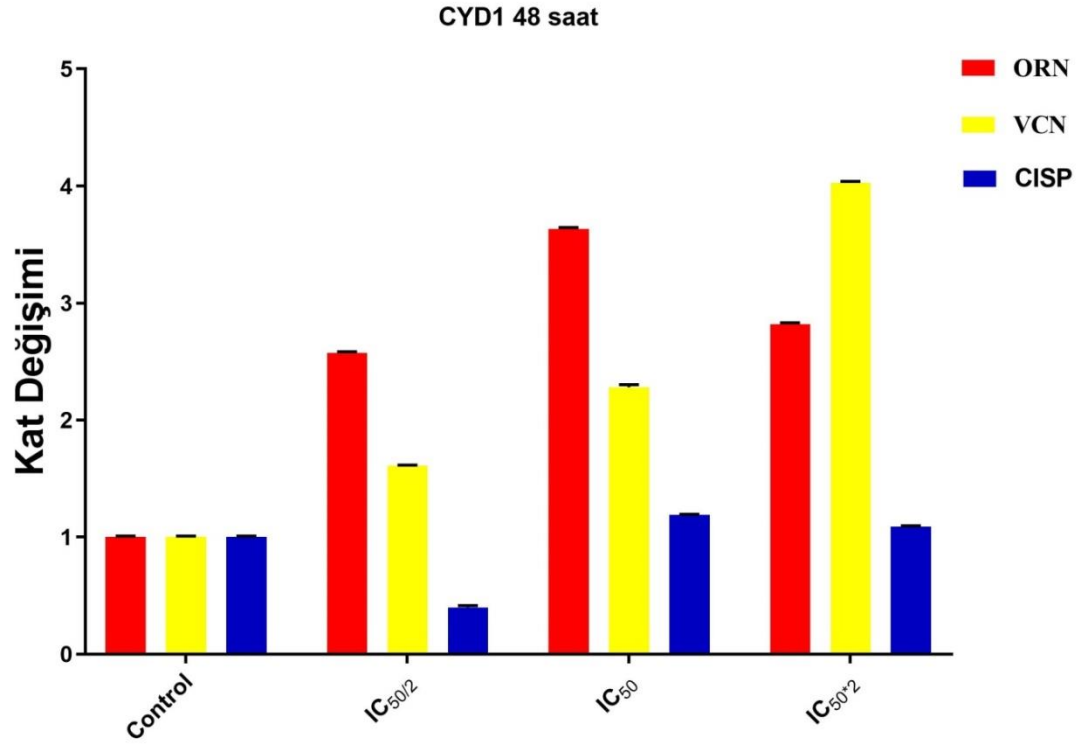
Şekil 4.41. 48 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in VEGF geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



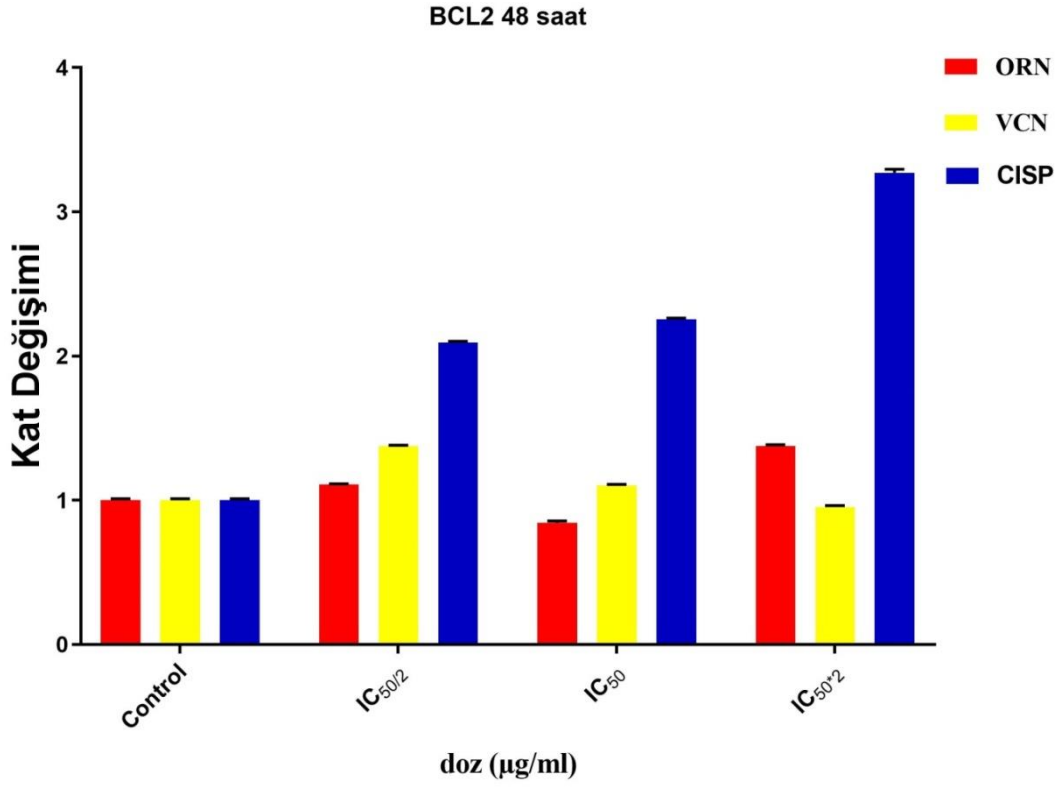
Şekil 4.42. 48 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in SEMA 3F geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



