

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENİZHIYARI ÖZÜTÜNÜN ANTI-TÜMÖR ETKİLERİ
VE GELENEKSEL KEMOTERÖPATİK İLAÇLARLA
SİNERJİSTİK ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NURAY ARSLAN

ARALIK/2019

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENİZHIYARI ÖZÜTÜNÜN ANTI-TÜMÖR ETKİLERİ
VE GELENEKSEL KEMOTERÖPATİK İLAÇLARLA
SİNERJİSTİK ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NURAY ARSLAN

ARALIK/2019

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

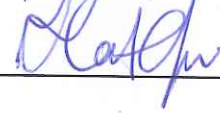
Muray Arslan tarafından hazırlanan **Deniz hıyarı özütünün anti-tümör etkileri ve geleneksel kemoterapik ilaçlarla sinerjistik etkileşiminin araştırılması** başlıklı tezinin, 26/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı'nda doktora derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ (Danışman) (Jüri Başkanı)

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Dr. Öğretim Üyesi Mehlika ALPER (Üye)

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Dr. Öğretim Üyesi Olcay BOYACIOĞLU (Üye)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı,
Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

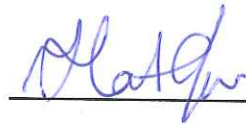
Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEKİmza:

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla



Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ

Danışman, Biyoloji Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla



Savunma Tarihi: 26/12/2019

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yaptığımı da beyan ederim.

NURAY ARSLAN

26/12/2019



ÖZET
DENİZHIYARI ÖZÜTÜNÜN ANTI-TÜMÖR ETKİLERİ VE GELENEKSEL
KEMOTERAPİK İLAÇLARLA SİNERJİSTİK ETKİLEŞİMİNİN
ARAŞTIRILMASI

Nuray ARSLAN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice Güneş

Aralık 2019, 91 sayfa

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen ve dünyadaki başlıca sağlık problemlerinin başında gelen hastalıklardan biridir. Bu nedenle, hem güvenli hem etkili antikanser ajanlarının geliştirilmesi kaçınılmazdır. Kanser tedavisindeki temel problem geliştirilen ilaçların toksik etkisidir. Bunun için girişimlerin çoğu anti-kanser ilaçlarla kombinasyonunda sinerjistik etkili olan besin kaynaklarının ve fitoterapik ajanların araştırılmasına yönelmiştir. Bitki veya denizel organizmalardan elde edilen özütlerin geleneksel kemoteropatik ajanlarla kombinasyonu kanser tedavisinde etkiyi arttırmaktadır. Farklı coğrafik bölgelerden ve farklı denizhiyari türlerinden yeni anti-kanser bileşiklerin tanımlanması için önemli bir potansiyel bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada, Gökova körfezinden toplanan *Holothuria sanctori* türünden elde edilen özütlerin anti-tümör etkilerinin çeşitli kanser hücreleri üzerinde etkisinin araştırılması ve bu özütlerin kullanımda olan ticari kanser ilaçları (cisplatin, docetaxel) ile sinerjistik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. *Holothuria sanctori*'nin aseton (HSA) ve metanol (HSM) ile hazırlanan özütlerinin A549 ve PC-3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri ve mekanizmaları araştırılmıştır. HSM ve HSA özütlerinin 24, 48 ve 72 saatlerdeki inkübasyon sürelerinde doz ve zamana bağlı olarak sitotoksik aktivitelerine bakıldığında; *Holothuria sanctori* aseton ve metanol özütlerinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin doza ve zamana bağlı olarak değiştiği; en etkili doz – zaman ikilisinin 72 saat ve 20 mg/ml'lik dozlar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, her iki özütün de en etkili olduğu 72 saat inkübasyon sonrasında IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında, HSA'nın (1.7 mg/ml) daha düşük dozlarda daha yüksek etki gösterdiği gözlenmiştir. PC-3 hücre hattı için ise; HSM ve HSA ile hazırlanan özütlerin zamana bağlı olarak sitotoksik etkilerinin arttığı söylenebilir. Aynı zamanda, HSM ve HSA özütlerinin sitotoksik etkilerinin PC-3 ve A549'a kıyasla sağlıklı hücre hattı olan HEK293 üzerinde daha az olduğu görülmüştür. Farklı konsantrasyonlardaki HSM özütüne maruz kalan A549 ve PC-3 hücrelerinde apoptotik hücre ölümü, Annexin-V kullanılarak gerçekleştirilen flow sitometri yöntemi ile belirlenmiştir.

A549 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrol hücreleri ile kıyaslandığında yaklaşık 2.1 kat; PC-3 hücrelerinde ise 1.9 kat arttığı belirlenmiştir. HSM özütünün A549 ve PC-3 hücre hattında apoptozu indüklediğini flow sitometri ve kaspaz-3 analizleri ile gösterilmiştir. *Holothuria sanctori*'ye ait HSA ve HSM özütlerinin kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan cisplatin ve docetaxel ile kombinasyonlarının, etkileşimlerine bakıldığında, tüm etkileşimlerin antagonistik olduğu saptanmıştır. HPLC analizi ile HSM özütünün içeriğindeki fenolik bileşikler incelendiğinde, HSM özütünde en fazla bulunan fenolik bileşiklerin ellagic asit ve epicatechin olduğu tespit edilmiştir. Gelecek çalışmalar bu bireysel bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizmalarını belirleyecektir. Sonuç olarak, bu çalışma ile ekonomik değeri oldukça yüksek olan ve ülkemiz denizlerinde de yayılış gösteren bir denizhiyari türü olan *Holothuria sanctori*'nin sitotoksik etkileri ve bu etkiye neden olan mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Holothuria sanctori*, Sitotoksik Aktivite, Apoptoz, Kanser, HPLC, Sinerjik Etki

ABSTRACT
ANTI-TUMOR EFFECTS OF SEA CUCUMBER EXTRACT AND
INVESTIGATION OF SYNERGISTIC INTERACTION WITH
TRADITIONAL CHEMOTHERAPIC DRUGS

Nuray ARSLAN

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ

December 2019, 91 pages

Cancer is one of the major health problems in the world, characterized by uncontrolled proliferation of cells. Therefore, the development of both safe and effective anticancer agents is inevitable. The main concern in cancer treatment is the toxic effect of the developed drugs. Most attempts have been directed to the search for synergistically effective nutrient sources and phytotherapeutic agents in combination with anti-cancer drugs. The combination of extracts from plant or marine organisms with conventional chemotherapeutic agents increases the efficacy in cancer treatment. It is known that there is significant potential for the identification of new anti-cancer compounds from different geographic regions and different species of cucumber. Therefore, the main aim of this study was to investigate anti-tumor effects of extracts from a sea cucumber species *Holothuria sanctori* collected from Gökova Bay on various cancer cells and to investigate the synergistic effects of these extracts with commercial cancer drugs (cisplatin, docetaxel) in use. The cytotoxic effects and mechanisms of *Holothuria sanctori* extracts prepared with acetone and methanol on A549 and PC-3 cells were investigated. When the cytotoxic activities of HSM and HSA extracts in 24, 48 and 72 hours incubation periods were examined according to dose and time; The cytotoxic effect of *Holothuria sanctori* acetone and methanol extracts on A549 cells varies depending on dose and time; the most effective dose – time paired for 72 hours and 20 mg/ml. Furthermore, HSA (1.7 mg/ml) showed a higher effect at lower doses when IC₅₀ values were compared after 72 hours incubation, where both extracts were most effective. For the PC-3 cell line; it can be said that the extracts prepared with HSM and HSA have increased cytotoxic effects over time. The healthy cell line HEK293; the cytotoxic effects of HSM and HSA extracts were found to be less than those of PC-3 and A549. It was determined by using flow cytometry method using Annexin V that HSM extract drains A549 cells to apoptosis. Apoptotic cell death was observed in PC-3 cancer cells exposed to different concentrations of HSM extract. The caspase-3 activity in A549 cells was approximately 2.1-fold compared to control cells; PC-3 cells increased 1.9 fold. It can be said that the HSM extract induces apoptosis in the A549 and PC-3 cell line and is consistent with the data obtained from flow cytometry analysis and MTT assay results. When the interaction of HSA and HSM extracts of *Holothuria sanctori* with cisplatin and

docetaxel, which are widely used in cancer treatment, are examined; all interactions were found to be antagonistic. HPLC analysis revealed phenolic compounds in the HSM extract. According to this analysis, the most common phenolic compounds in the HSM extract are ellagic acid and epicatechin. Future studies will identify the mechanism of effects of each compound on these cancer cells. In conclusion, this is the first study elucidating the cytotoxic effects of *Holothuria sanctori* which has a high economic value and is widespread in the seas of our country.

Keywords: *Holothuria sanctori*, Cytotoxic Activity, Apoptosis, Cancer, HPLC, Synergistic Effect



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının her aşamasında beni destekleyen, çalışmanın yapılmasına teşvik eden beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan, değerli Danışmanım Sayın Prof. Dr. Hatice Güneş'e en derin teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Mehlika Alper'e ve Denizhiyarı temininde yardım ve desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ali Türker' e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın her aşamasında fikir ve görüşlerinden yararlandığım Dr. Müjgan Kesik Oktay hocama en derin teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Konu ve Kapsam	1
1.2. Amaç	2
1.3. Kanser.....	3
1.3.1. Kanser tipleri ve tedavi yöntemleri	5
1.3.2. Kanserın alternatif tedavisinde kullanılan denizel organizmalar	6
1.4. <i>Holothuria (Platyperona) sanctori</i> ' nin Taksonomisi ve Ülkemizdeki Dağılımı	8
1.5. Denizhıyarlarının Genel Özellikleri	9
1.5.1. Triterpen Glikozitler.....	10
1.5.2. Glukozaminoglukanlar: Kondroitin sülfat	11
1.5.3. Nörojenik Gangliyositler.....	11
1.5.4. Antimikrobiyal aktivite gösteren bileşikler.....	12
1.5.5. Diğer Bileşikler	12
1.6. Denizhıyarlarının kanser hücrelerini öldürme mekanizmaları	13
1.6.1. Sitotoksik aktivite	13
1.6.2. Hücre döngüsünün inhibisyonu	14
1.6.3. Apoptozun uyarılması	15
1.6.4. Anti-metastatik ve anti-anjiyogenik etkiler.....	17
2. MALZEME VE YÖNTEM	20
2.1.MALZEME	20
2.1.1. Hücre Hatları.....	20
2.1.2. Ektrakte edilen deney materyali	20
2.1.3. Annexin-V analizlerinin ölçülmesi	20
Özüt uygulanan hücrelerin apoptoz yüzdesi “Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit” (BMS500FI, eBioscience, USA) protokolüne uygun olarak Beckman Coulter firmasına ait Navios marka Flow sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.	20
2.1.4. Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler	20
Fetal Bovin Serum (FBS):.....	20

RMPI 1640-Medyum:	20
PBS (Phosphate buffered saline):.....	21
MTT [3-4,5- dimetil- 2 –tiazolil)- 2,5- difenil- 2H tetrazolium bromid]:.....	21
Penisilin-streptomisin antibiyotik:	21
Trypan blue:	21
Tripsin % 0.25 w/v:.....	21
Dimetil sülfoksid(DMSO):	21
2.1.5. Deneylerde kullanılan kemoteröpatik ilaçlar	21
Cisplatin (Sigma Aldrich):	21
Docetaxel: 5000 µg/ml'lik stoklar halinde RPMI 1640 ile çözülerek hazırlanır. 0.22 µm'lik membran filtreden geçirilir.	21
2.1.6. Deneylerde kullanılan kimyasallar	21
2.2.YÖNTEM.....	22
2.2.1. <i>Holothuria sanctori</i> özütlerinin elde edilmesi	23
2.2.2.Hücre kültürü	23
2.2.3. Hücrelerin pasajlanması.....	24
2.2.4. Sitotoksik aktivitenin araştırılması	24
2.2.5. MTT Analizi	25
2.2.6. IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi	26
2.2.7. Flowsitometri ile apoptoz tayini (Annexin-V yöntemi)	26
2.2.8. Kaspaz -3 Analizi.....	27
2.2.9. Kanser hücre hatlarıyla kemoteröpatik ilaçların sinerjistik etkileşiminin incelenmesi	27
2.2.10. HLPC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) Deneyi.....	28
3. BULGULAR.....	30
3.1. Denizhiyarı <i>Holothuria sanctori</i> Özütünün Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması.....	30
3.1.1. A549 kanser hücre hattı üzerinde özütlerin doz ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkileri.....	30
3.1.2. PC-3 kanser hücre hattı üzerinde özütlerin doz ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkileri.....	38
3.1.3. HEK293 sağlıklı hücre hattı üzerinde özütlerin sitotoksik etkileri.....	46
3.2. Denizhiyarı <i>Holothuria sanctori</i> Özütlerinin Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Flow Sitometri Analizi İle Belirlenmesi	47
3.2.1. A549 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri.....	48
3.2.2. PC-3 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerin araştırılması	49
3.3. Kaspaz -3 aktivitesi	50
3.4. HS özütünün, kanser hücre hatları üzerinde, kanser ilaçlarıyla sinerjistik etkisinin incelenmesi	51

3.4.1.	A549 kanser hücre hattı üzerinde HSM özütünün, cisplatin ve docetaxel ile sinerjistik etkisinin araştırılması.....	51
3.4.2.	A549 kanser hücre hattı üzerinde HSA özütünün, Cisplatin ve Docetaxel ile sinerjistik etkisinin araştırılması.....	54
3.4.3.	PC-3 hücre hattı üzerinde HSM özütünün, cisplatin ve docetaxel ile sinerjistik etkisinin araştırılması.....	56
3.4.4.	PC-3 hücre hattı üzerinde HSA özütünün, Cisplatin ve Docetaxel ile sinerjistik etkisinin araştırılması.....	58
3.5.	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri.....	61
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	64
4.1.	Denizhiyari, <i>Holothuria sanctori</i> özütlerinin A549 ve PC-3 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması	64
4.2.	Denizhiyari <i>Holothuria sanctori</i> özütlerinin A549 ve PC-3 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkilerinin belirlenmesi.....	68
4.2.1.	Hücre ölümünün Annexin V yöntemi ile Flow sitometrik Analizi.....	69
4.2.2.	Kaspaz aktivitesi	70
4.3.	HS özütünün, A549 ve PC-3 hücre hatları üzerinde, kanser ilaçlarıyla sinerjistik etkisinin incelenmesi	71
4.4.	HPLC Analizleri.....	73
4.5.	Sonuçlar ve Öneriler.....	75
5.	KAYNAKÇA.....	77
6.	EKLER	85
	EK A. HPLC Standart kalibrasyon eğrileri	85
	ÖZGEÇMİŞ.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Farklı denizhiyari tiplerinin medikal olarak önemli bileşikleri	13
Çizelge 1.2. Anti-kanser aktiviteye neden olan denizhiyari bileşiklerinin etki şekilleri (Wargestia ve Widodo 2017'ye göre düzenlenmiştir).....	19
Çizelge 3.1.1. HSM ve HSA özütlerinin A549 hücre hattı üzerinde belirlenen IC ₅₀ (mg/ml) değerleri.....	37
Çizelge 3.1.2. HSM ve HSA özütlerinin PC-3 hücre hattı üzerinde belirlenen IC ₅₀ (mg/ml) değerleri	46
Çizelge 3.1.3. A549 hücre hattı üzerinde HSM özütünün cisplatin ve docetaxel ile etkileşimlerinin hesaplanması	53
Çizelge 3.1.4 Cisplatin ve Docetaxel ilaçlarının A549 hücre hattı üzerinde belirlenen IC ₅₀ değerleri.....	55
Çizelge 3.1.5. A549 hücre hattı üzerinde HSA özütü ile cisplatin ve docetaxel etkileşimlerinin hesaplanması	56
Çizelge 3.1.6. PC-3 hücre hattı üzerinde HSM özütünün Cisplatin ve Docetaxel ile etkileşimlerinin hesaplanması	58
Çizelge 3.1.7. Cisplatin ve Docetaxel ilaçlarının PC-3 hücre hattı üzerinde belirlenen IC ₅₀ (µM) değerleri	60
Çizelge 3.1.8. PC-3 hücre hattı üzerinde HSA özütü ile Cisplatin ve Docetaxel etkileşimlerinin hesaplanması	60
Çizelge 3.1.9. Standart Kromatogram.....	61
Çizelge 3.10. HSM kromatogram sonuçları.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kanserin klonal başlangıcı.....	4
Şekil 1.2. Kanserin nedenleri	4
Şekil 1.3. H. Sanctori	9
Şekil 1.4. Apoptozda gerçekleşen morfolojik değişimler	15
Şekil 1.5. Apoozun aşamaları	16
Şekil 1.6 Denizhiyari bileşiklerinin hücre döngüsü, hücre proliferasyonu ve apoptoz yolakları.....	17
Şekil 3.1. 20, 10, 5, 2,5, 1,25 ve 0,6 mg/ml HSA özütünün 24-48-72 saat inkübasyonları sonrasında A549 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi.	31
Şekil 3.2. Farklı dozlardaki HSA özütüne 24 saat maruz kalan A549 hücrelerinin faz-kontrast mikroskopu altındaki görünümü (x40 büyütme).....	31
Şekil 3.3. Farklı dozlardaki HSA özütüne 48 saat maruz kalan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	32
Şekil 3.4. Farklı dozlardaki HSA özütüne 72 saat maruz kalan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	33
Şekil 3.5. HSM özütünün farklı konsantrasyonlar ile A549 hücre hattı üzerinde doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi.....	34
Şekil 3.6. Farklı dozlardaki HSM özütüne 24 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	35
Şekil 3.7. Farklı dozlardaki HSM özütüne 48 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	36
Şekil 3.8. Farklı dozlardaki HSM özütüne 72 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	37
Şekil 3.9. HSA özütünün farklı konsantrasyonlar ile PC-3 hücre hattı üzerinde doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi.....	39
Şekil 3.10. Farklı dozlardaki HSA özütüne 24 saat maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	39
Şekil 3.11. Farklı dozlardaki HSA özütüne 48 saat maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	40
Şekil 3.12. Farklı dozlardaki HSA özütüne 72 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	41
Şekil 3.13. HSM özütünün farklı konsantrasyonlar ile PC-3 hücre hattı üzerinde doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi.....	42
Şekil 3.14. Farklı dozlardaki HSM özütüne 24 saat maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	43
Şekil 3.15. Farklı dozlardaki HSM özütüne 48 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	44
Şekil 3.16. Farklı dozlardaki HSM özütüne 72 saat maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme).....	45
Şekil 3.17. HSM özütünün HEK293 sağlıklı hücre hattı üzerindeki doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi.....	46
Şekil 3.18. HSA özütünün HEK293 sağlıklı hücre hattı üzerindeki doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi.....	47

Şekil 3.19. Farklı konsantrasyonlardaki HSM özütünün A549 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerinin flow sitometri analizi	48
Şekil 3.20. Farklı konsantrasyonlardaki HSM özütünün PC-3 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerinin flow sitometri analizi	49
Şekil 3.21. 15 mg/ml HSM özütü ile muamele edilen A549 ve PC-3 hücre hattında kaspaz-3 aktivite	50
Şekil 3.22. 24 saat inkübasyon sonrası HSM özütünün cisplatin ile A549 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi	52
Şekil 3.23. 24 saat inkübasyon sonrası HSM özütünün docetaxel ile A549 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi	53
Şekil 3.24. 24 saat inkübasyon sonrası HSA özütünün cisplatin ile A549 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi	54
Şekil 3.25. 24 saat inkübasyon sonrası HSA özütünün docetaxel ile A549 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi	55
Şekil 3.26. 24 saat inkübasyon sonrası HSM özütünün cisplatin ile PC-3 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi	57
Şekil 3.27. 24 saat inkübasyon sonrası HSM özütünün docetaxel ile PC-3 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi	58
Şekil 3.28. 24 saat inkübasyon sonrası HSA özütünün cisplatin ile PC-3 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi	59
Şekil 3.29. 24 saat inkübasyon sonrası HSA özütünün docetaxel ile PC-3 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi	60
Şekil 3.30. Standartların HPLC kromatogram yerleri	63
Şekil 3.31. HSM özütünün HPLC kromatogramı	63

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

µl: Mikrolitre

A549: Akciğer adenokarsinoma

CO₂: Karbondioksit

DMSO: Dimetil sulfoksit

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FBS: Fetal Bovine Serum

FITC: Floresan izotiyosiyanat

HEK293: Embriyonik böbrek hücre

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HTA: *Holothuria sanctori* aseton özütü

HTM: *Holothuria sanctori* metanol özütü

IC₅₀: %50 öldürücü konsantrasyon

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi

PC-3: Prostat adenokarsinoma

RPM: Dakikada dönüş sayısı

RPMI: Rosewell Park Memorial Institute

1. GİRİŞ

1.1. Konu ve Kapsam

Dünyadaki başlıca sağlık problemlerinin başında gelen hastalıklardan birisi kanserdir. Kanser istatistiklerine göre, günümüzdeki ölümlerin sekizde biri kanserdendir ve önümüzdeki yıllarda bunun kalp krizi ölümlerini geçeceği bilinmektedir (Bharathi vd., 2011; Catherine vd., 2007). Kanser vücuttaki hücrelerin anormal büyümesidir. Anormal büyüyen kanser hücrelerinin diğer dokulara invazyonu ve normal hücreleri yok etmesi söz konusudur. Vücudun dengesini bozan kanser hücrelerinin yok edilmesi için kanser araştırmaları üzerine milyonlarca dolar harcanmaktadır. Bazı kanser tiplerini tedavisi için çeşitli ilaçlar ticari olarak mevcuttur fakat henüz hiçbir ilaç tam etkili ve güvenli değildir. Kanser kemoterapisindeki temel problem geliştirilen ilaçların toksik etkisidir. Etkili bir alternatif strateji geliştirilmesindeki amaç kimyasal ilaçların sistemik toksisitesini azaltmak buna karşın tedavi etkisini arttırmaktır. Bunun için girişimlerin çoğu anti-kanser ilaçlarla kombinasyonunda sinerjistik etkili olan besin kaynaklarının ve fitoterapik ajanların araştırılmasına yönelmiştir.

Bitki veya denizel organizmalardan elde edilen özütlerin geleneksel kemoteröpatik ajanlarla kombinasyonu kanser tedavisinde etkiyi arttıran buna karşın normal dokulara karşı toksisiteyi azaltan yeni bir yaklaşım olabilir. Bu organizmalar biyoaktif moleküllerin kompleks karışımını içerebilirler. Örneğin, genistein, lycopene, β -karoten, momordin, betanin, hesperadin, morin, allicin, piperine, capsaicin bitkilerden elde edilen aktif içeriklerdir. Günümüzde onaylanan kanser ilaçlarının %60'ı doğal orijinlidir. Deniz hayvanları ve bitkilerde bulunan doğal ürünler anti-mutajenik ve anti-kanserojenik olarak rol oynarlar (Rajasekaran vd., 2008). Yaklaşık 14000 farmakolojik olarak aktif bileşikler denizel, bitkisel ve hayvansal organizmalardan elde edilmiştir.

Denizel çevre yeni anti-kanser ilaçlarının geliştirilmesi için yeni bileşiklerin keşfi bakımından zengin bir kaynaktır (Adrian, 2007). ABD Ulusal Kanser Araştırma

Kurumunun yaptığı farmakolojik aktivite araştırmasına göre denizel türlerin %4'ünün anti-tümör bileşikleri içerdiği bulunmuştur.

Denizhiyarları besinsel olarak zengin derin deniz türleridir ve yüzyıllarca Kore, Japonya, Endonezya ve Çin'de anti-inflamatör ajan ve hastalıklara karşı etkili bir besin kaynağı olarak kullanılmıştır (Kelly vd., 2005; Aydın vd., 2011). Deniz hiyarları vitaminler, mineraller, cerebrositler ve peptidler içerdikleri gibi triterpen glikosid bileşikler, glikozamino glikanlar ve kondrosit sülfat gibi pek çok özel molekül içerirler. Bu bileşiklerin anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-anjiyogenik, anti-inflamatör ve anti-tümör etkileri olduğu gösterilmiştir (Tian vd., 2005; Althunibat vd., 2009; Janakiram vd., 2010; Janakiram vd., 2015 A). Özellikle, glikozaminoglikanlar, fondanol A5, monosülfat pentaosidler ve triterpenglikozidler gibi biyoaktif moleküllerin doğal immüneyi arttırdığı gösterilmiştir (Janakiram, 2015 B). Buna ilave olarak, denizhiyarlarından elde edilen bileşiklerin anti-tümör etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak pek çok çalışmada gösterilmiştir (Wong, 2011; Aminin vd., 2015; Wargestia ve Widodo, 2017).

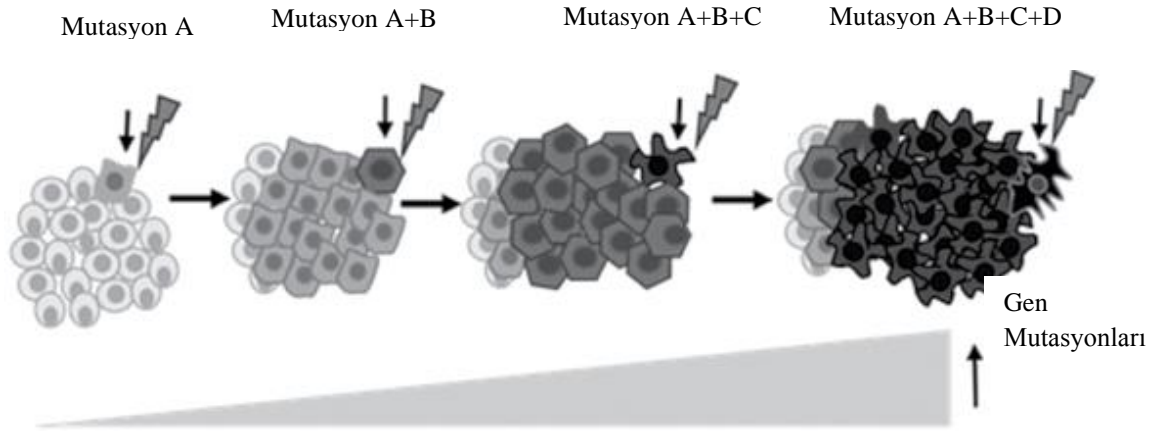
1.2. Amaç

Denizhiyarlarından biyoaktif bileşiklerin izolasyonu ve kullanımı onların anti-inflamatör ve anti-tümör özelliklerini belirlemek ve kanser gibi pek çok hastalıkları önleme ve tedavi etmedeki uygulamaları nedeniyle gün geçtikçe artmaktadır. Deniz hiyarlarından elde edilen bileşikler doğal orijinli, besin olarak uzun süredir kullanılmaları nedeniyle tercih edilmektedirler. Denizhiyarı özütleri uzun süredir besin ve tıbbi amaçlar için kullanılmalarına rağmen onların tam fonksiyonları detaylı olarak henüz çalışılmamıştır. Buna ilave olarak, ülkemizin denizhiyarlarının anti-tümör etkileri üzerinde henüz yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki bilgiler, farklı coğrafik bölgelerden ve farklı denizhiyarı türlerinden yeni anti-kanser bileşiklerin tanımlanması için önemli bir potansiyel bulunduğunu göstermektedir. Bu nedenle, bu çalışmada, Gökova körfezinden toplanan *Holothuria sanctori* türünden elde edilen özütlerin anti-tümör etkilerinin çeşitli kanser hücreleri üzerinde etkisinin araştırılması ve bu özütlerin kullanımda olan ticari kanser ilaçları (cisplatin, docetaxel) ile sinerjistik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.3. Kanser

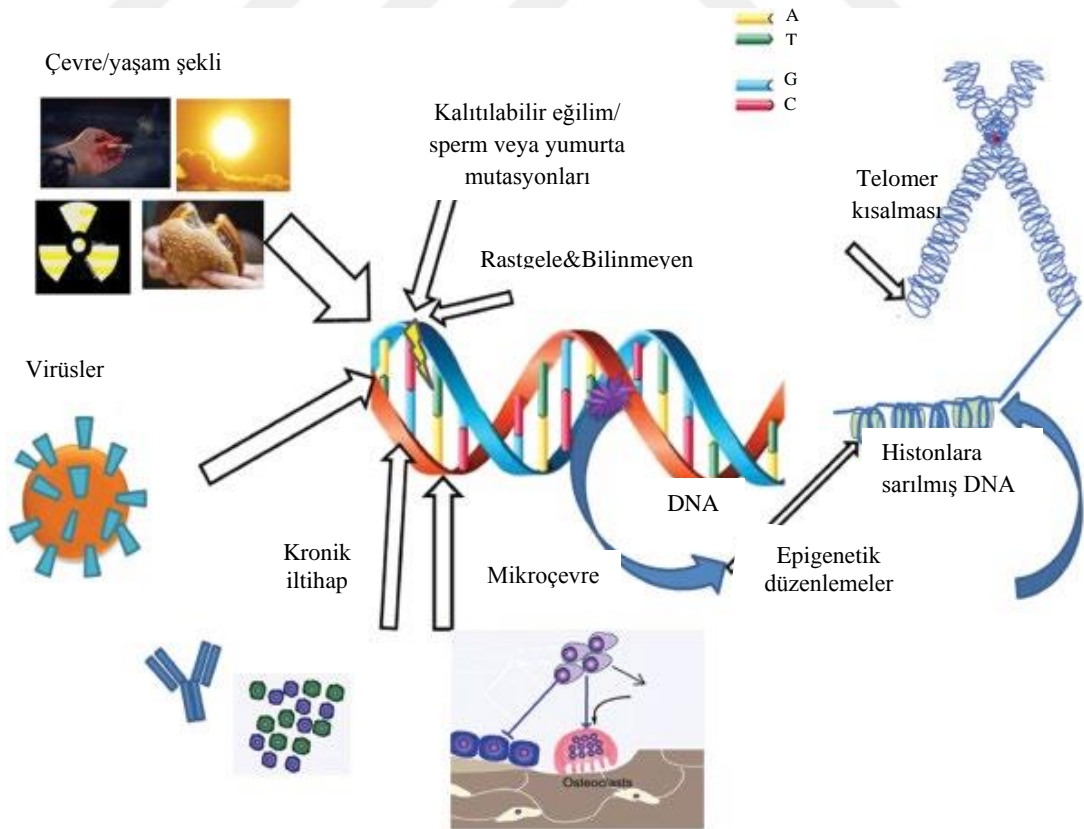
Çok hücreli organizmaları oluşturan hücreler, aralarında bulunan güçlü sinyal ağı sayesinde eşgüdümlü olarak hareket etmeye meyillidir. Dolayısıyla her bir hücre gerektiği şekilde ve zamanda bölünür, dinlenir, farklılaşır veya ölecek organizmanın devamlılığını sağlar. Ancak 10^{14} 'ten fazla sayıda hücre içeren insanda bir günde milyarlarca mutasyonla karşılaşabilir. Bu mutasyonların içinde ise en tehlikeli olanı bir hücrenin diğer hücrelerden daha hızlı bölünmesini sağlayacak bir üstünlüğe neden olan mutasyonlardır. Bu tip hücreler çoğalarak mutant bir klon oluşturur ve sonunda bulunduğu hücre topluluğunun tümünü yok eden hastalık olan kanserin ortaya çıkmasına neden olur. Kanseri, hücre bölünmesindeki senkronizasyona karşı koyarak sürekli çoğalan ve bu sürekli çoğalan kontrolsüz hücrelerin diğer hücrelerin alanlarına yayılması ve yerleşmesidir. Bir tümörün kanser olarak nitelendirilebilmesi için dokuyu istila etmiş olması gerekmektedir. Kanserin istila yeteneği kazanarak vücudun diğer bölgelerinde ikinci tümörler oluşturmaya metastaz denir. Metastaz yapmaları nedeniyle de cerrahi olarak tamamen yok edilmeleri zordur.

Kanserin başlangıcı tek bir somatik hücrede meydana gelen mutasyondur. Fakat mutasyona uğrayan hücrenin sonraki nesillerinin birçok mutasyona daha uğraması sonucunda kanser ortaya çıkar (Şekil 1.1). Kanserin ortaya çıkması genellikle uzun bir süreç olup, çoğaldıkça ona üstünlük sağlayacak yeni özellikler biriktirir. Bu özellikler; hücre çoğalmasını düzenleyen sinyallerden kaçma, apoptozdan kaçma, yaşlanmadan ve farklılaşmadan kaçma, köken aldıkları dokulardan kaçarak farklı dokulara metastaz yapmalarıdır. Farklı kanser tipleri bu özelliklerin farklı kombinasyonlarını birlikte içerir.



Şekil 1.1. Kanserın klonal başlangıcı. Kanser mutasyona uğrayan tek bir anormal hücreden köken alır. Her yeni mutasyon ve seçilimde malignant ve ölümcül olmaya yaklaşır. Bu süreç birkaç aydan birkaç yıla kadar sürebilir (Stein ve Luebbbers, 2019).

Kanserın gelişimi genetik ve çevresel birçok faktöre bağlıdır (Şekil 1.2). Farklı ülkelerde kanser oranlarının araştırılması sonucunda çevresel koşullara ve yaşam şekline bağlı olarak kanserden % 80-90 oranında kaçınılabileceği tahmin edilmektedir. Bu nedenle kanserin görülme oranını arttıran tütün, hepatitB, papilloma virüsü, radyasyon ve kimyasal karsinojenler gibi çevresel risk etmenlerinden kaçınılmalıdır.



Şekil 1.2. Kanserın nedenleri. (Stein ve Luebbbers, 2019).