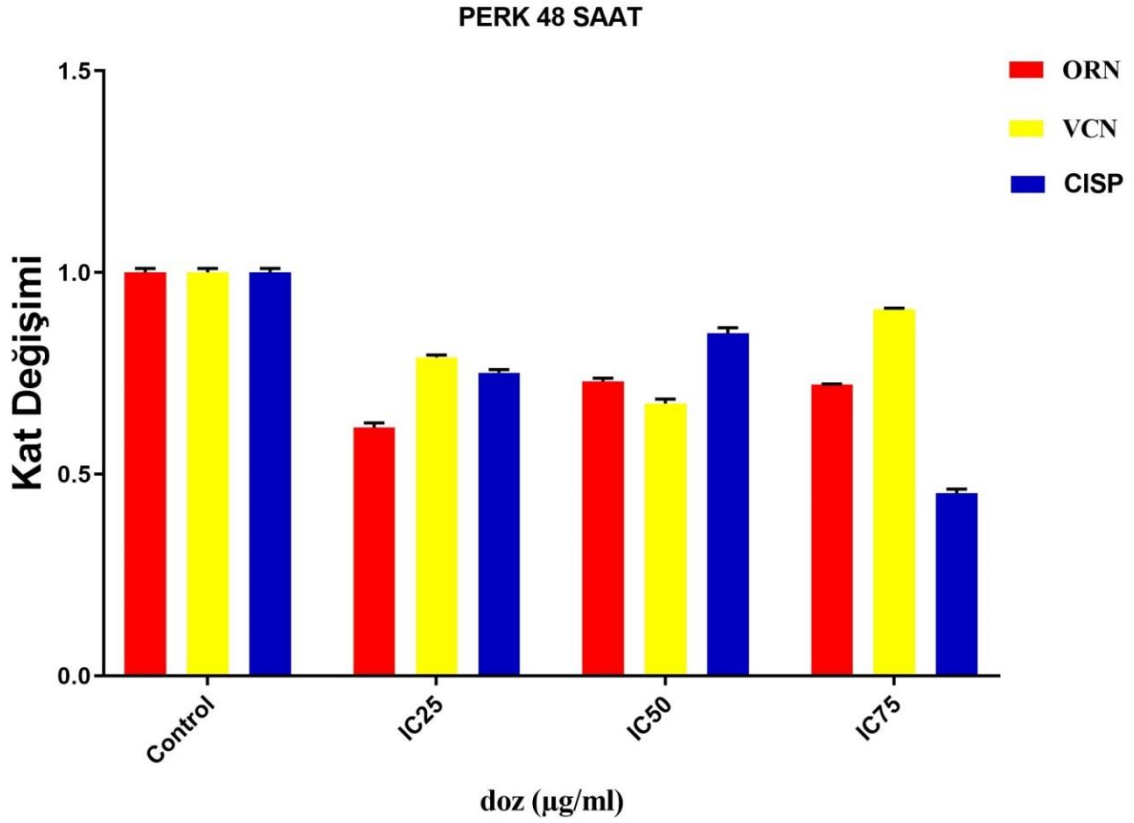
Şekil 4.43. 48 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in Bax geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



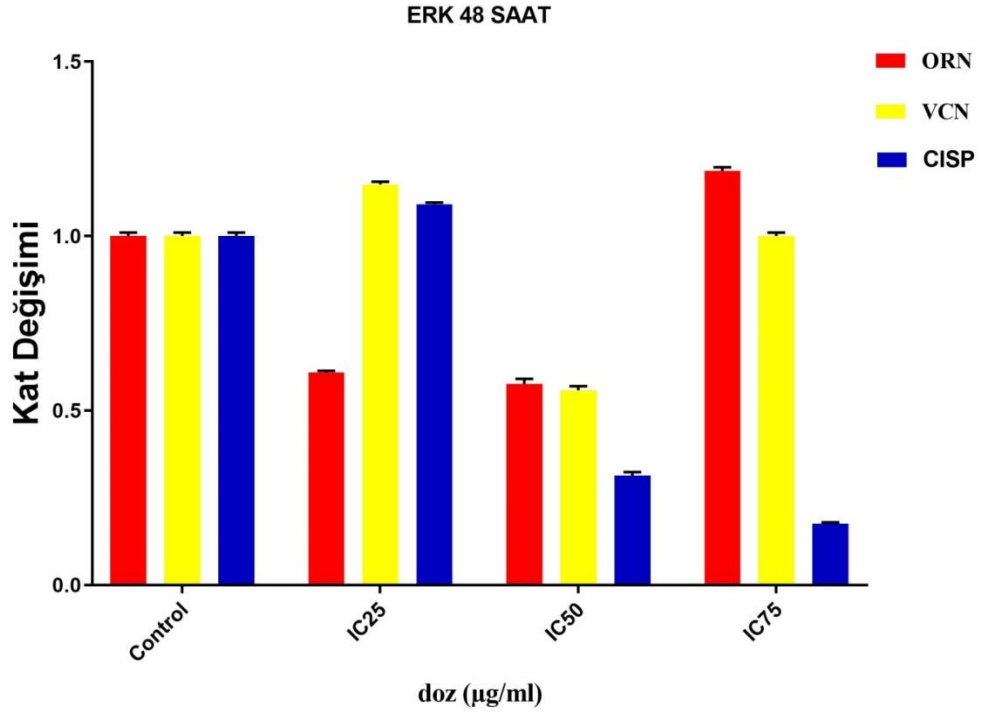
Şekil 4.44. 48 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in CYD1 geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



Şekil 4.45. 48 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in *Bcl-2* geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



Şekil 4.46. 48 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in *PERK* geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



Şekil 4.47. 48 saatteki cisplatin, Orientin ve Vicenin-2'in ERK geninin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, erkekler arasında kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir ve dünya çapında kadınlar arasında kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir. (Torre, Siegel ve Jemal 2016) Akciğer kanser tedavisindeki ilerlemelere rağmen, ortalama beş yıllık sağkalım oranı yalnızca yüzde 15'tir . (Collins and Haines 2014) Sisplatin, kanser tedavisinde kullanılan en iyi bilinen antikanser ilaçlardan biridir. Ancak mide bulantısı-kusma, nefrotoksisite ve genotoksisite gibi hastayı zorlaştıran yan etkileri vardır ‘Bu nedenle, yüksek etkinlik ve düşük toksisiteye sahip daha seçici antikanser ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. (Florea and Büsselberg 2011)

Antikarsinojenik aktiviteler sağlayan orientin ve vicenin-2 için önemli bir rol öneren önemli kanıtlar bulunmaktadır (S. J. Kim ve ark. 2018) (Yang D, Zhang X 2018). Bu tez çalışmasında, pozitif kontrol olarak sisplatin kullanarak A549 insan akciğer karsinomu epitel hücre hattı üzerindeki sitotoksik, apoptotik ve gen ekspresyon etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda ilk olarak orientin ve vicenin-2'in sitotoksitesisi, MTT testi ile değerlendirilmiş, her birinin IC50 değeri belirlenmiş ve ileri analizler için kullanılmıştır. Apoptotik etkileri akış sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca, apoptotik ve hücre proliferasyonunda yer alan genler üzerindeki etkileri ise RT-PCR kullanılarak değerlendirilmiştir.

A549, CCD-19Lu ve L929 hücreleri üzerinde sisplatin, orientin ve vicenin-2 MTT yöntemi kullanılarak zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Konsantrasyonlar 400,200,100,50,25,12.5,6.25,3.125 µg/mL olarak seçilmiş ve bu konsantrasyonların 24 ve 48 saatlik etkileri gözlenmiştir. Her bir bileşiğin kontrol grubuna göre % canlılık değeri hesaplanmıştır. CCD-19Lu ve L9269 hücre hatları sağlık hücre hatları olması sebebiyle ilaçların sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile seçilmiştir

Fang ve ark., EC - 109 hücrelerinde orientin'in inhibisyon oranının 80.0 µM'de 34.08% olduğunu göstermiştir (An, Wang, ve ark. 2015). Bu çalışmada orientin'in A549 hücreleri üzerinde 24 saat ve 48 saat IC50 değerleri sırasıyla 25 µg / ml ve 12.5 µg / ml olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1). Farklı orientin konsantrasyonları ile tedavi edilen A549 hücrelerinde 24 saat 48 saat sonunda hücre proliferasyon

inhibisyonunun kontrollere göre önemli olduğu görülmüştür (Şekil 4.1, a). Bu etkiler orientinin hem zamana hem de doza bağımlı olarak hücre çoğalmasını azalttığını göstermektedir.