1.3.1. Kanser tipleri ve tedavi yöntemleri

Kanser tüm somatik hücrelerde gelişebilen bir hastalıktır. Köken aldıkları ve çoğalma gösterdikleri dokuların çeşitlerine göre isimlendirilirler ve birçok çeşidi vardır. Meme kanseri, prostat kanseri, gastrointestinal kanser, akciğer kanseri, lösemi, lenfoma, miyeloma, karaciğer kanseri, jinekolojik kanserler, testis kanseri, baş-boyun kanseri, beyin ve omurilik kanserleri, tiroid kanseri, böbrek ve idrar kesesi kanserleri olmak üzere çeşitlenmektedir. Bu hastalıkların klinik tedavisinde radyasyon tedavisi, kemoterapi, gen terapisi ve tamamlayıcı alternatif tıp teknikleri kullanılmaktadır (Stein ve Luebbers, 2019). Radyasyon tedavisinde; Yüksek dozlarda radyasyon terapisi kanser hücrelerini öldürür veya DNA'larına zarar vererek büyümelerini yavaşlatır. DNA'sı onarılamayacak kadar hasar görmüş kanser hücreleri, bölünmeyi veya ölmeyi durdurur. Hasarlı hücreler öldüğünde, vücut tarafından parçalanır ve çıkarılır (www.cancer.gov). Kemoterapi; kanser hücrelerini yok etmek için anti-kanser ilaçlarını kullanan bir tedavi yöntemidir. Kanser hücrelerinin bölünme ve büyüme kabiliyetine müdahale ederek çalışır. Kemoterapide kullanılan ilaçlar hızlı büyüme eğiliminde olan kanser hücrelerini hedef alır. Farklı kemoterapi ilaçları farklı şekillerde çalışırlar ve sıklıkla ilaç kombinasyonları şeklinde kullanılır (Devita ve Chu, 2008). İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasına yardımcı olan bir tür biyolojik terapidir. Kanser tedavisinde kullanılan bu yöntemlerin herbiri farklı dezavantajlara sahiptir. Radyasyon tedavisinin tümörü çevreleyen dokuya zarar vermesi, tüm kanser türlerine etki etmemesi, yeterince oksijen bulunmayan bölgelere etki etmemesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Kemoterapide kullanılan ilaçlar hızlı büyüme eğiliminde olan kanser hücrelerini hedef aldığından, hızlı büyüyen normal, sağlıklı hücreleri de etkileyebilirler. İmmün reaksiyonların bazıları tedavinin uzamasına, kalıcı organ hasarına veya ölüme bile neden olurken; bu yan etkiler sıklıkla tedavinin kesilmesine neden olur ve daha sonraki tedavi seçeneklerini sınırlar (Stein ve Luebbers, 2019).

Klinik tedavi yöntemlerinin dezavantajlarından dolayı alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Kanser tedavisindeki temel problem, geliştirilen ilaçların toksik etkisidir. Etkili bir alternatif strateji geliştirilmesindeki amaç kimyasal ilaçların sistemik toksisitesini azaltmak, buna karşın tedavi etkisini arttırmaktır. Bunun için girişimlerin çoğu anti-kanser ilaçlarla kombinasyonda

sinerjistik etkili olan besin kaynaklarının ve fitoterapi ajanların araştırılmasına yönelmiştir.

1.3.2. Kanserın alternatif tedavisinde kullanılan denizel organizmalar

Günümüzde tek başına kemoterapi ya da ameliyat ve radyoterapi kombinasyonu ile birlikte yapılan tedaviler kanser tedavisine geleneksel yaklaşımlardır. Buna karşın, geleneksel yöntemlerle tedavi pıhtı oluşumu, kusma, saç kaybı ve endometriosis gibi komplikasyonlara yol açmaktadır (Wang vd., 2005). Pek çok durumda cisplatin ve docetaxel kanser tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Hem cisplatin hem de docetaxel ovaryum, mesane, akciğer, prostat ve meme kanserlerinde çok etkilidir. Cisplatin ve docetaxel in çeşitli kanser hücreleri üzerinde antikanser etkilerine dayanarak, kombinasyonel kemoterapi yaklaşımları kanseri tedavi etmek için kullanılmaktadır. Buna rağmen tek başına kemoteröpatik ilaçlar veya kombinasyonları ile yapılan tedaviler nefrotoksisite, periferel toksisite ve kardiyo toksisiteyi içeren yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, yüksek etkili ve düşük toksisiteli yeni kombinasyon tedavileri gereklidir (Kanadaswami vd., 2005; Ranjt vd., 2012). Bu bağlamda günümüzdeki araştırmalar, kansere karşı, kimyasal önleyici aktivitesi olan bitkisel ve denizel organizmalardan izole edilen bileşikler üzerine odaklanmıştır.

Günümüzde onaylanan kanser ilaçlarının %60'ı doğal orijinlidir. Deniz hayvanları ve bitkilerde bulunan doğal ürünler anti-mutajenik ve anti-kanserojenik olarak rol oynarlar (Rajasekaran vd., 2008). Yaklaşık 14000 farmakolojik olarak aktif bileşikler denizel, bitkisel ve hayvansal organizmalardan elde edilmiştir. Denizel çevre yeni anti-kanser ilaçlarının geliştirilmesi için yeni bileşiklerin keşfi bakımından zengin bir kaynaktır (Adrian, 2007). ABD Ulusal Kanser Araştırma Kurumunun yaptığı farmakolojik aktivite araştırmasına göre denizel türlerin %4'ünün anti-tümör bileşikleri içerdiği bulunmuştur.

Denizel organizmalar yeni kanser ajanlarının geliştirilmesinde önemli bir potansiyele sahiptirler ve dünyadaki toplam çeşitliliğin yaklaşık yarısını oluşturmaktadırlar (Hussain vd., 2012). 45-50 yıl önce güvenilir tüplü dalış tekniklerinin geliştirilmesinden önce, denizel organizmalarının koleksiyonu tüpsüz dalış ile elde edilenlerle sınırlı kalmaktaydı. Sonraları yaklaşık 3 metre ile 40 metre arasındaki derinliklere ulaşmak rutin hale gelmiştir ve denizel ortam yeni biyoaktif ajanların bir kaynağı olarak gün geçtikçe artan bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır (Cragg ve

Newman, 2013). Yeni biyolojik olarak aktif ajanların kaynağı olarak denizel çevrenin sistematik olarak araştırılması ciddi şekilde 1970'lerin ortalarında başlatılmıştır. 1977-1987 yılları arasındaki on yıl boyunca, çeşitli denizel organizmalarından yaklaşık 2,500 yeni metabolit bildirilmiştir (Faulkner, 2000). Bir seri halinde devam eden ve 2014 yılına ait yayınları kapsayan derlemenin sonucunda, denizel organizma kaynaklı 1378 yeni doğal deniz ürünü bileşik, bu bileşiklerin ilgili biyolojik etkinlikleri, kaynak organizmaları ve menşei ülkeleri bildirilmiştir (Blunt vd., 2016). Denizel bitki ve hayvanlardan izole edilen yaklaşık 14.000 farmakolojik olarak aktif bileşik, bu çevrenin muazzam bir çeşitliliğe sahip olduğuna işaret etmektedir.

Denizel organizmalar, doğal ürünler için zengin bir kaynaktır ve bu organizmalardan türetilen birçok bileşik, hem yapı aydınlatılması ve sentez için önemli potansiyele sahip olduklarından hem de sitotoksik özellikleri açısından ilgi uyandırmaktadırlar (Da Rocha vd., 2001). Zengin biyoçeşitlilik nedeniyle, denizel organizmalar, biyolojik açıdan aktif bileşenlerin özellikle biyoaktif peptidler, antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve anti-kanser ajanların yeni rezervuarlarını temsil etmelerinin yanı sıra değerli besleyici gıda kaynaklarıdır (Bordbar vd., 2011). Doğal ürünler, değerli bir savunma mekanizması olan ve hücre hacminin azaltılması, membran kabarcıklanması, DNA fragmentasyonu ve kaspaz aktivasyonu gibi bariz özelliklerle karakterize olan apoptozu indükleyerek kemoterapötik ajanlar olarak önemli bir fonksiyon gösterirler (Bahahara vd., 2016).

Deniz hıyarları besinsel olarak zengin derin deniz türleridir ve yüzyıllarca Kore, Japonya, Endonezya ve Çin'de anti-inflamatör ajan ve hastalıklara karşı etkili bir besin kaynağı olarak kullanılmıştır (Kelly vd., 2005; Aydın vd., 2011). Denizhıyarları vitaminler, mineraller, cerebrositler ve peptidler içerdikleri gibi triterpen glikosid bileşikler, glikozamino glikanlar ve kondrosit sülfat gibi pek çok özel molekül içerirler. Bu bileşiklerin anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-anjiyogenik, anti-inflamatör ve anti-tümör etkileri olduğu gösterilmiştir (Tian vd., 2005; Althunibat vd., 2009; Janakiram vd., 2010; Janakiram vd., 2015 A). Özellikle, glikozaminoglikanlar, fondanol A5, monosülfat pentaosidler ve triterpenglikozidler gibi biyoaktif moleküllerin doğal immüneyi arttırdığı gösterilmiştir (Janakiram, 2015 B). Buna ilave olarak, denizhıyarlarından elde edilen bileşiklerin anti-tümör etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak pek çok çalışmada gösterilmiştir.

1.4. *Holothuria (Platyperona) sanctori*' nin Taksonomisi ve Ülkemizdeki Dağılımı

Holothuriidae ailesinin Holothuroidea sınıfında 185 tür bulunmaktadır. Yaygın olarak Akdeniz ve Atlantik okyanusunda dağılım gösterir. Akdeniz'de bilinen 5 takım 9 familyaya ait 37 tür bulunmaktadır (Fischer vd., 1987). Ülkemiz denizlerinde Holothuroidea ile ilgili yapılan çalışmalarda: Öztoprak ve ark (2014) 22 tür; Aydın (2015), ise tüm denizlerimizde 8 tür tespit etmiştir. *Holothuria sanctori*'ye ait sistematik bilgileri aşağıda verilmiştir.

Alem: Animalia

Şube: Echinodermata

Sınıf: Holothuroidea

Takım: Aspidochirotida

Aile: Holothuriidae

Cins: *Holothuria*

Tür: *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Delle Chiaje, 1823)

Türkiye'de ihracatı 1996 yılında başlarken, en fazla ticareti yapılan ve denizlerimizde yetişen Holothuroidea türleri *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata* ve *Stichopus regalis*'dir (Aydın, 2015). Ülkemizde besin maddesi olarak tüketilmemekle birlikte, tıbbi kullanımına ek olarak afrodisyak özelliğinden dolayı oldukça talep görmektedir (Aydın vd., 2011). Denizhıyarlarının ülkemizde kullanımı olta balıkçılığında yem olmasından ibarettir.

Holothuria sanctori türü ülkemizde; Marmara Denizi, Ege Denizi ve Akdeniz'de kayalık bölgelerde bulunan bir türdür. Cuvier organları sayesinde tehlike durumlarında oldukça yapışkan olan ağ şeklinde bir salgı salgırlar. Bu nedenle avcılar tarafından toplanması zor bir türdür. Ticari değeri olmasına rağmen *Holothuria sanctori* yayılımının ülkemizde az olmasından ve salgılarından dolayı toplanması tercih edilmez. Bu türün baskın rengi kahverengi olup üzerinde boyuna dizilmiş sarı renkli ortaları kahverengi konik şekilli papillalar bulunması sayesinde diğer türlerden ayırt edilir (Şekil 1.3) (Aydın, 2013; 2016).



Şekil 1.3. H. Sanctori (Aydın, 2016)

1.5. Denizhıyarlarının Genel Özellikleri

Denizhıyarları veya ülkemizde bilinen diğer adıyla deniz patlıcanları denizel kökenli doğal kaynaklardan biridir. Holothuroidea sınıfına (Phylum: Echinodermata) ait deniz hıyarları veya diğer bir deyişle holothurianlar, deniz yıldızları, deniz kestaneleri ve deniz laleleri ile filogenetik olarak akraba olan ekinodermeldir (Aminin vd., 2015). Ayrıca, Dendrochirotida, Aspidochirotida ve Apodaca olmak üzere üç alt sınıfa ayrılmıştır. Bu alt sınıfların altında Aspidochirotida, Apodida, Dactylochirotida, Dendrochirotida, Elasipodida ve Molpadiida olmak üzere altı takım bulunmaktadır. Denizel ekosistemin önemli bir bileşeni olan deniz hıyarları, dünyadaki tüm okyanuslarda dağılış göstermekle birlikte daha çok ılık sığ sularda mercan, kayalar veya deniz yosunu yakınlarında yayılış gösterirler (Bordbar vd., 2011). Bu omurgasız canlılar doğal olarak dünyanın bentik bölgelerinde ve derin denizlerinde de bulunmaktadır. Kayış gibi ciltleri ve uzunlamasına bir vücutları bulunan deniz hıyarlarının çoğu yumuşak gövdeli salatalıklar gibi şekillenmektedir. Anatomi ve dağılım açısından, deniz hıyarlarının uzunluğunun normal olarak 10-30 cm arasında olduğu ancak sadece 3 mm uzunluğunda bazı küçük türler ve en büyüğü 1 m'ye ulaşan bireyler de mevcuttur. Beslenme amacıyla dokunaçlarını kullanan deniz hıyarlarının deniz dibinde çökelti halinde bulunan ölü organik madde ya da atıklarla beslendiklerinden doğal dönüşümün bir parçası olarak da görev aldığı bilinmektedir (Aydın, 2016). Besince zengin olan denizhıyarlarının bazıları yenilebilirdir ve pek çok ülkede lezzetli bir gıda olarak yerlerini aldıklarından, ticari öneme sahiptirler ve yoğun olarak toplanırlar. Besinsel olarak etkileyici bir profile sahip olan denizhıyarları; A, B1 (Tiamin), B2 (Riboflavin), B3 (Niasin) vitaminleri

ve özellikle kalsiyum, magnezyum, demir ve çinko gibi mineraller bakımından zengindir (Bordbar vd., 2011). Denizhiyarlarından elde edilen birincil ürün haşlanmış ve kurutulmuş olan vücut duvarı veya başka deyişle bêche-de-mer dir. Denizhiyarı türlerinin avlanmasında geçerli bir yönetim sistemi veya kısıtlama bulunmamaktadır. Artan talep ve pazar payından dolayı kültüre alınmaktadırlar. Kurutulmuş denizhiyarları, özellikle Asya pazarlarında (ana firması Çin'de), bunu takiben Kore, Endonezya ve ardından Japonya'da ticari olarak satılmaktadır. Öte yandan, Amerika Birleşik Devletleri ve Kuzey Avustralya'nın bazı bölgelerine de önemli miktarlarda ihraç edilmektedirler (Bordbar vd., 2011). Yüksek ekonomik değere sahip yenilebilir denizhiyarları arasında Holothuria, Muellaria ve Stichopus cinsleri sayılabilir (Ridhowati vd., 2014).

Diğer birçok deniz organizması gibi ekinodermiler de biyolojik olarak aktif bileşikler ve biyomedikal uygulamalara kaynak olarak incelenmiştir. Besinsel değerinin yanında, denizhiyarları yüzyıllarca Kore, Japonya, Endonezya ve Çin'de anti-inflamatör ajan ve hastalıklara karşı etkili bir besin kaynağı olarak kullanılmıştır (Kelly vd., 2005; Mehmet A vd., 2011). Denizhiyarları vitaminler, mineraller, cerebrositler ve peptidler içerdikleri gibi triterpen glikosid bileşikler, glikozamino glikanlar ve kondrosit sülfat gibi pek çok özel molekül içerirler. Bu bileşiklerin anti-mikrobiyal, anti-oksidant, anti-anjiyogenik, anti-inflamatör ve anti-tümör etkileri olduğu gösterilmiştir (Tian vd., 2005; Althunibat vd., 2009; Janakiram vd., 2010; Janakiram vd., 2015 A). Özellikle, glikozaminoglikanlar, fondanol A5, monosülfat pentaosidler ve triterpen glikozidler gibi biyoaktif moleküllerin doğal immüniteyi arttırdığı gösterilmiştir (Janakiram, 2015 B). Buna ilave olarak, denizhiyarlarından elde edilen bileşiklerin anti-tümör etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak pek çok çalışmada gösterilmiştir (Çizelge 1.1). Ekinodermilerden elde edilen biyoaktif bileşenler; triterpen glikozidler, glikozaminoglukanlar: kondroitin sülfat, nörojenik gangliyositler, anti-mikrobiyal etki gösterenler, lektinler, opsoninler, analjezikler ve anti-tumor etkiye sahip dallanmış yağ asitleridir.

1.5.1. Triterpen glikozitler

Triterpenler genellikle yüksek yapılı bitkiler tarafından sentezlenir. Triterpenler ve bir grup bitki steroidleri genel olarak membran proteinlerinin çözünürlüğünü

etkileyen saponinler (glikosidik yüzey aktif cisimleri) olarak sınıflandırılır. Bitki saponinlerinin en çok bilinen toksik etkisi kırmızı kan hücrelerinin membranlarının bozulması sonucunda hemolize neden olmasıdır. Kutupsal, ılıman ve tropik bölgelerden denizhıyarlarından izole edilmiş yeni triterpen glikozidlerin, insan tümör hücreleri üzerinde sitotoksositeye, virüsidal, antiviral , antifungal aktiviteye ve hemolize neden olduğu belirlenmiştir (Rodriguez vd., 1991; Murray vd., 2001; Kalinin vd., 1996; Marier vd., 2001;.Zou vd., 2003).

1.5.2. Glukozaminoglikanlar: Kondroitin sülfat

Glikozaminoglikanlar (GAG'ler), glukozamin veya galaktozamin amino şekerlerinin türevlerini içeren asidik disakkaritlerin polimerleridir. Sülfatlanmış polisakaritler, omurgalı dokularında bol miktarda bulunur ve bazı omurgasız türleri, yeni bir sülfatlanmış GAG kaynağıdır. Antikoagülan ve antitrombotik özellik göstermeleri, sülfatlanmış polisakaritlerin en çok çalışılan özellikleridir. Heparin alerjisi ve direnç oluşumu nedeniyle, heparinin yerini alacak bir ajan önemlidir. Son yıllarda, denizhıyarlarının vücut duvarlarından elde edilmiş sülfatlanmış polisakaritler olan fukosillenmiş kondroitin sülfatlar (FucCS) heparinin yapısal analogudur. Bu nedenle memeli sistemlerindeki olası etkileri incelenmiş ve FucCS'un kan damarlarının çoğalmasını teşvik ettiği ve ayrıca venöz ve arteriyel trombozun önlenmesine yardımcı olduğu belirlenmiştir (Tapon-Bretoniere vd., 2002). Bazı çalışmalarda ise denizhıyarlarından elde edilen FuCS'un antikoagülant aktivite gösterdiği ve bu sayede antitrombotik tedavide kullanılabileceği rapor edilmiştir (Mourao vd., 1996; Mourao ve Pereira, 1999; Li vd., 2000). Romatizma tedavisinde ve eklemlerin sağlıklı olmasında kullanılan denizhıyarı kondroitin sülfat içeren ürünler, günümüzde doğal ürün satış yerlerinden elde edilebilmektedir (Natural Products website, 2004, <http://www.psoriasis.com/seacucumber.html>).

1.5.3. Nörojenik gangliyositler

Sfingolipitler, ana yapının gliserol yerine sfingosin olduğu yapısal lipitlerdir. Glikosfingolipitler (GSL'ler) en az bir monosakarit rezudisi ihtiva eder ve bunlar tüm hayvanların ve bazı bitki hücrelerinin plazma zarlarında bulunur. Eğer Sialik asit (N-asetil neuraminik asit) bulundurlarsa, bu bileşikler gangliosidler olarak adlandırılır.

Gangliositler, sinir sistemindeki çok yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Biyolojik olarak aktif gangliositlerin denizyıldızından elde edildiği bilinmektedir (Higuchi vd., 1991). Ancak günümüzde *Stichopus japonicus* ve *Holothuria* türleri gibi denizhıyarlarından elde edilen nörojenik gangliositler de bulunmaktadır (Yamada vd., 2001; Kaneko vd., 2003).

1.5.4. Antimikrobiyal aktivite gösteren bileşikler

Yapılan bazı çalışmalar ekinodermilerin yeni antibiyotik kaynağı olabileceğini göstermektedir. Haug vd. (2002) yaptıkları çalışmada, Hindistan'ın Tamil Nadu kıyılarından elde ettikleri *Holothuria* cinsi denizhıyarların alkol özütlerinin antibakteriyel ve antifungal aktiviteye yol açtığını göstermiştir. *Actinopyga miliaris*, *Holothuria atra* ve *Holothuria scabra* türlerine ait denizhıyarlarına ait özütlerin *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ve *Vibrio harveyi* bakterilerini farklı seviyelerde inhibe ettiği belirlenmiştir (Abraham vd., 2002).

1.5.5. Diğer bileşikler

Dallanmış zincirli yağ asitlerinin farklı tümör hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Denizhıyarından elde edilen dallanmış zincirli yağ asidi olan 12-metiltetradekanoik asit (12-MTA)'nın, prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını apoptoz yolu ile inhibe ettiği belirlenmiştir (Yang vd., 2003). Bu bileşiğin prostat kanserinin tedavisinde ek bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. Lektinler, monosakkarit ve oligosakkaritlere spesifik bağlanma bölgelerine sahip olan proteinlerdir. Denizhıyarlarından farede indüklenen kanser hücrelerine ve insan akciğer kanseri hücrelerine karşı sitotoksikite gösteren bir lektin izole edilmiştir (Gana ve Merca, 2002). Oponinler birçok patojenin yüzeyine bağlanan ve fagositoz için işaretlenmelerini sağlayan proteinlerdir. Xing ve Chia (2000), *Holothuria leucospilota* denizhıyarının koleomik sıvısından oponon benzeri yeni bir molekül elde etmişlerdir. Yaacob vd., (1994) Malezya da bir deniz hıyarının su ile hazırlanmış özütünden nispeten uzun etki süresine sahip bir analjezik aktivite belirlemişlerdir. Migas ve Klemenchenko (1990), *Stichopus japonicus*' un vücut

duvarından elde edilen sulu/etanolik özütlerin sıçan mide hücrelerinde ülseri engelleyici etki gösterdiğini belirlemiştir.

Çizelge 1.1. Farklı denizhiyari tiplerinin medikal olarak önemli bileşikleri (Bordbar vd., 2011)

Biyoaktif Bileşikler	Denizhiyari çeşitleri
Triterpen glikozit (Saponin)	<i>Pentaca quadrangularis, Holothuria atra, Actinopyga echinites, Bohadschia subrubra, Pearsonothuria graeffei (Holothuria forskali), Psolus patagonicus, Mensamria intercedens, Thelenota ananas, Holothuria fuscocinerea, Holothuria nobilis, Holothuria hilla, Holothuria impatiens, Cucumaria frondosa, Holothuria leucospilota</i>
Sülfatlı iterpen glikozit	<i>Hemoiedema spectabilis, Cucumaria japonica, Staurocucumis liouvillei</i>
Cerberoside	<i>Bohadschia argus</i>
Kondritin sülfat	<i>Ludwigothurea grisea, Thelenota ananas, Pearsonothuria graeffei, Stichopus tremulus, Holothuria vagabunda, Isostichopus badionotus</i>
Glukozaminoglukan	<i>Stichopus japonicas, Holothuria (Metriatyla) scabra, Thelenota ananas</i>
Lektin	<i>Stichopus japonicus, Holothuria atra, Holothuria scabra</i>
Sülfatlı polisakarit	<i>Ludwigothurea grisea, Stichopus japonicus</i>
Sterol (glikozit, sülfatlar)	<i>Cucumaria frondosa</i>
Biyoaktif peptidler {protein (jelatin & kollagen) hidrolizatlar}	<i>Cucumaria frondosa, Acaudina molpadioides, Paracaudina chilensis, Acaudina molpadioidea, Stichopus japonicas</i>
Fenollar ve flavonoidler	<i>Holothuria scabra, Holothuria leucospilota, Stichopus chloronotus, Cucumaria frondosa</i>
Triterpen oligoglikozitler	<i>Cucumaria okhotensis</i>
Glikoprotein	<i>Mensamaria intercedens</i>
Steroid sapogeninler	<i>Actinopyga echinites, Actinopyga miliaris, Holothuria atra, Holothuria scabra</i>
Mukopolisakaritler (SJAMP)	<i>Stichopus japonicas</i>
Çoklu doymamış yağ asitleri(PUFA): araknidonik acit (AA C20:4 n-6), eicosapentaenoik acit (EPA C20:5 n-3), docosahexaenoik acit (DHA C22:6 n-3)	<i>Stichopus herrmanni, Thelenota ananas, Thelenota anax, Holothuria fuscogilva, Holothuria fuscopunctata, Actinopyga mauritiana, Actinopyga caerulea, Bohadschia argus, Stichopus chloronotus, Holothuria tubulosa, Holothuria polii, Holothuria mammata</i>

1.6. Denizhiyarlarının Kanser Hücrelerini Öldürme Mekanizmaları

1.6.1. Sitotoksik aktivite

Anti-kanser ajanları kanser hücrelerinin büyümesini veya mitozunu bloke ederek sitotoksik aktivite gösterirler (Wargasetia ve Widodo, 2017). Çeşitli denizhiyari türlerinden elde edilen özellikle triterpen glikozit ve saponin içeren özütlerin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile antikanser ve anti-metastatik etki gösterdikleri belirlenmiştir

(Aminin vd., 2015). Echinaside A ve Bivittoside D gibi aktif bileşikler mitozun inhibe edilmesini ve DNA kırılmasının indüklenmesini sağlayan bileşiklerdir. Bunlara ilaveten, fukosile edilmiş kondroitin sülfat (LFCS) gibi denizhiyarlarından elde edilen bileşiklerden türevlenen düşük moleküler ağırlıklı yeni antikanser bileşiklerde bulunmaktadır. Bu bileşiğin, fare Lewis akciğer karsinomu (LLC) hücrelerinin, hücre büyümesini ve metastazını inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Liu vd., 2016). Ayrıca, deniz hıyarındaki aktif bileşikler; EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü), Akt (protein kinaz B), ERK (hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar), FAK (fokal adezyon kinazı) ve MMP-9 (matrismetalo proteinaz-9) yolları aracılığıyla kanser hücrelerinin büyümesinin kontrol edilmesinde oldukça hızlıdır (Aminin vd., 2015). Sitotoksik etkilere neden olan denizhiyarı bileşiklerinin çeşitli kanser hücreleri üzerindeki etkileri Çizelge 1.2'de sunulmakta olup; triterpenoid glikozitlerin (saponinler) denizhiyarlarından en fazla üretilen metabolit olduğu görülmektedir (Wargasetia ve Widodo, 2017).

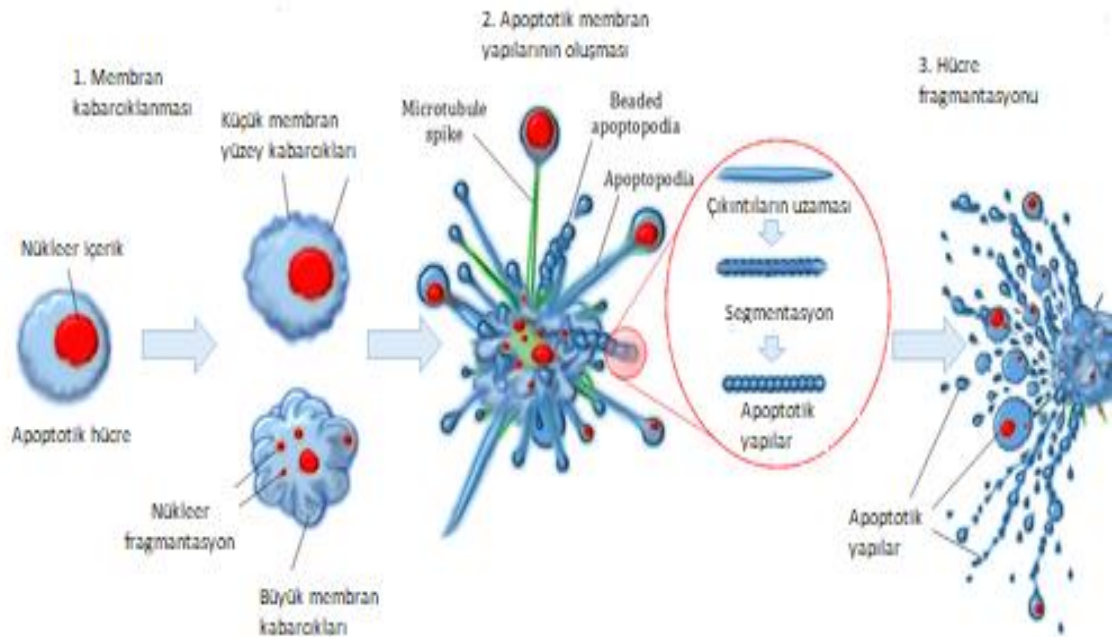
1.6.2. Hücre döngüsünün inhibisyonu

Memeli hücreleri, hücresel bölünme sırasında; hücre döngüsünün G1, S, G2 ve metafaz evreleri boyunca ilerler. Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücrelerin bir önceki faz tamamlanmadan diğer faza geçmelerine engel olmasından dolayı oldukça önemlidir. Antikanser ajanların hücre döngüsünün durdurabilme özelliğinde olması, kanser hücrelerinin bölünmesini engellediğinden dolayı kanser tedavisinde stratejik bir öneme sahiptir (Gabrielli vd., 2012). Kanser hücresinin özelliklerinden biri hızlı hücre bölünmesidir. Dolayısıyla kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden yollardan biri de hücre döngüsünün durdurulmasıdır (Shapiro ve Harper, 1999). Hücre bölünmesinden önce, kanser hücreleri S-fazında kendi DNA'larını replike etmelidir. Daha sonra kanser hücreleri mitozun gerçekleştiği M fazına geçer. Fazlar arasında bir gap fazı (G fazı) bulunur. M ve S fazları arasında bulunan G1 ile S ve M fazları arasında bulunan G2 fazı olmak üzere iki tip G fazı bulunur. (Pucci vd., 2000). Denizhiyarı içinde bulunan orijinal ve türev bileşiklerin kanser hücre bölünmesinin çeşitli fazlarını bloke ettiği kanıtlanmıştır. Genellikle G0 / G1, G2 / M ve S fazında hücre döngüsünü durdurmaktadır (Aminin vd., 2015). LFCS bileşiğinin türevleri p53/ p21 ekspresyonunu artırarak kanser hücresi büyümesini durdurur (Liu

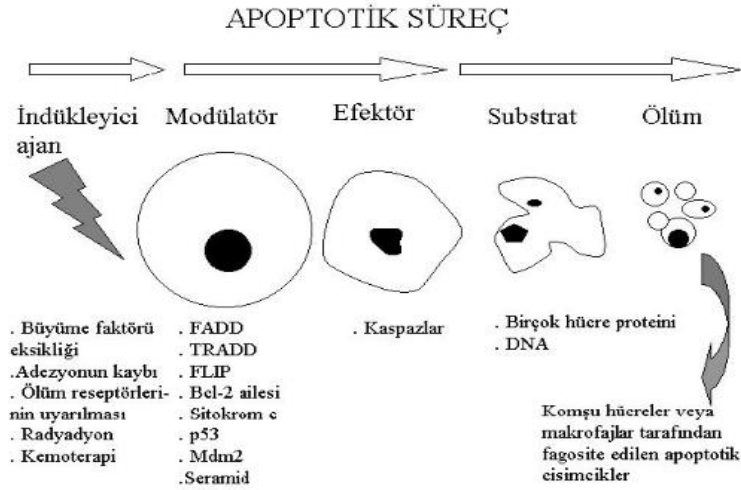
vd., 2016). Denizhiyarından elde edilen aktif bileşiklerin hücre döngüsünü bloke etmesi programlı hücre ölümüne neden olabilmektedir.

1.6.3. Apoptozun uyarılması

Apoptoz; membran tomurcuklanması, kromozomal DNA fragmentasyonu, nükleer parçalanma, sitoplazmada organel pozisyonunun kaybı ve fosfatidilserinin membranın dışına translokasyonu gibi morfolojik değişikliklere ve hücrenin büzülmesine neden olan programlı hücre ölümü olarak karakterize edilir (Elmallah ve Micheau, 2015). Apoptozda gözlenen morfolojik değişimler ve apoptozun aşamaları Şekil 1.4 ve Şekil 1.5’de gösterilmiştir. Apoptoz kanser hücreleri de dahil olmak üzere istenmeyen, eski veya yaralı hücrelerin ortadan kaldırılmasıyla sonuçlandığından dolayı, tümör baskılanması için önemli bir mekanizmadır (Wargasetia vd., 2015). Bu nedenle apoptozda azalma veya apoptoza direnç karsinogenezde önemli rol oynamaktadır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengede bozulmalar, kaspaz aktivitesinin etkisiz hale getirilmesi veya kaybedilmesi ve ölüm reseptörü sinyalinin bozulması yoluyla apoptoza direnç oluşumu veya apoptozda azalmalar meydana gelir (Wong, 2011).

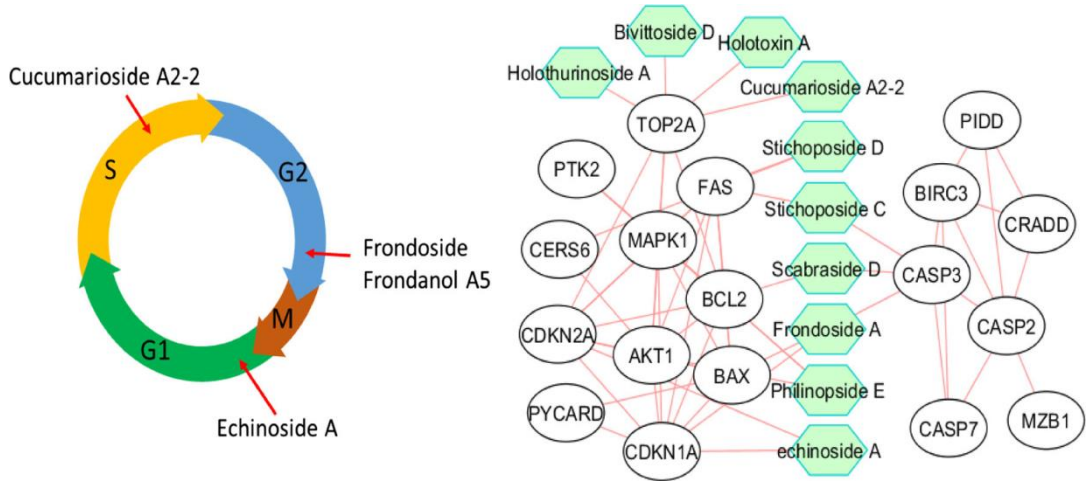


Şekil 1.4. Apoptozda gerçekleşen morfolojik değişimler



Şekil 1.5. Apoozun aşamaları (İşler vd., 2012).