Nagaprashantha. L ve ark. vicenin-2'in LNCaP insan prostat adenokarsinom hücreleri üzerindeki antitümör etkisini incelemişlerdir. Vicenin-2'in MTT testine göre 24 saatlik IC50 değeri 112 µM olarak belirlenmiştir. (Nagaprashantha ve ark. 2011). Bu çalışmada icenin-2'in A549 hücreleri üzerinde 24 saat ve 48 saat IC50 değerleri 35 µg / ml ve 12.5 µg/ml olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1). Farklı vicenin-2 konsantrasyonları ile tedavi edilen A549 hücrelerinde 24 saat 48 saat sonunda hücre proliferasyon inhibisyonunun kontrollere göre önemli olduğu görülmüştür (Şekil 4.1, b),) Bu etkiler vicenin-2'in hem zamana hem de doza bağımlı olarak hücre çoğalmasını azalttığını göstermektedir. Altıntop ve arkadaşlarının çalışmasında ise sisplatin'in IC50 değerinin 70µM olduğu belirlenmiştir (Altıntop ve ark. 2018). Çalışmamızda sisplatin'in A549 hücreleri üzerindeki IC50 değerinin 15 µg/ml olduğu tespit edilmiş ve hücre proliferasyonunun doza ve zamana bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir.

Sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkiyi belirlemek için CCD-19Lu ve L929 hücre hatları üzerinde MTT analizi yapılmış ve CCD-19Lu hücre hattında yapılan MTT analizi sonucunda hem orientin hem de vicenin-2'in 24. saatte IC50 değerinin çalıştığımız maksimum konsantrasyon olan 400 µg / mL'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. (Tablo 4.2). L929 hücre hattında yapılan MTT analizi sonucunda orientin'in 24, 48. saatteki IC50 değerinin çalıştığımız maksimum konsantrasyon olan 400 µg / mL'den daha yüksek olduğu belirlenmiş, vicenin-2'in 24, 48. saat IC50 değerleri ise sırasıyla 300 µg / mL ve 100 µg / mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3). Bu sonuçlar hem orientinin hem de vicenin-2'in akciğer kanseri hücreleri üzerinde selektif etkili olduklarını göstermektedir. Diğer taraftan L929 hücre hattı üzerinde vicenin-2'in sitotoksitesisi hem doza hem de zamana bağlı olarak artmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3) Her iki sağlıklı hücre dizisinde bileşiklerin MTT analizi sonucunda elde ettiğimiz veriler, orantılı ve birbiriyle tutarlı olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda sisplatin, orientin ve vicenin-2 A549 hücrelerinde MTT testi ile belirlenen konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik apoptotik etkileri Annexin V-PI yöntemi ile akım sitometri cihazında analiz edilmiştir.

A549 hücrelerinde yapılan erken ve geç apoptoz tespit analizine göre erken ve geç apoptotik hücre yüzdesi, sisplatin, orientin ve vicenin-2 için kontrol grubuna göre artmıştır. Sisplatin, 24. saatte ve 48. saatte hücre apoptozunu tetiklemiştir (Şekil4.6; Tablo 4.7). Erken apoptoz yüzdelerinin zamanla azalırken, geç apoptozun değişmediği görülmüştür (Şekil4.10.).

Orientin tedavisinde erken ve geç apoptoz fenomeni gözlemlenmiştir, Doza bağlı olarak hem erken hem de geç apoptoz yüzdesinde 24 saatte kayda değer bir artış gözlenmiştir. Geç apoptoz yüzdesi% 12.34'ten % 25.51'e, erken apoptoz % 15'ten % 27'ye yükselmiştir (Şekil4.7.). 48. saatte doz artışı apoptoz yüzdesi üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir (Şekil4.11.). Zaman açısından geç apoptotik hücrelerin yüzdesi, IC50 dozunda 24 saatte % 24'e 48 saatte % 40 düzeyine artış göstermiştir (Tablo 4.8; Tablo 4.12). Bu sonuçlara göre orientin'in geç apoptotik etkisinin doza ve zamana bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Vicenin-2 tedavisinde erken ve geç apoptoz fenomeni gözlenmiştir. Dozaj açısından hem erken hem de geç apoptoz oranında hem 24. hem de 48. saatte doza bağımlı olarak önemli bir artış görülmemiştir (Şekil4.8 .; Şekil4.12). IC50 dozunda geç apoptotik hücre oranı 24 saatte % 10'dan 48 saatte % 37'ye önemli ölçüde artarken, erken apoptotik hücre yüzdesi zamanla azalmıştır (Tablo4.9; Tablo4.13). Bu sonuçlara göre vicenin-2'in geç apoptotik etkisinin sadece zamana bağlı olduğu görülmüştür.

Maddeler sisplatin ile karşılaştırıldığında, hem orientin hem de vicenin-2'in 24. saatte sisplatin'den daha az geç apoptotik etki gösterdiği ve 48. saatte aynı geç apoptotik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Orientin'in erken apoptoz oranını 24 saatte IC50 dozunda sadece 1,66 kat, 48 saatte 2 kat, vicenin-2'in IC50 dozunda 24 saatte 1,33 ve 48 saatte 2,4 kat erken apoptoz oranını artırdığı gözlemlendi. Bu sonuçlara göre orientinin, vicenin-2'den daha aktif olduğu saptanmıştır.

Mitokondri, apoptotik süreçte önemli bir rol oynar. Mitokondriyal yolla ilerleyen apoptoz, genellikle mitokondriyal membran potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$)

dağılmasıyla birlikte mitokondriyal membranın geçirgenliğini gösterir. (Bielawski ve ark. 2013)) Çalışmamızda sisplatin, orientin ve vicenin-2in A549 hücrelerinde MTT testi ile belirlenen konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat süresince mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri JC-1 boyama yöntemi ile akım sitometrisi cihazında belirlenmiştir.

Sisplatin, orientin ve vicenin-2, kontrol grubuna göre 24 ve 48 saat sonunda mitokondriyal membran potansiyelinde artış görülmüştür. Orientin, kontrole kıyasla 24 saatte ve 48 saatte mitokondriyal membran depolarizasyon yüzdesinde doza bağımlı bir artış göstermiştir. Orientin A549 hücreleri üzerinde IC50 / 2 konsantrasyonunda % 6,5 değerinde mitokondriyal membran depolarizasyonuna neden olurken IC50 konsantrasyonunda % 12,8 oranında mitokondriyal membran depolarizasyonuna neden olmuştur (Şekil 4.15). Diğer taraftan bu etkide zamana bağılı olarak önemli bir artış gözlenmemiştir (Şekil 4.15; Şekil 4.19; Tablo4.16; Tablo4.20).

Vicenin-2, kontrole kıyasla IC50 ve IC50/2 konsantrasyonlarında mitokondriyal membran depolarizasyon yüzdesinde hem doza hem de zamana bağımlı bir artış göstermiştir. Vicenin-2 IC50 / 2 konsantrasyonunda 24 saat sonunda A549 hücreleri üzerinde % 9 oranında ve IC50 konsantrasyonunda % 14 oranında mitokondriyal membran depolarizasyonununa neden olurken ve IC50/2 konsantrasyonunda 48 saat sonunda % 14 ve IC50 konsantrasyonunda % 20 oranında mitokondriyal membran depolarizasyonununa neden olmuştur. Bu sonuçlar vicenin-2in mitokondriyal membrane depolarizasyon etkilerinin doza ve zamana bağımlı olduklarını göstermiştir (Şekil 4.16; Şekil 4.20; Tablo4.17; Tablo4.21).

Sisplatin ile karşılaştırıldığında, hem orientin hem de vicenin-2'in 24 saatte mitokondriyal membran potansiyelini azalttıkları gözlenmiştir. Orientin ve vicenin-2, sisplatin'e kıyasla IC50 konsantrasyonlarında 24. saatte mitokondriyal membran depolarizasyon yüzdesinde sırasıyla yaklaşık 2.13 kat ve 1.5 kat artışa neden olmuşlardır (Tablo4.15; Tablo4.16; Tablo4.17).

Tez çalışmamızda sisplatin orientin ve vicenin-2'in IC50 / 2, IC50 ve IC50 X 2 dozlarının A549 hücrelerinde 24 ve 48 saat kaspaz 3 aktivasyonu üzerine etkileri flow sitometri cihazı ile araştırılmıştır. Kaspaz ailesinden Kaspaz-3'ün , dış yol, iç

yol ve endoplazmik retikulum yolu ile aktive edildiği bilinmektedir (Lossi, Castagna ve Merighi 2018).

24. saattaki kaspaz-3 aktivasyon belirleme çalışmalarında, kontrole göre sisplatin, orientin ve vicenin-2'in tüm dozlarında aktif kaspaz 3 yüzdesinde önemli bir artış görülmemiştir. (Şekil 4.22; Şekil 4.23; Şekil 4.24). A549 ile yapılan 48 saatlik kaspaz-3 aktivasyon belirleme çalışmalarında ise vicenin-2 ve daha az oranda orientin, kontrol ve Sisplatin'e göre tüm dozlarda aktif kaspaz 3 yüzdesinde artış göstermiştir (Şekil 4.26; Şekil 4.27; Şekil 4.28). Ancak vicenin-2'in etkisi doza bağımlı olarak 48 saatte artarken, orientinin etkisi doza bağımlı değildi (Tablo 4.26; Tablo 4.27 Tablo 4.28 Tablo 4.29).

Bileşiklerimizin A549, CCDLu-19 ve L929 hücre hatları üzerindeki sitotoksiteleri MTT deneyi belirlenmiş ve IC50 dozları hesaplandıktan sonra, bu dozlara bağlı olarak apoptotik etkileri akış sitometri metodu ile değerlendirilmiş ve A549 hücreleri üzerinde RT-PCR yöntemi ile apoptotik ve hücre proliferasyonunda rol alan genler üzerindeki ifade düzeylerinin araştırılması aşamasına geçilmiştir.

Orientin, vicenin-2 ve pozitif kontrol olarak kullandığımız sisplatinin IC50 konsantrasyonları A549 hücreleri üzerine uygulanarak 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda BCL-2, Bax, CYD1, ERK, pERK genlerinin ve Beta- aktin house keeping genlerin ekspresyon düzeyleri RT-PCR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu değerleri 1 olarak kabul edilmiş ve sonuçlar kontrole göre kat değişimi olarak ifade edilmiştir.

Nasarre ve arkadaşlarının çalışması, SEMA 3F ve VEGF'nin birincil tümör hücreleri üzerinde zıt etkilere sahip olduğunu göstermektedir. VEGF, hücre yayılımını, artan hücre göçü ve metastaz ile ilişkili aktiviteleri teşvik ederken, SEMA 3F bu değişiklikleri inhibe eder ve VEGF'nin etkilerini bloke edebilir. (Nasarre and Constantin 2003) Ayrıca NRP2'nin bir ko-reseptör olduğu ve farklı kanser türlerinde sıklıkla aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Schulz ve ark. 2020) (Wang ve ark. 2018).

Deney sonuçlarımıza göre Sisplatin, orientin ve vicenin-2 24. saatte IC50 dozunda sırasıyla SEMA 3F 2.9, 2.4, 1.8 kat up regüle edilmiş (Şekil 4.31) ve 48 saatte önemli bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 4.39).

Akciğer kanserinde aşırı eksprese edildiği bilinen NRP-2 geni, kontrole göre Sisplatin orientin ve vicenin-2 tarafından 24 saatte ve daha az olarak 48 saatte downregüle etmiştir. Orientin NRP-2'yi 2.75 kat down regüle ederken, vicenin-2 IC50 dozunda 1.8 kat down regüle etmiştir. Orientin ve vicenin-2'in etkisinin zamana veya doza bağlı olmadığı görülmüştür. (Şekil 4.29; Şekil 4.37)

Akciğer kanserinde overeksprese edildiği bilinen VEGF'nin down regüle edilmesinin beklenmesine rağmen, orientin tarafından 1.1 kat ve vicenin-2 tarafından 1.2 kat up regülasyon gözlemlendi. Sisplatin, IC50 dozunda 24 saatte 1.07 kat down regülasyon ve IC50 * 2'de 48 saatte 1.14 kat down regülasyon gösterdi. (Şekil 4.32; Şekil 4.38)

Literatür taramasına göre CYD-1 geninin akciğer kanserinde overeksprese edildiği bilinmektedir (Pazarbaşı ve Kasap 2003), ancak down regüle edilmesi beklenmesine rağmen orientin tarafından ve daha az olarak vicenin-2 tarafından önemli bir up regülasyon gözlemlenmiştir (Şekil 4.33; Şekil 4.341).

Bax geninin proapoptotik olduğu bulunurken, bcl-2 geninin apoptozu inhibe ettiği doğrulanmıştır (Groeger ve ark. 2004). RT-PCR'den elde ettiğimiz sonuçlar, orientin IC50 ile 48 saat tedaviden sonra bcl-2 ekspresyonunun azaldığını ve bax ekspresyonunun biraz arttığını ve bax / bcl-2 oranının arttığını gösterdi. Orientin A549 hücrelerinde bax onkoproteinini 48 saatte IC50 konsantrasyonunda 1,14 kat ve IC50 * 2 konsantrasyonunda 1,44 kat up regüle etmiştir (Şekil 4.32; Şekil 4.40).

ERK, mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz süper ailesindedir ve MAP Kinaz sinyal iletim yolu hayatta kalm a, proliferasyon, apoptoz ve embriyogenez için önemlidir. Bu yol, insanlardaki tümörlerin yaklaşık % 30'unda aktive olur. PERK kinaz, tümör yayılması ve metastazında kritik bir rol oynar (Cross ve ark. 2000) (Liem ve ark. 2002).