Apoptoz indüksiyonu sitotoksik antitümör ajanların en belirgin özelliklerinden biridir. Denizhıyarlarından izole edilen doğal bileşikler, kanser ilerlemesini engellemek için birkaç farklı mekanizma yoluyla apoptotik yolları indükler (Wargasetia ve Widodo, 2017). Denizhıyarında en yaygın bulunan metabolit olan Triterpen glikozitler, hücre içi kaspaz ölüm yolları, Fas ve kaspaz-8 aktivasyonu, BCL-2' nin azalması ve kaspaz-3'ün artması olmak üzere farklı yollarla kanser hücrelerinde apoptozu uyarır (Şekil 1.6) (Qian vd., 2015; Ye, 2016; Qian, 2017). Denizhıyarına ait çeşitli bileşenlerin kanser hücrelerinde apoptozu uyarma şekillleri Çizelge 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.6 Denizhiyarı bileşiklerinin hücre döngüsü, hücre proliferasyonu ve apoptoz yolları (Widodo vd., 2018)

1.6.4. Anti-metastatik ve anti-anjiyogenik etkiler

Metastaz ve anjiyogenez kanser hücrelerinin neden olduğu en tehlikeli süreçlerdir. Metastaz tümörün ilk oluştuğu yerden farklı bir yerde sekonder malignant büyümeler gerçekleştirmesi olup, kanser hastalarının % 90'ının ölüm nedenidir (Zhao vd., 2011). Metastaz mekanizmasının hücre içindeki enflamatuar mekanizma ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Qian, 2017). Bu nedenle, antienflamatuar bileşiklerle tedavinin metastazı önlemek için kullanılabilir yöntemlerden biri olduğu tahmin edilmektedir. Denizhiyarları da anti-metastatik özellikte birçok aktif bileşen içermektedir. Bazı glikozitler kanser hücrelerinin adhezyonunu azaltır ve hücre göçünü baskılar (Aminin vd., 2015). Ek olarak, denizhiyarı aktif bileşiklerden türevlenen, anti-kanser özellik gösteren aktif bileşiklerden biri LFCS'dir. LFCS, fare LLC hücrelerinin bölünmesini ve metastazını engellemektedir (Liu vd., 2016).

Anjiyogenez, kan damarlarının iç duvarlarını örten endotel hücrelerinin büyümesi, göçü ve farklılaşmasını içeren aşamalarla önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Anjiyogenez, tümörlerin hayatta kalmaları ve çoğalmalarına yardımcı olmak için oluşur. Anti-anjiyogenik ajanlar bu işlemi inhibe ederek, oksijen ve besinin kanser hücresine ulaşmasını önler, ve böylece hücreler aç kalarak ölür (Gautam vd., 2014). Kanser ilaçlarının metastaz ve anjiyogenezi inhibe edebilme özelliği etkili kanser tedavisi stratejileri için esastır. Denizhiyarlarında bulunan glikozit anjiyogenezin inhibe edilmesinde ve tümör invazyonunun önlenmesinde kullanılabilen aktif bir bileşiktir (Aminin vd., 2015). LFCS'nin

vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ifadesini bastırıldığı tespit edilmiştir (Liu vd., 2016). Ayrıca, deniz hıyarından elde edilen; philinopside A, scabraside D, philinopside E, frondoside A ve hGAG'nın anti-anjiyojenik aktiviteleri olduğu kanıtlanmıştır (Wargasetia vd., 2018).



Çizelge 1.2. Anti-kanser aktiviteye neden olan denizhiyari bileşiklerinin etki şekilleri (Wargestia ve Widodo 2017'ye göre düzenlenmiştir)

Aktif Bileşik	Etki şekli	Kaynağı
24-dehydroechino-side A (DHEA)	HepG2 hücre göçünü ve invazyonu engeller, MMP-9 azaltır, TIMP-1, VEGF ve NF-κB'yi artırır	<i>Pearsonothuria graeffei</i>
Sulu ekstrakt Colochiroside A	Tümör boyutunu azaltır, intrinsik apoptozu indükler.	<i>Holothuria arenicola</i>
Ham Saponin	Antitümör aktivite gösterir	<i>Colochirus anceps</i>
Cucumarioside A2-2	Kaspaz-3 ve 9'un düzenlenmesi ile apoptozu indükler.	<i>Holothuria leucospilota</i>
Ds-echinoside A	Tümör hücrelerinin çoğul ilaç direncinin gelişmesini önler, kaspaz bağımlı apoptozu indükler	<i>Cucumaria japonica</i>
Echinoside A	MMP-9 ve VEGF'yi baskılayarak hücre göçünü engeller; p16, p21 ve c-myc artışı ile siklin D1'i azaltarak hücre döngüsünü durdurur; Bcl-2 ve NF-κB azaltarak, TIMP-1 ve kaspaz-3'ü artırarak apoptozu indükler	<i>Pearsonothuria graeffei</i>
Frondanol A5	Bcl-2'yi azaltıp, kaspaz-3'ü artırarak apoptozu indükler; p16, p21 ve c-myc'i artırıp, siklin D1'i azaltarak hücre döngüsünü durdurur.	<i>Holothuria nobilis</i>
Frondanol A5 polar ekstraktı	p21, GiLT ifadesi, makrofaj fagositozu ve apoptoz artırır.	<i>Pearsonothuria graeffei</i>
Frondoside A	Siklin A, siklin B ve cdc25c ifadesini azaltırken, p21 ifadesini artırır	<i>Cucumaria frondosa</i>
Glycosides 1 & 2	Anti-metastatik; tümör hücrelerinin çoklu ilaç direnci inhibe eder; apoptozu uyarır; hayatta kalma yanlısı otofajiyi önler	<i>Cucumaria frondosa</i>
Intercedensides A, B, and C	NF-KappaB'yi aktifleyip ve Ikappa B alfa'yı parçalayarak A549 tümör hücrelerinde sitotoksosite	<i>Psolus patagonicus</i>
Metanolik ekstraktlar	Anti-neoplastik aktivite gösterir	<i>Mensamaria intercedens</i>
Philinopside A	ROS oluşumu ve sitokrom C salınımını artırır	<i>Holothuria parva</i>
Philinopside E	Birçok kanser hücre hattında proliferasyon, göç ve anjiyogenezi inhibe eder	<i>Pentacta quadrangularius</i>
Deniz salatalığı fraksiyonu	Apoptozu indükler, tümör büyümesini inhibe eder ve KDR-αvβ3 integrini baskılayarak anti-anjiyojenik etki gösterir.	<i>Pentacta quadrangularius</i>
Sphingoid bazları	Anjiyogenez ve damar oluşumunu inhibe eder	<i>Sea cucumber</i>
Stichoposide C	Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptozu indükler	<i>Stichopus variegates</i>
Stichoposide D	Lösemi ve kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indükler	<i>Thelenota anax</i>
	Apoptozu indükler	<i>Thelenota anax</i>

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1.MALZEME

2.1.1. Hücre Hatları

Sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde akciğer kanseri (A549) ve prostat kanseri (PC-3) olmak üzere iki farklı kanser hücre hattı ve sağlıklı hücre hattı olan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) kullanılmıştır.

2.1.2. Ektrakte edilen deney materyali

Bu çalışmada; Muğla/Gökova Körfezi'nden toplanan, *Holothuria sanctori* türüne ait olan ve yaygın olarak denizhiyari adıyla bilinen deniz canlısına ait özütler kullanılmıştır. Özütler, metanol ve aseton olmak üzere iki farklı çözücü kullanılarak hazırlanmıştır.

2.1.3. Annexin-V Apoptoz kiti

Özüt uygulanan hücrelerin apoptoz yüzdesi “Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit” (BMS500FI, eBioscience, USA) protokolüne uygun olarak Beckman Coulter firmasına ait Navios marka Flow sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.1.4. Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler

Fetal Bovin Serum (FBS): İlk kullanılmadan önce 56°C’ de 1 saat ısı inaktivasyonu yapılır daha sonra -20°C’ de saklanır. Ticari olarak ısı inaktivasyonu yapılmış formları da bulunmaktadır.

RMPI 1640-Medyum: Ticari olarak satın alınır ve +4°C’ de saklanır.

PBS (Phosphate buffered saline): 0,17g KH₂PO₄, 0,79 g K₂HPO₄, 4 g NaCl tartılır ve 500 ml olacak şekilde dH₂O' da çözünür ve pH 7,4' e ayarlanır.

MTT [3-4,5- dimetil- 2 –tiazolil)- 2,5- difenil- 2H tetrazolium bromid]: 5 mg MTT tartılır ve 1 ml PBS içinde çözündürülür ve 0,22 µm por çapında filtreden geçirilerek sterilize edilir. -20°C' de saklanır.

Penisilin-streptomisin antibiyotik: 10.000 µg/ml stok halinde bulunan kimyasaldan, antibiyotik konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde stoktan eklenerek hazırlanır.

Trypan blue: %1' lik şekilde hazırlanarak kullanılır. Stoktan trypan blue hazırlamak için 100 ml dH₂O' ya 1 g trypan blue eklenerek çözündürülür ve 0,22 µm por çapında olan filtrelerle sterilize edilerek hazır hale getirilir.

Tripsin % 0.25 w/v: Ticari olarak satın alınır ve -20°C' de saklanır.

Dimetil sülfoksit(DMSO): Ticari olarak satın alınır ve oda sıcaklığında saklanır.

2.1.5. Deneyleerde kullanılan kemoteröpatik ilaçlar

Cisplatin (Sigma Aldrich): 2000 µg/ml'lik stoklar halinde RPMI 1640 ile çözülerek hazırlanır. 0.22 µm'lik membran filtreden geçirilir.

Docetaxel: 5000 µg/ml'lik stoklar halinde RPMI 1640 ile çözülerek hazırlanır. 0.22 µm'lik membran filtreden geçirilir.

2.1.6. Deneyleerde kullanılan kimyasallar

Kullanılan kimyasallar	Marka
3-4,5-dimetil-2-tiazolil (MTT)	Applichem
Annexin V Apoptoz kiti	Biovision
Aseton	Emsure
Bovin serum albumin	Applichem

Coomassie brilliant blue G-250	Appllichem
Dimetilm sülfoksid(DMSO)	Appllichem
di-Sodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Appllichem
Fetal Bovin Serum (FBS)	Biochrom
Kaspaz-3 kiti	Biovision
Metanol	Emprove
Penisilin-streptomisin antibiyotik	Biochrom
RMPI-1640	Biochrom
Sodyum di-Hidrojen fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Sodyum klorid(NaCl)	Appllichem
Tripsin %0,25 w/v	Appllichem
Trypan Blue	Sigma

2.2. YÖNTEM

Bu çalışmada; Muğla/Gökova Körfezi'nden toplanan, *Holothuria sanctori* türüne ait olan ve yaygın olarak denizhiyari adıyla bilinen deniz canlısının özütleri, metanol(HSM) ve aseton (HSA) olmak üzere iki farklı çözücü kullanılarak hazırlanmıştır. Metanol ve aseton da çözülerek hazırlanan özütlerin, akciğer kanseri (A549) ve prostat kanseri (PC-3) olmak üzere iki farklı kanser hücre hattında ve sağlıklı hücre hattı olan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) üzerinde sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır.

Özütlerin hücreler üzerindeki doz ve zamana bağlı etkileri, MTT metoduyla belirlenmiş olup, özütlerin ilgili hücreler üzerindeki IC₅₀ (yaklaşık %50 inhibisyon konsantrasyonu) değerleri hesaplanmıştır. HSM özütlerinin apoptotik etkileri A549 ve PC-3 hücre hatlarında flow sitometri ve kaspaz-3 yöntemleriyle araştırılmıştır. Bununla birlikte HSM ile hazırlanan özütün fenolik bileşik içerikleri HPLC analizi ile hizmet alımı yapılarak belirlenmiştir.

2.2.1. *Holothuria sanctori* özütlerinin elde edilmesi

Holothuria sanctori türüne ait canlılar Gökova Körfezi'nden toplandıktan sonra içerisinde deniz suyu bulunan bir kovada muhafaza edilerek, canlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Çalışmanın başlangıcında öncelikle deniz suyu kovadan uzaklaştırılmış olup, musluk suyu ile doldurulan kovada canlının ölmesi beklenmiştir. Yaklaşık iki saat sonra canlılığını yitiren *H. sanctori* türüne ait denizhıyarlarının, ilk olarak maket bıçağı yardımıyla iç organları temizlenmiş olup, ardından makas yardımıyla vücut kısımları küçük parçalar halinde kesilmiştir. Bu işlemler için 8 adet denizhıyarı kullanılmıştır. Küçük parçalar halindeki denizhıyarları tepsiye dizilerek etüde 42 °C'de, iç ve dış kapakları yarı aralık kalacak şekilde kurutulmuştur. İlk başta kapak kapalı olduğunda nem oranının arttığı gözlemlendiğinden bu şekilde kurutulmaya devam edilmiştir. Bu sayede kurutma hızı ve süresinin kısaldığı gözlenmiştir. Kuruyan örnekler beher içerisine alınarak tartımları yapılmış ve ekstraksiyon için 10 gr/100 ml olacak şekilde, ekstraksiyonun şekline göre metanol veya aseton eklenmiştir. Beherlerin ağızları alüminyum folyo ile kaplanarak parafilm ile sabitlendikten sonra 25°C'de çalkalamalı su banyosunda yaklaşık 24 saat ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Özütler her 8 saatin sonunda kurutma kağıdı ile süzölmüştür. Metil alkol ve aseton, Rotary evaporatör (42°C'de, -90 rot ayarında) ile numuneden büyük ölçüde uzaklaştırılmıştır. Elde edilen özütler içerisinde bulunan su, liyofilizatör olmadığından etrafı alüminyum folyo ile çevrili beherlerde, çeker kabine koyulmuş ve bir hafta boyunca her gün kontrol edilerek kalan çözücünün liyofilize olması sağlanmıştır. Elde edilen özütler ışık korumalı şişelere konularak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. Hücre kültürü

Sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde akciğer kanseri (A549) ve prostat kanseri (PC-3) olmak üzere iki farklı kanser hücre hattı ve sağlıklı hücre hattı olan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) kullanılmıştır. Tüm hücreler % 10 fetal bovin serum ve 100 µg/ml penisilin/streptomisin içeren glutaminli RPMI 1640 besi ortamında, 37°C'de %5 CO₂, %95 hava içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültüre alınmışlardır.

2.2.3. Hücrelerin pasajlanması

Kültüre alınan adherent (yüze tutunarak çoğalan, yapışkan) hücre hatlarının günlük takipleri inverted mikroskop ile yapılmıştır. Hücreler, hücre kültürü kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kapladıklarında tripsinizasyon yöntemiyle pasajlanmaları sağlanmıştır. Tripsinizasyon adherent (yapışkan,yüze tutunarak çoğalan) hücreleri kaldırmak için kullanılan bir yöntemdir. Tripsinizasyon işlemi için ilk olarak, hücrelerin çoğaldıkları hücre kültürü kaplarındaki besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücreler PBS ile iki kez yıkandıktan sonra kullanılan hücre kültürü kaplarının boyutuna uygun miktarda tripsin eklenmiş ve CO₂ inkübatöründe 5-10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin yüzeyden ayrılması hem gözle, hem de inverted mikroskop ile gözlenmiştir. Ardından, hücre kültürü kaplarına yaklaşık yarım saat 37°C’ de inkübe edilen %10 FBS içeren RPMI1640 büyüme ortamı eklenerek hücrelerin tripsine uzun süre maruz kalmaları engellenmiştir. Hücreler 15 ml’lik steril falkon tüplere aktarılmıştır ve 24°C’ de 800 rpm’de 6 dakika santrifüjlenmiştir. Supernatant döküldükten sonra hücre pelletleri uygun miktarda PBS ile yıkanarak 24°C’ de 800 rpm 6 dakika tekrar santrifüjlenmiştir. Supernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletleri, pellet yoğunluğuna göre uygun büyüme ortamı içerisinde homojenize edilmiştir. Eşit miktarda hücre süspansiyonu ve % 1’lik trypan blue solüsyonu ile karıştırılarak; hücre yoğunluğu /hücre sayımı “Trypan blue exclusion yöntemi” ile hemositometre kullanılarak ışık mikroskobu altında sayılmıştır. Ölü hücreler hücre zarındaki hasardan dolayı maviye boyalı şekilde gözlenmiştir. Hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre yoğunluğu (hücre/ml)} = \text{Hücre sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4$$

2.2.4. Sitotoksik aktivitenin araştırılması

Hücreler 96 kuyucuklu mikropalakalara her bir kuyucuğa 4×10^3 hücre olacak şekilde 180µl büyüme ortamında ekilmiştir ve 37°C’de %5 CO₂ ve %95 nemli ortam sağlayan inkübatörde 20-24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrasında, % 10’luk DMSO içeren besi ortamında stok solüsyonu 10 mg/ml olarak hazırlanan özütlerin, seri dilüsyonlar yapılarak 6 farklı alt dozu hücreler üzerine uygulanmıştır. Ardından 24,48 ve 72 saat’lik inkübasyonlar sonrasında hücre hatları

üzerindeki sitotoksik etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir. Aynı zamanda sitopatik etki inverted mikroskop altında da gözlemlenmiştir.

2.2.5. MTT Analizi

Özütlerin, kullanılan hücre hatları üzerindeki doz ve zamana bağlı sitotoksik etkileri MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) deneyiyle belirlenmiştir. Bu metod, metabolik olarak aktif hücelere ait mitokondrial enzimlerin etkisiyle, suda çözünen sarı renkli substrat olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid'in suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşümüne dayanır. Üzerine özüt eklenen 96 kuyulu hücre kültürü plakalarında bulunan hücelerin belirlenen inkübasyon süresi sonrasında (24, 48 ve 72 saat) MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, öncelikle hücre kültürü kaplarından besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µl taze besiyeri ve 10 µl MTT (PBS içinde hazırlanan 5 mg/ml) eklendikten sonra CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresince tetrazolium tuzu canlı hücelere girip mitokondriyal enzimler aracılığı ile suda çözünmeyen mavi-mor renkli formazana indirgenerek canlı hücelerin içerisinde kalır. Ölü hücelere ise tetrazolium bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybettiğinden herhangi bir renk değişimine yol açmazlar. 4 saatin sonunda formazan kristallerinin çözünmesi için kuyucuklara 100'er µl DMSO eklenmiş ve mikropalakalar oda sıcaklığında 150 rpm'de 5 dakika boyunca çalkalanmıştır. Hücelerin MTT soğurmaları bir mikropalaka okuyucu (Thermo Scientific, MultiskanFC, USA) ile 540 nm dalga boyunda ölçülerek elde edilmiştir. Canlı hücelere, içinde bulunan formazan nedeniyle ölü hücelere göre daha fazla ışık soğuracakları için, çoğu ölü hücre bulunan kuyucuklardan alınan soğurma değeri nispeten düşük olacaktır. Her deney 3 tekrarlı olacak şekilde en az 2 kez tekrarlanmıştır. Sitotoksisite % olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{Sitotoksisite} = ((\text{Absorbans (ABS) Kontrol} - \text{Absorbans Deney}) / \text{Absorbans Kontrol}) * 100$$

2.2.6. IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi

Her özütün her hücre için IC₅₀ değerleri GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Soft Ware, Inc., San Diego, CA) bilgisayar programı kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen IC₅₀ değerleri baz alınarak sinerjizm, Annexin-V ve kaspaz-3 analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.7. Flowsitometri ile apoptoz tayini (Annexin-V yöntemi)

Yöntemin prensibi, apoptozun ilk evrelerinde hücre yüzeyinde bulunan fosfatidil serinin hücrenin iç yüzeyinden hücrenin dış yüzeyine geçişinin, FITC ile işaretli Annexin-V'in hücrenin dış yüzeyinde bulunan fosfatidil serine bağlanmasının flow sitometri ile ölçülmesine dayanır. Bu amaçla, A549 ve PC-3 kanser hücreleri her kuyucukta 5×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücreler HSM özütü ile A549 hücre hattı için (20-12-5 mg/ml) ve PC-3 hücre hattı için (20-8-4 mg/ml) olacak şekilde ekilmiş ve 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Özüt ile muamele edilmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca bir kuyucuktaki hücelere hiçbir şey eklenmemiştir. Bu hücrelerden analizde kullanılmak üzere tek boyama içeren kontrol ve boyanmamış hücreler hazırlanmıştır. Özüt ile muamele edilen hücrelerin inkübasyonundan sonra hücreler kuyucuklardan tripsinizasyon ile toplanmış ve kitte yazan protokol takip edilmiştir. Kısaca, toplanan ve PBS ile yıkanan hücreler 200 µl binding buffer içerisinde çözülmüştür. 195 µl hücre süspansiyonuna 5 µl Annexin V-FITC eklenip 15 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Santrifüjden sonra supernatantlar uzaklaştırılmış ve hücre pelletleri 190 µl binding buffer'da çözülmüştür. Her hücre pelletine 10 µl PI (20 µg/ml) eklendikten sonra hücreler flowsitometri cihazında manuel olarak okutulmuş ve Kaluza bilgisayar programıyla kapılama yapılarak nekrotik,erken apoptoz,geç apoptoz ve canlı hücre ayrımı yapılmıştır. Hücrelerin apoptoz yüzdesi bir "Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit" (BMS500FI, eBioscience, USA) protokolüne uygun olarak Beckman Coulter firmasına ait Navios marka Flow sitometri cihazında, Kaluza programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Flow sitometri cihazı nekrotik, erken apoptotik, geç apoptotik ve canlı hücreleri kantitatif olarak belirlemek için kullanılmıştır.

2.2.8. Kaspaz -3 Analizi

Bu deney apoptoz sırasında aktive edilen kaspaz-3 tarafından DEVD-pNA bağının kesilmesiyle hücre içinde oluşan serbest p-nitrolanilide(pNA) miktarının ölçülmesine dayanır. Kaspaz-3 deneyi “Caspase-3 Colorimetric assay kit” (ab39401 Abcam, USA) kiti kullanılarak yapılmıştır. Deney üretici firmanın protokolüne göre yapılmıştır. A549 ve PC-3 hücreleri 2×10^6 hücre/kuyucuk olarak konsantrasyonda 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra hücreler 15 mg/ml konsantrasyondaki özüt ile 36-48 saat inkübe edilmiştir. Özüt eklenmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Protokole uygun olarak, kısaca hücreler toplandıktan sonra PBS ile yıkanmış ve ardından tripsin ile muamele edilerek hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılması sağlanarak, 800 rpm’de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelleti 5 ml PBS içerisinde çözülerek 800 rpm’de 6 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında pellete 50 µl soğuk hücre liziz buffer eklenerek 10 dakika buzda bekletilmiş ve ardından 11.000 rpm’ de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Supernatantlar yeni bir tüpe aktarılmış ve protein konsantrasyonu Bradford Assay (Bradford, 1976) ile belirlenmiştir. Bradford sonuçlarına göre, her örnekten 50 µl (50-200 µg) protein 96 kuyulu mikrolakalara alınmış ve üzerine 50 µl 10 mM DTT içeren reaksiyon tamponu eklenmiştir. Ardından üzerine 5 µl, 4 mM DEVD-pNA substratı (200 µM son konsantrasyon) eklenip 37°C’ de 1-2 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda absorbans 405 nm’ de mikrolaka okuyucu ile kaydedilmiştir (Mikroplate reader, Thermo Fisher Scientific, ABD). Kaspaz-3 aktivitesi kontrol hücrelerinin ve muamele edilen hücrelerin absorbansı karşılaştırılarak kontrole göre “kat” olarak ifade edilmiştir.

2.2.9. Kanser hücre hatlarıyla kemoteröpatik ilaçların sinerjistik etkileşiminin incelenmesi

Kanserin kemoteröpatik tedavisinde yaygın olarak kullanılan cisplatin ve docetaxel’in, bu çalışmada elde edilen HSM ve HSA özütlerinin PC-3 ve A549 hücreleri üzerinde sinerjistik bir etkileşimlerinin olup olmadığı belirlenmiştir. Bu amaçla 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde kanser hücre hatlarının ekimleri yapılmış ve 20-24 saat inkübasyonun ardından kuyulara; yalnızca özüt, yalnızca kemoteröpatik ilaç ve özüt+kemoteröpatik ilaç üç tekrarlı olarak eklenmiştir. 37°C’de %5 CO₂ ve

%95 nemli ortam sağlayan inkübatörde 24 saat inkübasyonun ardından MTT yöntemi ile HSM ve HSA özütleri ile Cisplatin ve Docetaxel kemoterapi ilaçlarının, A549 ve PC-3 hücre hatları üzerinde IC₅₀ değerleri belirlenmiştir(Graphpad Prism 7). IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinden sonra elde edilen sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılarak özütler ile kemoteröpatik ilaçlar arasındaki etkileşimi gösteren kombinasyonel indeks değeri (CI) hesaplanmıştır.

$$CI=(D1/Dx1)+(D2/Dx2)$$

CI=Kombinasyon indeks değeri(Combination index value)

D1=%50 ölümüne neden olan cisplatin veya docetaxel+özüt birleşimde kullanılan cisplatin'in(veya docetaxel) IC₅₀ değeri

Dx1=%50 ölümüne neden olan cisplatin veya docetaxel IC₅₀ değeri

D2=%50 ölümüne neden olan cisplatinveya docetaxel +özüt birleşiminde kullanılan özütün IC₅₀değeri

Dx2=%50 ölümüne neden olan özütün IC₅₀ değeri

Elde edilen CI değeri belirli aralıklara göre yorumlanır. Buna göre ;

CI>1.3 antagonizm

CI=1.1-1.3 orta derecede antagonizm

CI=0.9-1.1 arttırıcı etki

CI=0.8-0.9 sinerjizm

CI=0.6-0.8 orta derecede sinerjizm

CI=0.4-0.6 sinerjizm

CI=0.2-0.4 güçlü sinerjizm olarak değerlendirilmiştir.

2.2.10. HLPC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) Deneyi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, bir karışımda yer alan herbir bileşeni ayırmak, tanımlamak ve miktarını belirlemek için kullanılan bir ayırma tekniğidir. Bu teknik sayesinde solüsyon içinde yer alan bileşikler, poröz sabit faz üzerinde hareket eden sıvı fazın etkisiyle farklı hareket etmeleri nedeniyle bireysel olarak ayırt edilebilmektedir. Bu çalışmada gerçekleştirilen HPLC analizinde Caponio vd. (1999)'nin metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Materyal hazırlama işleminde her bir özütten 0,2 g tartılmış ve mobil fazda çözülmüştür. Daha sonra 0,45 µm filtreden geçirilip HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Fenolik bileşiklerin

tanımlanması ve kantitatif analizi standartlar ile karşılaştırılarak analiz yapılmıştır. Her bir bileşiğin miktarı $\mu\text{g/g}$ özüt olarak verilmiştir. HPLC analizi Mehmet Akif Ersoy Üniveritesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (BİLTEKMER) Laboratuvarında hizmet alımı kapsamında gerçekleştirilmiştir. Analiz için kullanılan cihaz ve uygulama şekli aşağıda verilmiştir.

HPLC Metodu: Kullanılan Sistem: Shimadzu Promience Marka HPLC

CBM: 20ACBM

Dedektör: DAD (SPD-M20A)

Kolon Fırını: CTO-10ASVp

Pompa: LC20 AT

Autosampler: SIL 20ACHT

Bilgisayar Programı: LC Solution

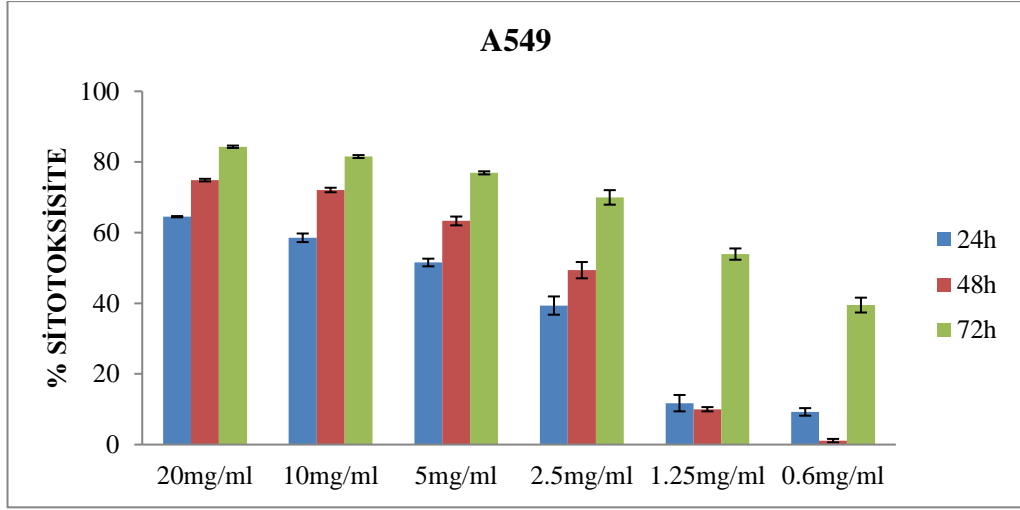
MobilFaz: A; %3 Formik asit B; Metanol

3. BULGULAR

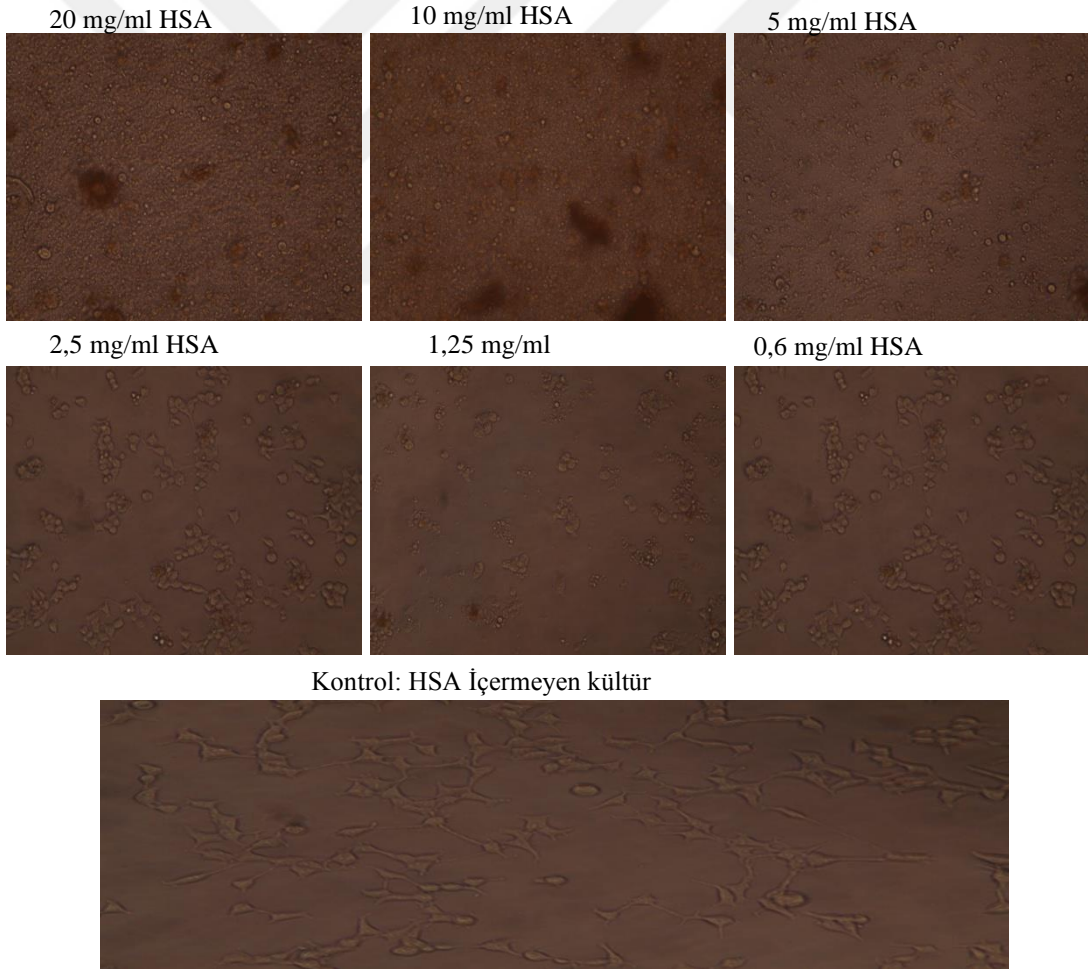
3.1 Denizhiyari *Holothuria sanctori* Özütünün Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