RT-PCR analizinden elde ettiğimiz sonuçlar, A549 hücreleri üzerinde orientinin IC50 konsantrasyonu ile 48 saat inkübasyonu sonrasında ERK ekspresyonunun 1.75 kat ve PERK ekspresyonunun 1.4 kat azaldığını göstermiştir (Şekil 4.43; Şekil 4.44).

Vicenin-2 tedavisi 48 saatte yalnızca IC50 konsantrasyonunda ERK ekspresyonunda 1.8 kat down regülasyona neden olurken kullanılan tüm dozlarda

PERK'i down regüle etmiştir (Sırasıyla IC50 / 2 konsantrasyonunda 1.26 ve IC50 konsantrasyonunda 1.47 kat) (Şekil 4.43; Şekil 4.44).

Diğer taraftan, A549 hücreleri üzerinde Sema 3F, VEGF ve NRP-2 protein miktarları, bir kolorimetrik sandviç enzim bağlantılı immünosorbent deneyi ile ölçülmüştür. A549 hücreleri üzerindeki kullanılan orientin ve vicenin-2 konsantrasyonlarına Sema 3F, NRP-2 ve VEGF üzerindeki etkileri kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. Ancak Sema 3F grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 4.30; Tablo 4.32).

Diğer taraftan A549 hücrelerinde NRP-2 konsantrasyonlarında IC50 dozunda orientin ile tedavi edilen grupların 24. ve 48. saatlerde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu görülmüştür (sırasıyla $p = 0.023, 0,029$). A549'da VEGF düzeylerindeki tek anlamlı farkın, kontrole kıyasla 48 saatte IC50'de vicenin-2 tarafından yapıldığı gösterilmiştir ($p = 0.025$) (Tablo 4.31)

Bu çalışmada orientin'in A549 hücrelerinde 24 saatlik IC50 değeri $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ ve CCd19-lu ve L929 hücrelerine göre selektif indeksi 16'nın üstündeyken vicenin-2'in 24 saatlik IC50 değeri ise $35 \mu\text{g} / \text{ml}$ ve selektif indeksi 13,5 olarak saptanmıştır.

ANX FITC Kiti ile A549 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen erken ve geç apoptoz saptama analizine göre orientin, 24 saatte IC50'de daha yüksek geç apoptoz yüzdesi gösterdi. Her iki bileşik de 48 saatte aynı apoptotik etkiyi gösterdi. Orientin ve vicenin-2, kontrole kıyasla 24 ve 48 saat sonunda mitokondriyal membran potansiyelinde hafif bir artışa neden olmasına rağmen, orientin, 24 saatte IC50'de mitokondriyal membran depolarizasyon yüzdesinde daha fazla artış gösterdi. A549 ile 48 saatlik kaspaz-3 aktivasyon belirleme çalışmalarında, vicenin-2, orientin'e göre kontrol ve Sisplatin ile karşılaştırıldığında tüm dozlarda aktif kaspaz yüzdesinde daha fazla artış gösterdi. PCR sonuçlarımıza göre, Orientin antitümörjenik SEMA 3F 1.2'yi vicenin-2'den daha fazla up regüle etmiştir. Orientin NRP-2'yi 2,75 kat down regüle ederken, vicenin-2 24 saatte IC50 dozunda 1,8 kat down regüle etmiştir. Orientin ayrıca NRP-2'yi 2,75 kat down regüle etmiştir. Bax geninin proapoptotik olduğu bulunurken, bcl-2 geninin apoptozu inhibe ettiği doğrulandı. 48 saatteki IC50'de Orientin, bcl-2 ekspresyonunu azalttı ve bax ekspresyonunu hafifçe artırdı ve sonuç olarak bax / bcl-2 oranını artırdı. Kanser türlerinde% 30'un üzerinde

eksprese edildiği tespit edilen pERK ve ERK genleri, 48 saatteki orientin tarafından IC50'de down regüle edildiği görölmüştür.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, hem orientin'in hem de daha az ölçüde vicenin-2'in A549 hücre hattına karşı antikanser aktivite sergilediğini, a) A549 hücrelerinin canlılığının anlamlı ölçüde azaldığını ($p < 0.001$), b) sağlıklı hücreler üzerinde MTT testlerinde düşük toksisite gösterdiği c) akış sitometrisi deneyleriyle hem geç hem de erken apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir. d) apoptozla ilişkili proteinlerin Bax ekspresyonları artarken orientin ile tedavi edilen hücrelerde antiapoptotik Bcl-2'nin ekspresyonu azaldı, e) Orientin, artan hücre göçü ve metastaz ile ilişkili VEGF etkisini de bloke edebilen tümör baskılayıcı gen Sema 3F'yi up regüle ettiği f) Orientinin ayrıca akciğer kanserinde overekspres edilen Nörofilin-2'yi anlamlı olarak down regüle ettiği g) PERK ve ERK genlerini de down regüle ettiği gösterilmiştir.