3.1.1. A549 kanser hücre hattı üzerinde özütlerin doz ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkileri

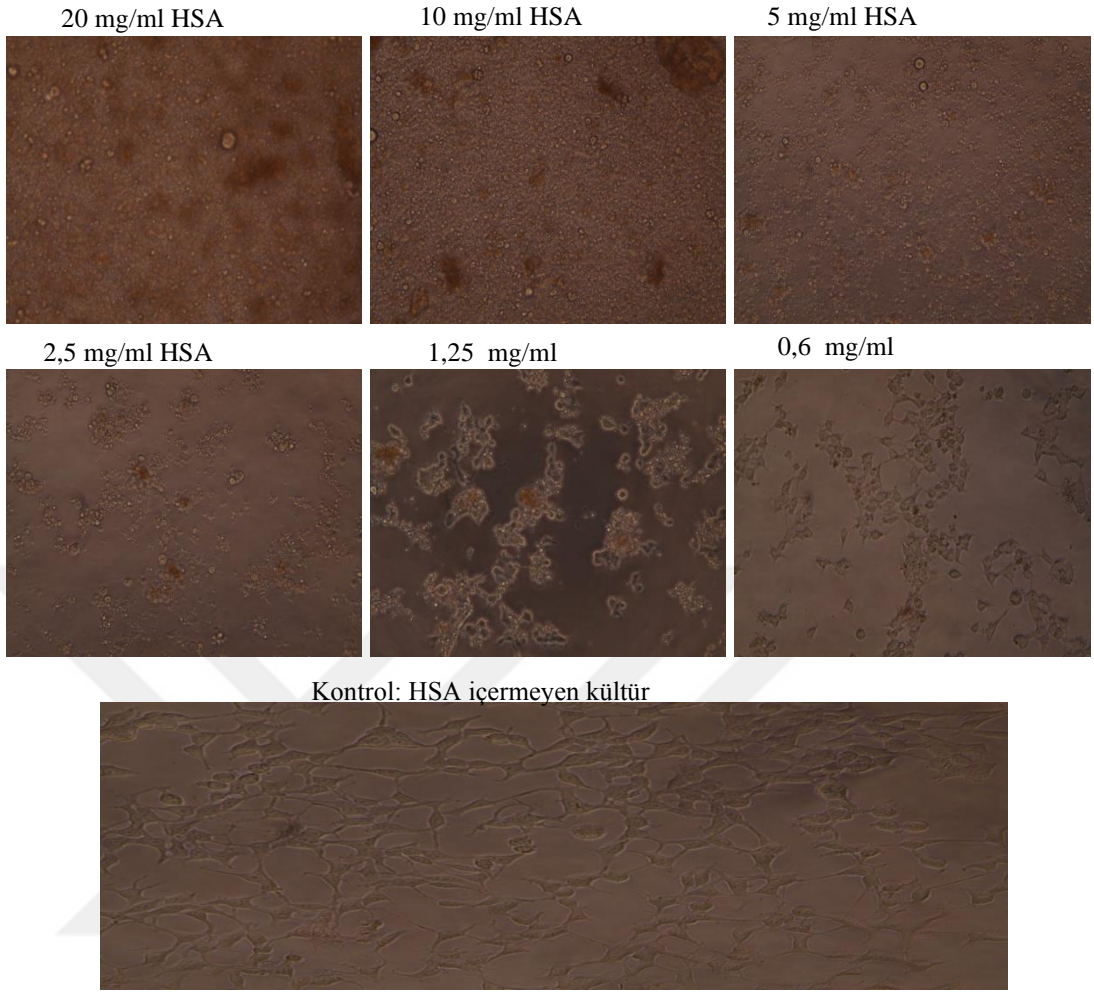
A549 hücre hattı, HSA (*Holothuria sanctori* aseton) özütünün 20, 10, 5, 2,5, 1,25 ve 0,6 mg/ml olarak 6 farklı konsantrasyona maruz bırakılmış ve özütün 24, 48 ve 72 saatteki hücre hattında neden olduğu sitotoksik etkilere bakılmıştır. Buna göre 20 ve 10 mg/ml HSA özütü ile muamele edilen hücrelerde özütün, inkübasyon sürelerinin tümünde %60'dan fazla sitotoksik etki gösterdiği ve bu iki konsantrasyonun A549 hücre hattı üzerindeki etkilerinin benzer olduğu belirlenmiştir. En yüksek sitotoksik etki 72 saatte 20 mg/ml özüte maruz bırakılan hücrelerde %85 oranında gözlenmiştir. 5 mg/ml HSA ile muamele edilen hücrelerde 24 saatte % 53 oranında sitotoksik etki gözlenirken, 48 ve 72 saatlerde bu oranın, 10 ve 20 mg/ml özütün oluşturduğu sitotoksik etki oranlarına yaklaştığı gözlenmiştir. 2,5 mg/ml özüt ile muamele edilen hücrelerde 24 ve 48 saatlerde %50 ve altında sitotoksik etki gözlenirken, bu oranın 72 saatte %70'e ulaştığı ve 5 mg/ml özütün 72 saatte oluşturduğu sitotoksik etki oranına yaklaştığı gözlenmiştir. Yine aynı şekilde 1,25 ve 0,6 mg/ml muamele edilen hücrelerde 24 ve 48 saatlerde çok düşük sitotoksik etki gözlenirken, 72 saatteki etkilerinin %40 ve %50'ye yükseldiği gözlenmiştir (Şekil 3.1). HSA özütünün; 24, 48 ve 72 saat A549 hücreleri ile inkübasyonları sonrası, uygulanan tüm dozlarda A549 hücrelerinde meydana gelen sitotoksik etki, inverted mikroskop altında izlenmiştir (Şekil 3.2; 3.3; 3.4).



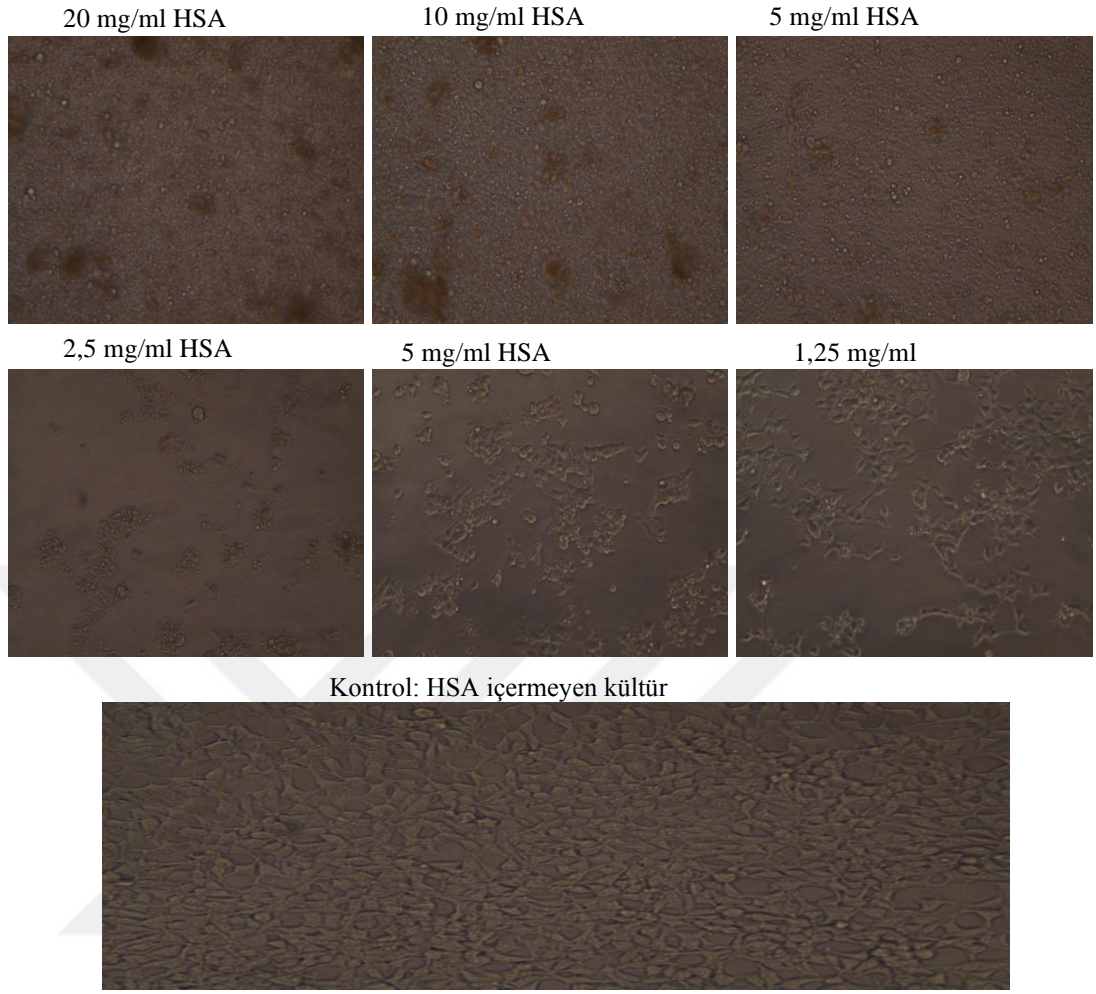
Şekil 3.1. 20, 10, 5, 2,5, 1,25 ve 0,6 mg/ml HSA özütünün 24-48-72 saat inkübasyonları sonrasında A549 hücre hattı üzerinde sitotoksiste etkisi.



Şekil 3.2. Farklı dozlardaki HSA özütüne 24 saat maruz kalan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)



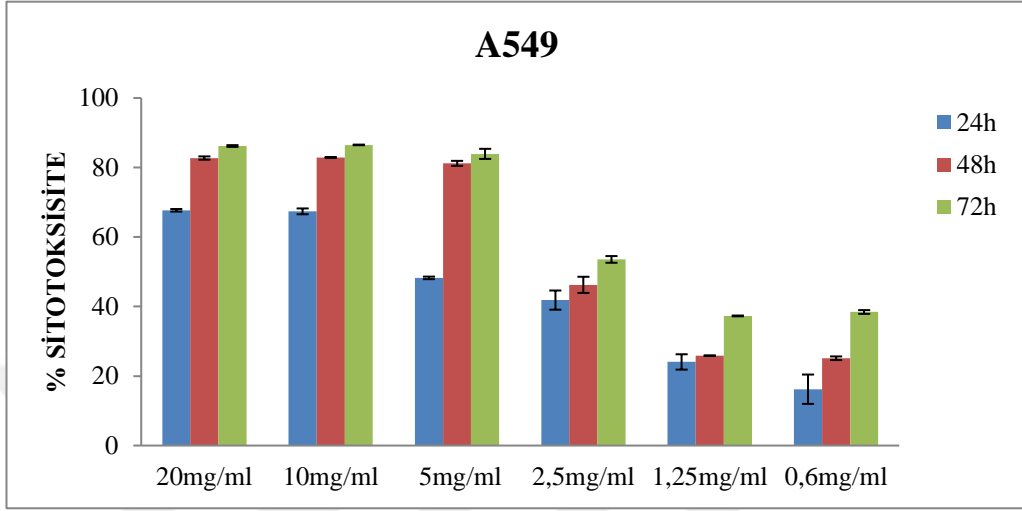
Şekil 3.3. Farklı dozlardaki HSA özütüne 48 saat maruz kalan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)



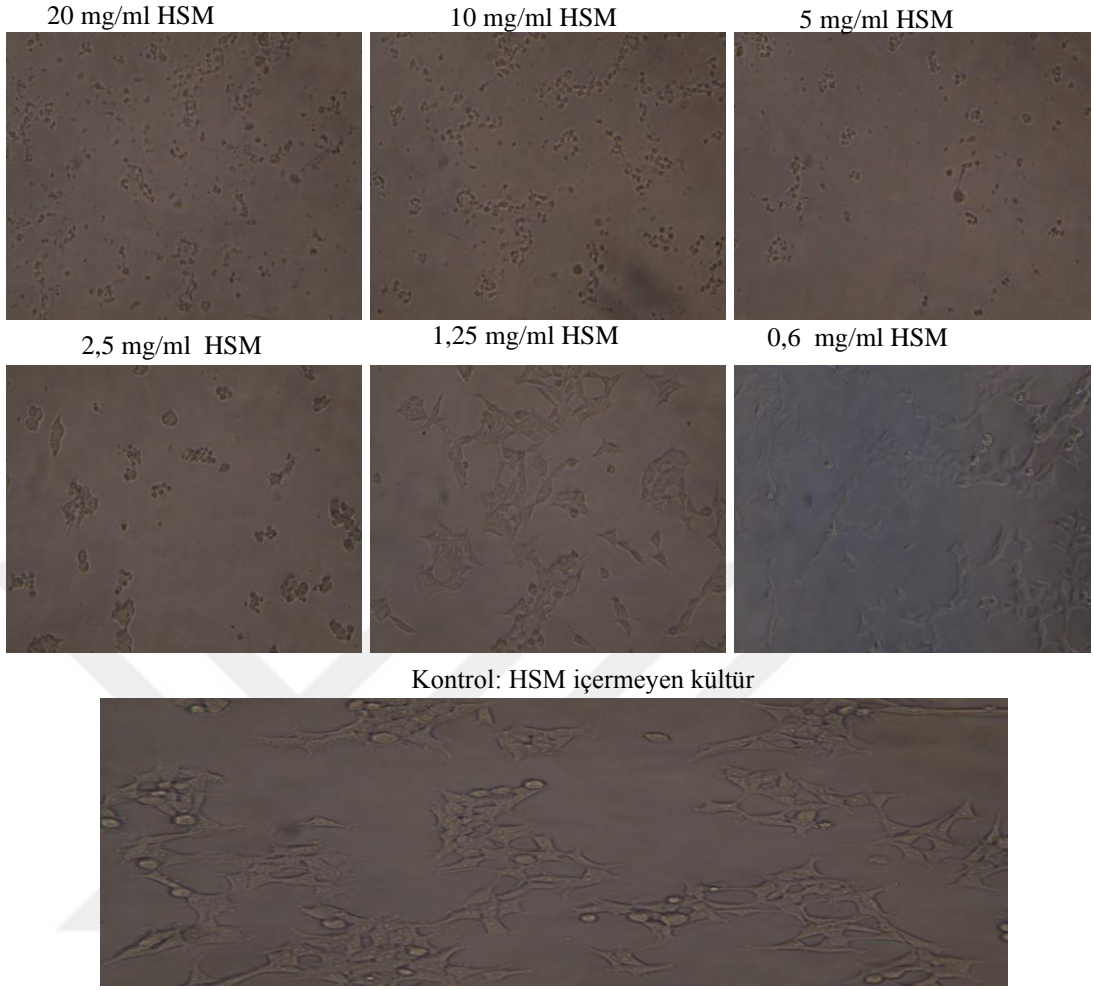
Şekil 3.4. Farklı dozlardaki HSA özütüne 72 saat maruz kalan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)

A549 hücre hattı, HSM (*Holothuria sanctori* metanol) ile hazırlanan 20, 10, 5, 2,5, 1,25 ve 0,6 mg/ml şeklinde 6 farklı şekilde özüt konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve özütün 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası, oluşturduğu sitotoksik etkilere bakılmıştır. Buna göre 20, 10 ve 5 mg/ml ile muamele edilen hücrelerde, inkübasyon sürelerinin tümünde %50'den fazla sitotoksik etki gösterdiği ve bu üç konsantrasyonun A549 hücre hattı üzerinde etkilerinin benzer olduğu gözlenmiştir. En yüksek sitotoksik etki 72 saatte %87 oranında 20 mg/ml ile muamele edilen hücrelerde tespit edilmiştir. 2,5 mg/ml ile muamele edilen hücrelerde 24 saatte %43 sitotoksik etki gözlenirken, bu oranın 48 ve 72 saatlerde %60'a yaklaştığı ve benzer oranda etki ettiği gözlenmiştir. 1,25 ve 0,6 mg/ml ile muamele edilen hücrelerde, inkübasyon sürelerinin tamamında sitotoksik etkinin %50'nin altında olduğu

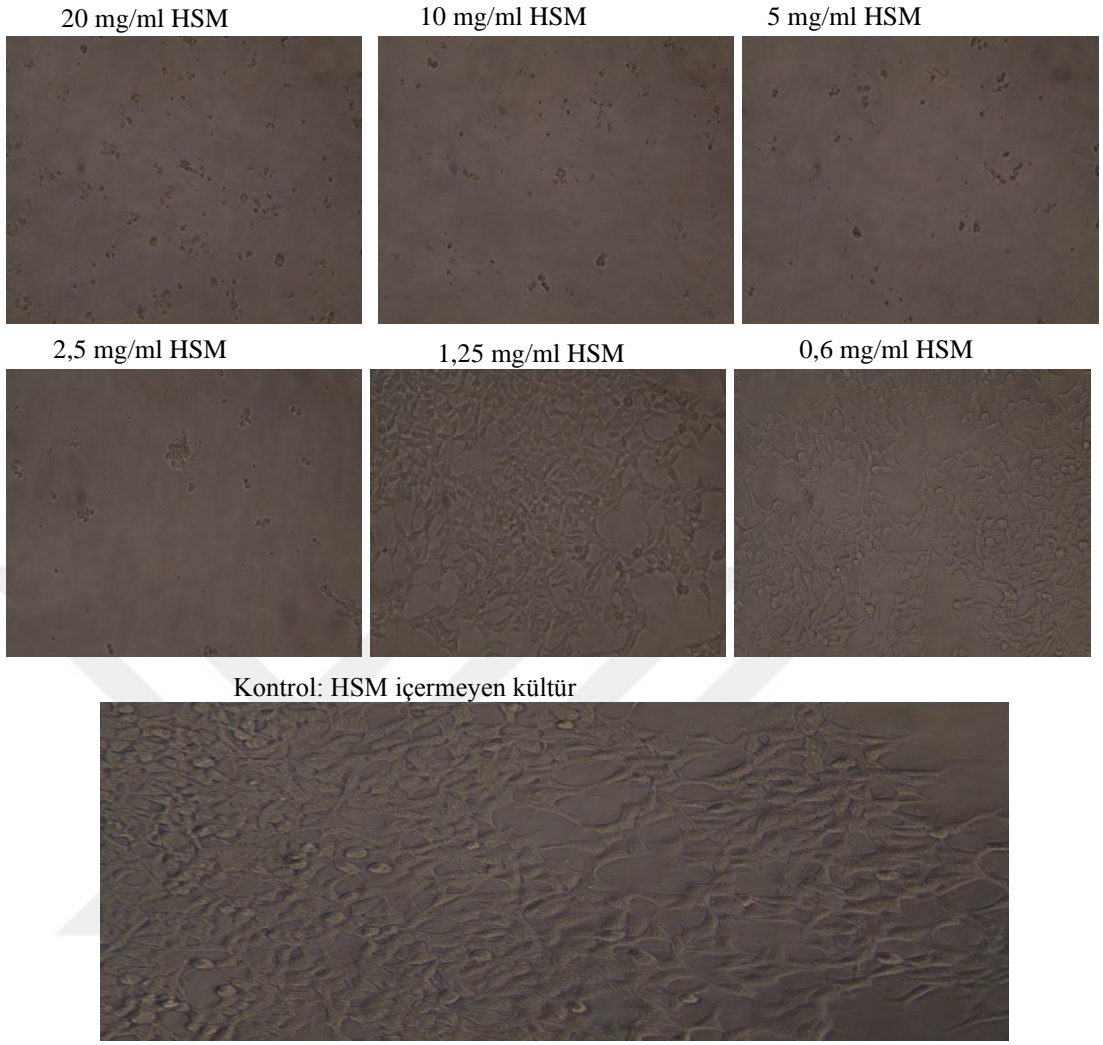
belirlenmiştir (Şekil 3.5). HSM özütünün; 24, 48 ve 72 saat A549 hücreleri ile inkübasyonları sonrası, uygulanan tüm dozlarda A549 hücrelerinde meydana gelen sitotoksik etki, inverted mikroskop altında izlenmiştir (Şekil 3.6; 3.7; 3.8).