Bu sonuçlar, orientin'in ve vicenin-2 antitümör, özellikle de apoptotik etkilerine in vitro kanıtlar sağlamıştır. Akciğer kanserinde anti-kanser ajan olarak maksimum potansiyeli daha fazla araştırmak için orientin ve vicenin-2 üzerinde daha fazla prelinik denemelere ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abotaleb, Mariam et al. 2019. "Flavonoids in Cancer and Apoptosis." *Cancers* 11(1).
- Abuetabh, Yasser, and Shuchita Tivari. 2014. "Semaphorins Biology and Their Significance in Cancer." 1(2): 1–5.
- Alirol, E., and J. C. Martinou. 2006. "Mitochondria and Cancer: Is There a Morphological Connection?" *Oncogene* 25(34): 4706–16.
- Altıntop, Mehlika Dilek et al. 2018. "Design, Synthesis, in Vitro and in Silico Evaluation of a New Series of Oxadiazole-Based Anticancer Agents as Potential Akt and FAK Inhibitors." *European Journal of Medicinal Chemistry*.
- An, Fang, Xinxin Cao, Haiqi Qu, and Shuhua Wang. 2015. "Attenuation of Oxidative Stress of Erythrocytes by the Plant-Derived Flavonoids Vitexin and Apigenin." *Pharmazie* 70(11): 724–32.
- An, Fang, Shuhua Wang, Qingqing Tian, and Dengxiang Zhu. 2015. "Effects of Orientin and Vitexin from *Trollius Chinensis* on the Growth and Apoptosis of Esophageal Cancer EC-109 Cells." *Oncology Letters* 10(4): 2627–33.
- Antonsson, Bruno, and Jean Claude Martinou. 2000. "The Bcl-2 Protein Family." *Experimental Cell Research*.
- Ashkenazi, Avi. 2008a. "Targeting the Extrinsic Apoptosis Pathway in Cancer." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 19(3–4): 325–31.
- Balkwill, Frances. 2006. "TNF-APromotionAndProgression.Pdf." : 409–16.
- Baruah, Taranga Jyoti, and Lakhon Kma. 2019. "Vicenin-2 Acts as a Radiosensitizer of the Non-Small Cell Lung Cancer by Lowering Akt Expression." *BioFactors* 45(2): 200–210. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biof.1472> (May 5, 2020).
- Bethune, Gillian, Drew Bethune, Neale Ridgway, and Zhaolin Xu. 2010. "Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in Lung Cancer: An Overview and Update." *Journal of Thoracic Disease* 2(1): 48–51. www.jthoracdis.com (November 25, 2020).
- Bhagwat, Anand S., and Christopher R. Vakoc. 2015. "Targeting Transcription Factors in Cancer." *Trends in Cancer* 1(1): 53–65. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405803315000023> (November 20, 2020).
- Bielawski, Krzysztof et al. 2013. "Cytotoxicity and Induction of Apoptosis of Human Breast Cancer Cells by Novel Platinum(II) Complexes." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35(2): 254–64.
- Bilello, Kathryn Smith, Susan Murin, and Richard A Matthey. 2002. "EPIDEMIOLOGY , ETIOLOGY , AND PREVENTION OF LUNG CANCER." 23(1): 5231.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Botezatu, Anca et al. 2016. "Mechanisms of Oncogene Activation." In *New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis*, InTech.
- Boxer, Robert B., Joanne W. Jang, Louis Sintasath, and Lewis A. Chodosh. 2004. "Lack of Sustained Regression of C-MYC-Induced Mammary Adenocarcinomas Following Brief or Prolonged MYC Inactivation." *Cancer Cell* 6(6): 577–86. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15607962/> (November 30, 2020).
- Brambilla, Elisabeth, Bruno Constantin, Harry Drabkin, and Joëlle Roche. 2000. "Semaphorin SEMA3F Localization in Malignant Human Lung and Cell Lines: A Suggested Role in Cell Adhesion and Cell Migration." *American Journal of Pathology*.
- Brownson, Ross C et al. 1998. "Epidemiology and Prevention of Lung Cancer in Nonsmokers." 20(2): 1964–68.
- Chai, Jijie et al. 2000. "Structural and Biochemical Basis of Apoptotic Activation by Smac/DIABLO." *Nature* 406(6798): 855–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972280> (March 8, 2020).
- Collins, Lauren, and Christopher Haines. 2014. "Lung Cancer: Diagnosis and Management." (February 2007).
- Croce, Carlo M. 2008. "Oncogenes and Cancer."
- Cross, Timothy G. et al. 2000. "Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis." *Experimental Cell Research* 256(1): 34–41. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10739649/> (November 28, 2020).
- Crow, Michael T., Kartik Mani, Young Jae Nam, and Richard N. Kitsis. 2004. "The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis." *Circulation Research* 95(10): 957–70. <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000148632.35500.d9> (March 7, 2020).
- England, The New. 2000. "NUMB ER 2 Analyses of Cohorts of Twins from Sweden , Denmark , and Finland."
- Eramo, A et al. 2008. "Identification and Expansion of the Tumorigenic Lung Cancer Stem Cell Population." : 504–14.
- Eskes, Robert et al. 1998. "Bax-Induced Cytochrome C Release from Mitochondria Is Independent of the Permeability Transition Pore but Highly Dependent on Mg²⁺ Ions." *Journal of Cell Biology* 143(1): 217–24.
- Fan, Ting-jun, Li-hui Han, Ri-shan Cong, and Jin Liang. 2005. "Caspase Family Proteases and Apoptosis Molecular Properties of Caspases." 37(11): 719–27.
- Florea, Ana Maria, and Dietrich Büsselberg. 2011. "Cisplatin as an Anti-Tumor

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects.” *Cancers* 3(1): 1351–71. /pmc/articles/PMC3756417/?report=abstract (November 28, 2020).
- Fuentes-Prior, Pablo, and Guy S. Salvesen. 2004. “The Protein Structures That Shape Caspase Activity, Specificity, Activation and Inhibition.” *Biochemical Journal* 384(2): 201–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15450003> (February 24, 2020).
- Gaur, Upasna, and Bharat B. Aggarwal. 2003. “Regulation of Proliferation, Survival and Apoptosis by Members of the TNF Superfamily.” In *Biochemical Pharmacology*, , 1403–8. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295203004908> (November 25, 2020).
- George, Vazhappilly Cijo, Graham Dellaire, and H. P. Vasantha Rupasinghe. 2017. “Plant Flavonoids in Cancer Chemoprevention: Role in Genome Stability.” *Journal of Nutritional Biochemistry* 45: 1–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.11.007>.
- Gocek, Elzbieta, Anargyros N. Moulas, and George P. Studzinski. 2014. “Non-Receptor Protein Tyrosine Kinases Signaling Pathways in Normal and Cancer Cells.” *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 51(3): 125–37. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408363.2013.874403> (November 25, 2020).
- Groeger, A. M. et al. 2004. “Prognostic Value of Immunohistochemical Expression of P53, Bax, Bcl-2 and Bcl-XL in Resected Non-Small-Cell Lung Cancers.” *Histopathology*.
- Gross, Atan, James M McDonnell, and Stanley J Korsmeyer. 1999. “BCL-2 Family Members and the Mitochondria in Apoptosis.” : 1899–1911.
- Gu, Chenghua, and Enrico Giraud. 2013. “NIH Public Access.” 319(9): 1306–16.
- Guo, Qi et al. 2014. “Orientin in Trollius Chinensis Bunge Inhibits Proliferation of HeLa Human Cervical Carcinoma Cells by Induction of Apoptosis.” In *Monatshefte Fur Chemie*,.
- Havsteen, Bent H. 2002. “The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids.” *Pharmacology and Therapeutics*.
- Hehlgans, Thomas, and Klaus Pfeffer. 2005. “The Intriguing Biology of the Tumour Necrosis Factor/Tumour Necrosis Factor Receptor Superfamily: Players, Rules and the Games.” *Immunology* 115(1): 1–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15819693> (February 24, 2020).
- Hengartner, M. O. 2000. “The Biochemistry of Apoptosis.” *Nature* 407(6805): 770–76.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hobbins, Stephanie et al. 2016. "Patient Characteristics , Treatment and Survival in Pulmonary Carcinoid Tumours : An Analysis from the UK National Lung Cancer Audit." : 10–13.
- Hodgson, C. et al. 2000. "An Investigation of the Early Effects of Manual Lung Hyperinflation in Critically Ill Patients." *Anaesthesia and Intensive Care* 28(3): 255–61.
- Hoffman, Barbara, and Dan A. Liebermann. 1998. "The Proto-Oncogene c-Myc and Apoptosis." *Oncogene*.
- Hynes, Nancy E., and Heidi A. Lane. 2005. "ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of Targeted Inhibitors." *Nature Reviews Cancer*.
- Islam, Md Nurul, Ishrat Jahan Ishita, Hyun Ah Jung, and Jae Sue Choi. 2014. "Vicenin 2 Isolated from Artemisia Capillaris Exhibited Potent Anti-Glycation Properties." *Food and Chemical Toxicology*.
- Johnson, B E, M M Nau, and J D Minna. 1987. "Myc Family Oncogene Amplification in Tumor Cell Lines Established from Small Cell Lung Cancer Patients and Its Relationship to Clinical Status and Course . Find the Latest Version :"
- Jonkers, Jos, and Anton Berns. 2004. "Oncogene Addiction: Sometimes a Temporary Slavery." *Cancer Cell* 6(6): 535–38.
<http://www.cell.com/article/S1535610804003393/fulltext> (November 30, 2020).
- Joo, Young et al. 2011. "Lung Cancer Lung Cancer in Never Smokers : Change of a Mindset in the Molecular Era." *Lung Cancer* 72(1): 9–15.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.12.013>.
- Kang, Hyejin, Sae Kwang Ku, Byeongjin Jung, and Jong Sup Bae. 2015. "Anti-Inflammatory Effects of Vicenin-2 and Scolymoside in Vitro and in Vivo." *Inflammation Research* 64(12): 1005–21.
- Kim, Bonglee, Sanjay K. Srivastava, and Sung Hoon Kim. 2015. "Caspase-9 as a Therapeutic Target for Treating Cancer." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 19(1): 113–27.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/14728222.2014.961425>
(November 20, 2020).
- Kim, JinPyo et al. 2010. "Vitexin, Orientin and Other Flavonoids from Spirodela Polyrrhiza Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Cells." *Phytotherapy Research* 24(10): 1543–48. <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.3186> (May 3, 2020).
- Kim, Soo Jin et al. 2018. "Orientin Inhibits Invasion by Suppressing MMP-9 and IL-8 Expression via the PKC α / ERK/AP-1/STAT3-Mediated Signaling Pathways in TPA-Treated MCF-7 Breast Cancer Cells." *Phytomedicine* 50(September): 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.09.172>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kiraz, Yağmur, Aysun Adan, Melis Kartal Yandim, and Yusuf Baran. 2016. "Major Apoptotic Mechanisms and Genes Involved in Apoptosis." *Tumor Biology* 37(7): 8471–86. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-016-5035-9> (November 30, 2020).
- Kroemer, Guido, and Seamus J Martin. 2005. "Caspase-Independent Cell Death." 11(7): 725–30.
- Ku, Sae Kwang, and Jong Sup Bae. 2015. "Vicenin-2 and Scolymoside Inhibit High-Glucose-Induced Vascular Inflammation in Vitro and in Vivo." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 94(3): 287–95. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjpp-2015-0215> (May 5, 2020).
- Ku, Sae Kwang, Soyoung Kwak, and Jong Sup Bae. 2014. "Orientin Inhibits High Glucose-Induced Vascular Inflammation In Vitro and In Vivo." *Inflammation* 37(6): 2164–73. <http://link.springer.com/10.1007/s10753-014-9950-x> (May 4, 2020).
- Lam, Kit Ying et al. 2016. "A Review on Medicinal Properties of Orientin." *Advances in Pharmacological Sciences* 2016.
- Lantuejoul, Sylvie, and Bruno Constantin. 2003. "Expression of VEGF , Semaphorin SEMA3F , and Their Common Receptors Neuropilins NP1 and NP2 in Preinvasive Bronchial Lesions , Lung Tumours , and Cell Lines." 1(March): 336–47.
- Launay, Sophie et al. 2005. "Vital Functions for Lethal Caspases." *Oncogene* 24(33): 5137–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16079910> (February 23, 2020).
- Lee, Wonhwa et al. 2015. "Antiseptic Effect of Vicenin-2 and Scolymoside from *Cyclopia subternata* (Honeybush) in Response to HMGB1 as a Late Sepsis Mediator in Vitro and in Vivo." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 93(8): 709–20. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjpp-2015-0021> (May 5, 2020).
- Libermann, Towia, and Luiz Zerbini. 2006. "Targeting Transcription Factors for Cancer Gene Therapy." *Current Gene Therapy* 6(1): 17–33.
- Liem, A. A., M. P. Chamberlain, C. R. Wolf, and A. M. Thompson. 2002. "The Role of Signal Transduction in Cancer Treatment and Drug Resistance." *European Journal of Surgical Oncology* 28(6): 679–84.
- Lowe, Scott W, and Athena W Lin. 2000. "Apoptosis in Cancer." 21(3): 485–95.
- Manna, Sunil K., and Bharat B. Aggarwal. 2000. "All-Trans-Retinoic Acid Upregulates TNF Receptors and Potentiates TNF-Induced Activation of Nuclear Factors-KB, Activated Protein-1 and Apoptosis in Human Lung Cancer Cells." *Oncogene*.
- Mao, Li et al. 1994. "Advances in Brief Detection of Oncogene Mutations in Sputum

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Precedes Diagnosis of Lung Cancer1.” : 1634–37.
- Mao, Yousheng. 2016. “Epidemiology of Lung Cancer Lung Cancer Epidemiology Etiology.” *Surgical Oncology Clinics of NA* 25(3): 439–45.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.001>.
- Mignotte, Bernard, and Jean-Luc Vayssiere. 1998. “Mitochondria and Apoptosis.” *European Journal of Biochemistry* 252(1): 1–15.
<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.1998.2520001.x> (March 7, 2020).
- Montor, Wagner Ricardo, Andrei Ronaldo Oliveira Silva Escartin Salas, and Fabiana Henriques Machado de Melo. 2018. “Receptor Tyrosine Kinases and Downstream Pathways as Druggable Targets for Cancer Treatment: The Current Arsenal of Inhibitors.” *Molecular Cancer*.
- Nagaprashantha, Lokesh Dalasanur et al. 2011. “Anti-Cancer Effects of Novel Flavonoid Vicenin-2 as a Single Agent and in Synergistic Combination with Docetaxel in Prostate Cancer.” *Biochemical Pharmacology* 82(9): 1100–1109.
- Nasarre, Patrick, and Bruno Constantin. 2003. “Semaphorin SEMA3F and VEGF Have Opposing Effects on Cell Attachment and Spreading.” 5(1): 83–92.
- Neufeld, Gera et al. 2015. “Regulation of Angiogenesis and Tumor Progression by Semaphorins.” In *Semaphorins: A Diversity of Emerging Physiological and Pathological Activities*, Springer Japan, 107–36.
- Neufeld, Gera, Tali Lange, Asya Varshavsky, and Ofra Kessler. 2007. “Semaphorin Signaling in Vascular and Tumor Biology.” *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Oh, Dool Ri et al. 2018. “Antidepressant-Like Effects of Vaccinium Bracteatum in Chronic Restraint Stress Mice: Functional Actions and Mechanism Explorations.” *American Journal of Chinese Medicine* 46(2): 357–87.
- Ortmann, Caroline F et al. “Enriched Flavonoid Fraction from Cecropia Pachystachya Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress.” *Neurotoxicity Research* 29.
- Park, Eun-Jung, and John M. Pezzuto. 2012. “Flavonoids in Cancer Prevention.” *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 12(8): 836–51.
- PAZARBAŞI, Ayfer, and Mülkiye KASAP. 2003. 12 Arşiv Kaynak Tarama Dergisi *Kanser Genetiği*. <https://dergipark.org.tr/en/pub/aktd/29472> (November 30, 2020).
- Peter, Sonia R. et al. 2015. “The Application of HPLC ESI MS in the Investigation of the Flavonoids and Flavonoid Glycosides of a Caribbean Lamiaceae Plant with Potential for Bioaccumulation.” *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Pierotti, Marco A., Gabriella Sozzi, and Carlo M. Croce. 2003. "Discovery and Identification of Oncogenes." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13714/> (November 19, 2020).
- Riedl, Stefan J., and Guy S. Salvesen. 2007. "The Apoptosome: Signalling Platform of Cell Death." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(5): 405–13. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm2153> (February 24, 2020).
- S, Gautamethi, Bokyung Sung, Bharat B. Aggarwal. 2008. "[Frontiers in Bioscience 5094-5107, May 1, 2008] TNF: A Master Switch for Inflammation to Cancer Gautam Sethi, Bokyung Sung, Bharat B. Aggarwal." *Frontiers in Bioscience*: 5094–5107.
- Sak, Katrin. 2014. "Cytotoxicity of Dietary Flavonoids on Different Human Cancer Types." *Pharmacognosy Reviews* 8(16): 122–46.
- Samet, Jonathan M. et al. 2009. "Lung Cancer in Never Smokers: Clinical Epidemiology and Environmental Risk Factors." *Clinical Cancer Research* 15(18): 5626–45. www.aacrjournals.org (November 30, 2020).
- Satyamitra et al. 2014. "The Antioxidant Flavonoids, Orientin and Vicenin Enhance Repair of Radiation-Induced Damage." *Scholarena Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1(1): 1–9.
- Sayers, Thomas J. 2011. "Targeting the Extrinsic Apoptosis Signaling Pathway for Cancer Therapy." *Cancer Immunology, Immunotherapy*.
- Schulz, Alexander et al. 2020. "Linking NRP2 With EMT and Chemoradioresistance in Bladder Cancer." *Frontiers in Oncology*.
- Sharma, Pooja et al. 2016. "Structure-Activity Relationship Studies on Holy Basil (Ocimum Sanctum L.) Based Flavonoid Orientin and Its Analogue for Cytotoxic Activity in Liver Cancer Cell Line HepG2." *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 19(8): 656–66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27396915/> (November 13, 2020).
- Sheridan, Clare, and Seamus J. Martin. 2010. "Mitochondrial Fission/Fusion Dynamics and Apoptosis." *Mitochondrion*.
- Da Silva, Rosi Zanoni et al. 2010. "Antinociceptive Properties of Conocarpan and Orientin Obtained from Piper Solmsianum C. DC. Var. Solmsianum (Piperaceae)." *Journal of Natural Medicines* 64(4): 402–8.
- Strasser, Andreas, Liam O'Connor, and Vishva M. Dixit. 2000. "Apoptosis Signaling." *Annual Review of Biochemistry* 69(1): 217–45. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.69.1.217> (March 7, 2020).
- Suen, Der Fen, Kristi L. Norris, and Richard J. Youle. 2008. "Mitochondrial Dynamics and Apoptosis." *Genes and Development*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Sukhramani, Prakash S. et al. 2011. "Biological Cytotoxicity Evaluation of Spiro[Azetidine-2, 3'-Indole]-2', 4(1'H)- Dione Derivatives for Anti-Lung and Anti-Breast Cancer Activity." *Der Pharmacia Lettre*.
- Sun, Aning et al. 2016. "C-Glycosyl Flavonoid Orientin Improves Chemically Induced Inflammatory Bowel Disease in Mice." *Journal of Functional Foods* 21: 418–30. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615006337> (May 4, 2020).
- Susan. 2009. "Major Cell Death Pathways at a Glance." *Microbes and Infection* 11(13): 1050–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>.
- Thangaraj, Kalaiyarasu et al. 2019. "Orientin Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest and Mitochondria Mediated Intrinsic Apoptosis in Human Colorectal Carcinoma HT29 Cells." *Biomolecules* 9(9): 1–17.
- Thangaraj, Kalaiyarasu, Karthi Natesan, Mariyappan Palani, and Manju Vaiyapuri. 2018. "Orientin, a Flavanoid, Mitigates 1, 2 Dimethylhydrazine-Induced Colorectal Lesions in Wistar Rats Fed a High-Fat Diet." *Toxicology Reports*.
- Travis, William D et al. 2015. "The 2015 World Health Organization Classification Of." *Journal of Thoracic Oncology* 10(9): 1243–60. <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>.
- Uma Devi, P., K. S. Bisht, and M. Vinitha. 1998. "A Comparative Study of Radioprotection by Ocimum Favonoids and Synthetic Aminothiols in the Mouse." *British Journal of Radiology* 71(JULY): 782–84.
- Uma Devi, P., and M. Satyamitra. 2004. "Protection against Prenatal Irradiation-Induced Genomic Instability and Its Consequences in Adult Mice by Ocimum Flavonoids, Orientin and Vicenin." *International Journal of Radiation Biology* 80(9): 653–62.
- Uslu, Sema, and Fatih K Ar. 2018. "Semaforinler Semaphorins." 11(1): 1–6.
- Varfolomeev, Eugene E, and Avi Ashkenazi. 2004. "Tumor Necrosis Factor: An Apoptosis JuNKie?" *Cell* 116(4): 491–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14980217> (February 24, 2020).
- Vicente-duen, Carolina, Isabel Romero-camarero, Cesar Cobaleda, and Isidro Sa. 2013. "Function of Oncogenes in Cancer Development :." 32(11): 1502–13.
- Vrinda, B., and P. Uma Devi. 2001. "Radiation Protection of Human Lymphocyte Chromosomes in Vitro by Orientin and Vicenin." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 498(1–2): 39–46.
- Wallach, David et al. 1997. "Cell Death Induction by Receptors of the TNF Family : Towards a Molecular Understanding." *FEBS Letters* 410(1): 96–106. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00553-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00553-X).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Wang, Jingwen et al. 2018. "NRP-2 in Tumor Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis." *Cancer Letters* 418: 176–84.

Witsch, Esther, Michael Sela, and Yosef Yarden. 2010. "Roles for Growth Factors in Cancer Progression." *Physiology*.

Yang D, Zhang X, Zhang T. 2018. "Vicenin-2 Inhibits Wnt / β -Catenin Signaling and Induces Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cell Line." *Drug Design, Development and Therapy*: 1303–10.

Yazdani, Umar, and Jonathan R Terman. 2006. "Protein Family Review The Semaphorins."

Yip, K W, and J C Reed. 2008. "Bcl-2 Family Proteins and Cancer." : 6398–6406.

Yu Yang, Shi, Anur Miah, Amit Pabari, and Marc Winslet. 2011. 16 *Frontiers in Bioscience Growth Factors and Their Receptors in Cancer Metastases*.