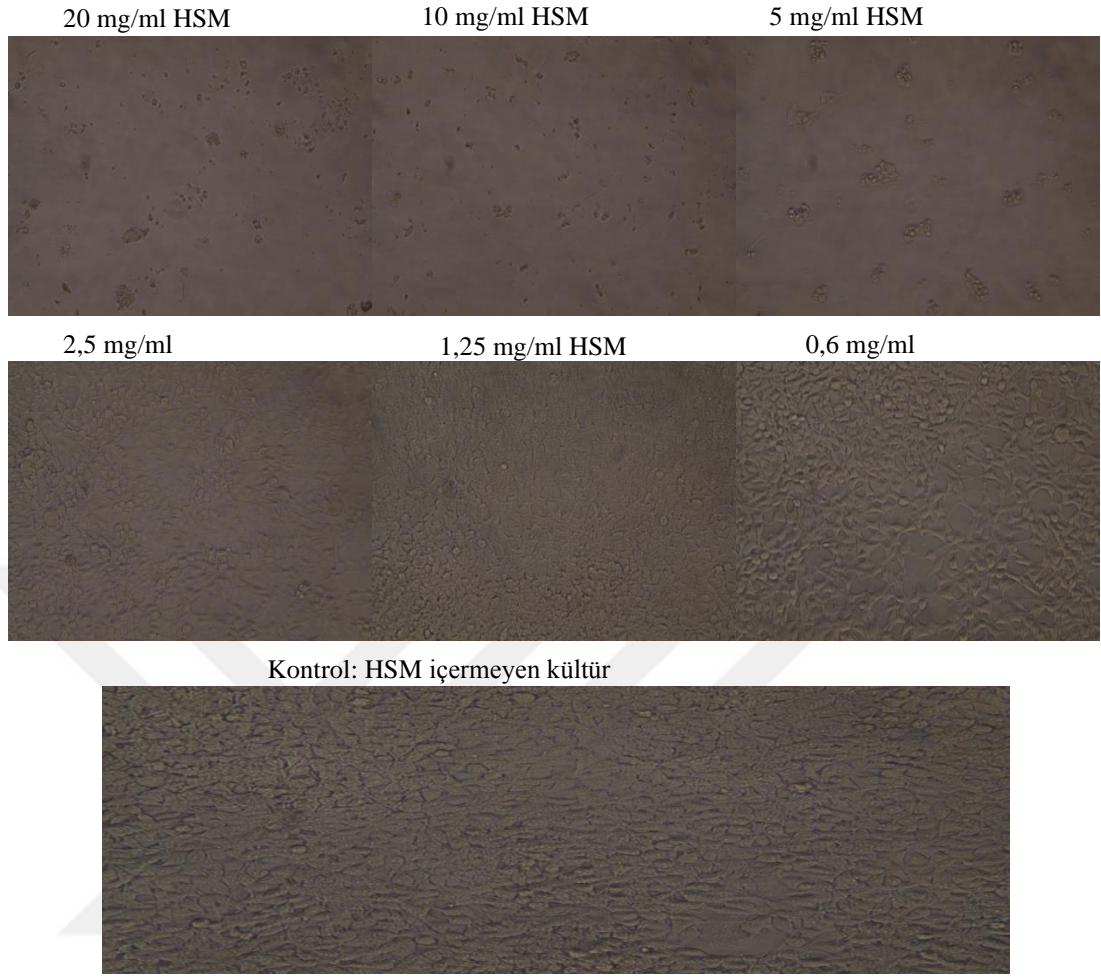
Şekil 3.5. HSM özütünün farklı konsantrasyonlar ile A549 kücre hattı üzerinde doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi



Şekil 3.6. Farklı dozlardaki HSM özütüne 24 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)



Şekil 3.7. Farklı dozlardaki HSM özütüne 48 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)



Şekil 3.8. Farklı dozlardaki HSM özütüne 72 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)

HSA ve HSM özütlerinin A549 hücre hattı üzerinde 24, 48, 72 saatlerdeki IC_{50} değerleri çizelge 3.1.1’de gösterilmiştir. İlk 24 saatlik inkübasyonda her iki özütün IC_{50} değeri 6 mg/ml olmasına rağmen, ilerleyen saatlerde HSA’nın IC_{50} değeri 48 ve 72 saatlerde sırasıyla 2.4 ve 1.7 mg/ml iken; HSM’nin aynı saatlerdeki IC_{50} değeri sırasıyla 3 ve 2.2 mg/ml’dir.

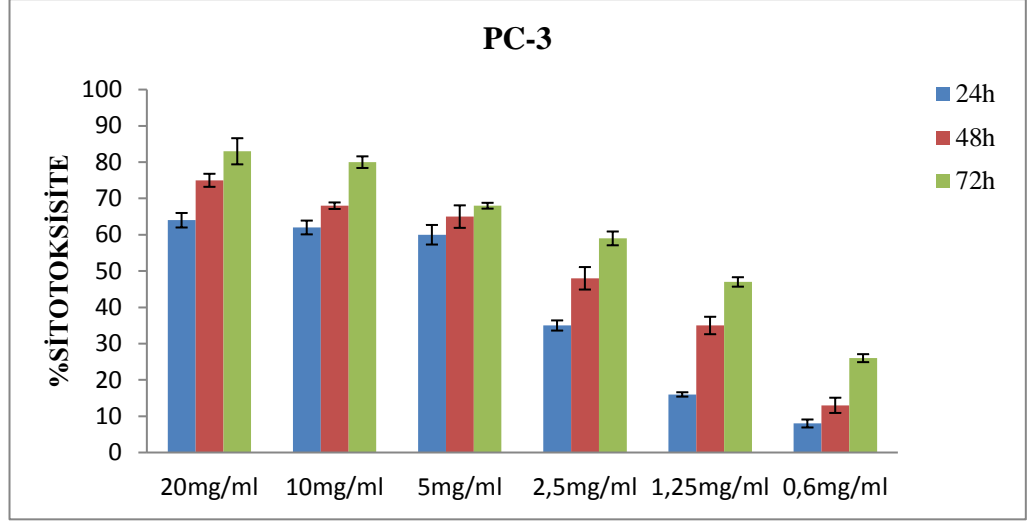
Çizelge 3.3.1. HSM ve HSA özütlerinin A549 hücre hattı üzerinde belirlenen IC_{50} (mg/ml) değerleri

Özütler (mg/ml)/ Zaman	24h	48h	72h
HSM	6	3	2,2
HSA	6,1	2,4	1.7

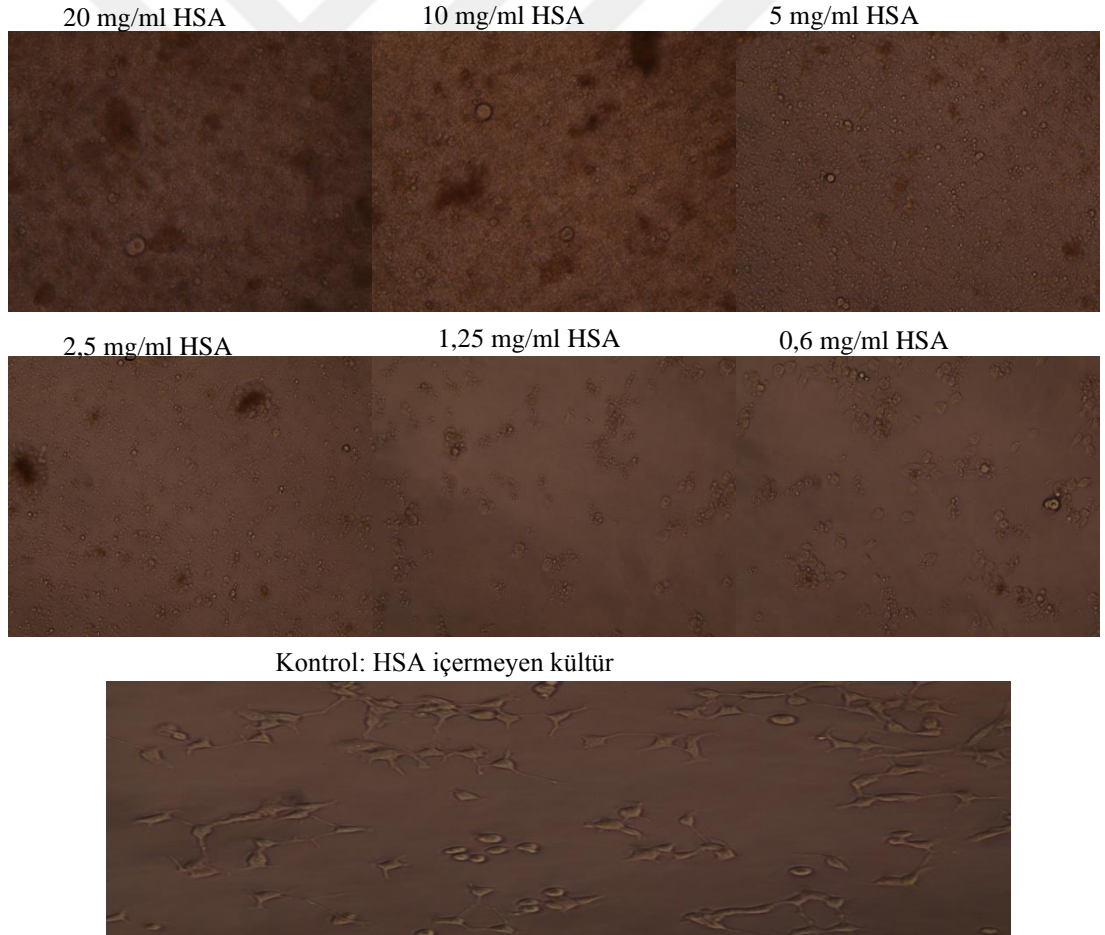
Sonuç olarak HSA ve HSM ile aynı konsantrasyonlarda hazırlanan özütlerin, A549 hücre hattı üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkinin, 20 ve 10 mg/ml ile benzer oranlarda olduğu, 5 mg/ml HSM ile hazırlanan özütün yine HSA 20 ve 10 mg/ml özüt ile benzer sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. 2,5 mg/ml ile hazırlanan HSA ve HSM özütünün inkübasyon sürelerinde benzer sitotoksik etki gösterirken, HSA'nın 1,25 mg/ml olan özütünün sadece 72 saatte %50 sitotoksik etki gösterdiği, HSM'nin 1,25 ve 0,6 mg/ml ile olan özütünün, inkübasyon sürelerinin tamamında sitotoksik etkisinin %50'nin altında olduğu gözlenmiştir. Her iki şekilde hazırlanan özütün A549 hücre hattı için zamana bağlı olarak sitotoksik etkilerinin arttığı söylenebilir.

3.1.2. PC-3 kanser hücre hattı üzerinde özütlerin doz ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkileri

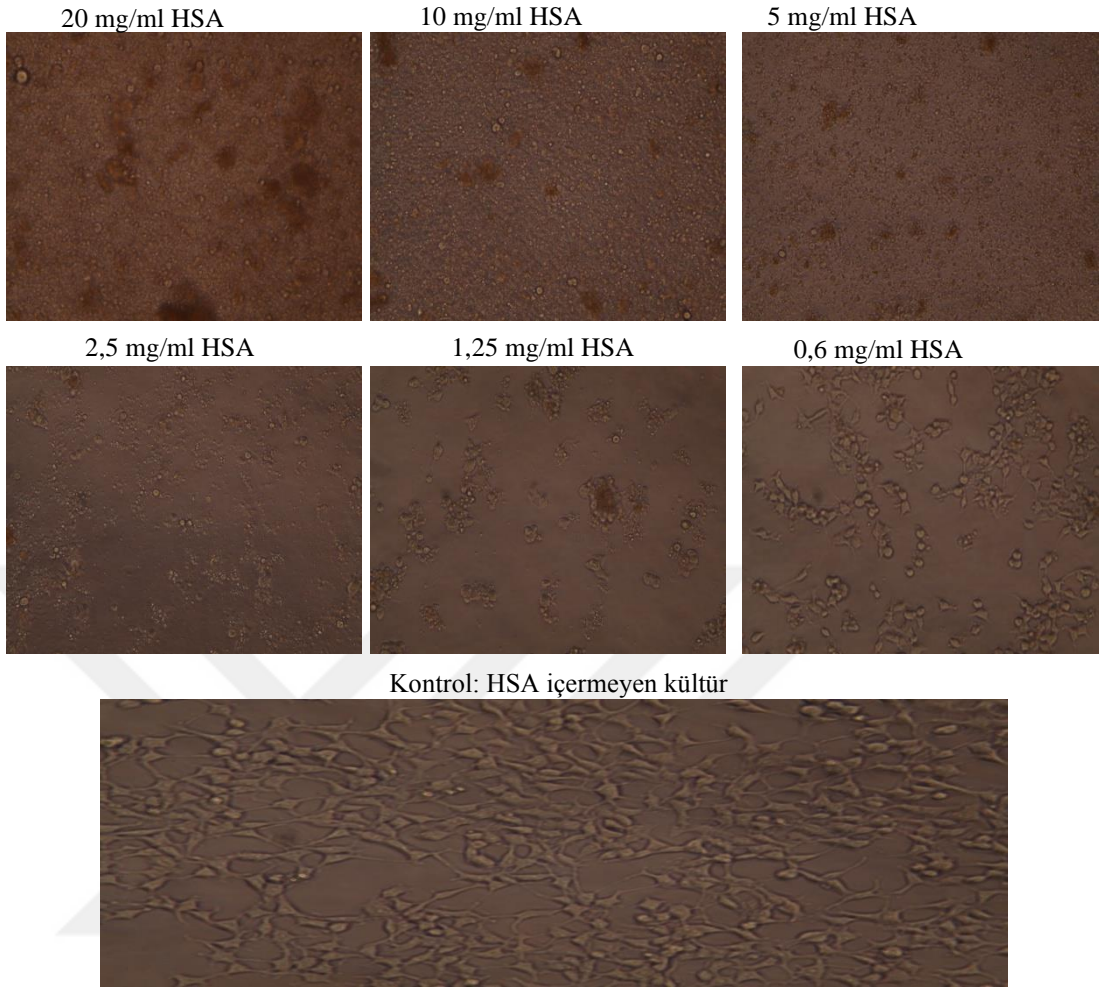
PC-3 hücre hattı, HSA(*Holothuria sanctori* aseton)'nın altı farklı konsantrasyonuna (20, 10, 5, 2.5, 1.25 ve 0.6 mg/ml) maruz bırakılmış ve özütün 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası, hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etkilere bakılmıştır. Buna göre 20, 10, ve 5 mg/ml özüt ile muamele edilen hücrelerde sitotoksik etkinin birbirine yakın olduğu, en yüksek sitotoksik etkinin 20 mg/ml ile hazırlanan özütte 72 saatte %83 oranında görüldüğü gözlenmiştir. Yüksek üç doz için sitotoksik etkinin 24 ve 48 saatlerde %60'a yakın veya daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 1,25 ve 0,6 mg/ml ile muamele edilen hücrelerde 24 ve 48 saatlerde %30'un altında gözlenirken, 72 saatte bu sitotoksik etkinin %45'in üstüne çıktığı gözlenmiştir.(Şekil 3.9). HSA özütünün; 24, 48 ve 72 saat A549 hücreleri ile inkübasyonları sonrası, uygulanan tüm dozlarda PC-3 hücrelerinde meydana gelen sitotoksik etki, inverted mikroskop altında izlenmiştir (Şekil 3.10; 3.11; 3.12).



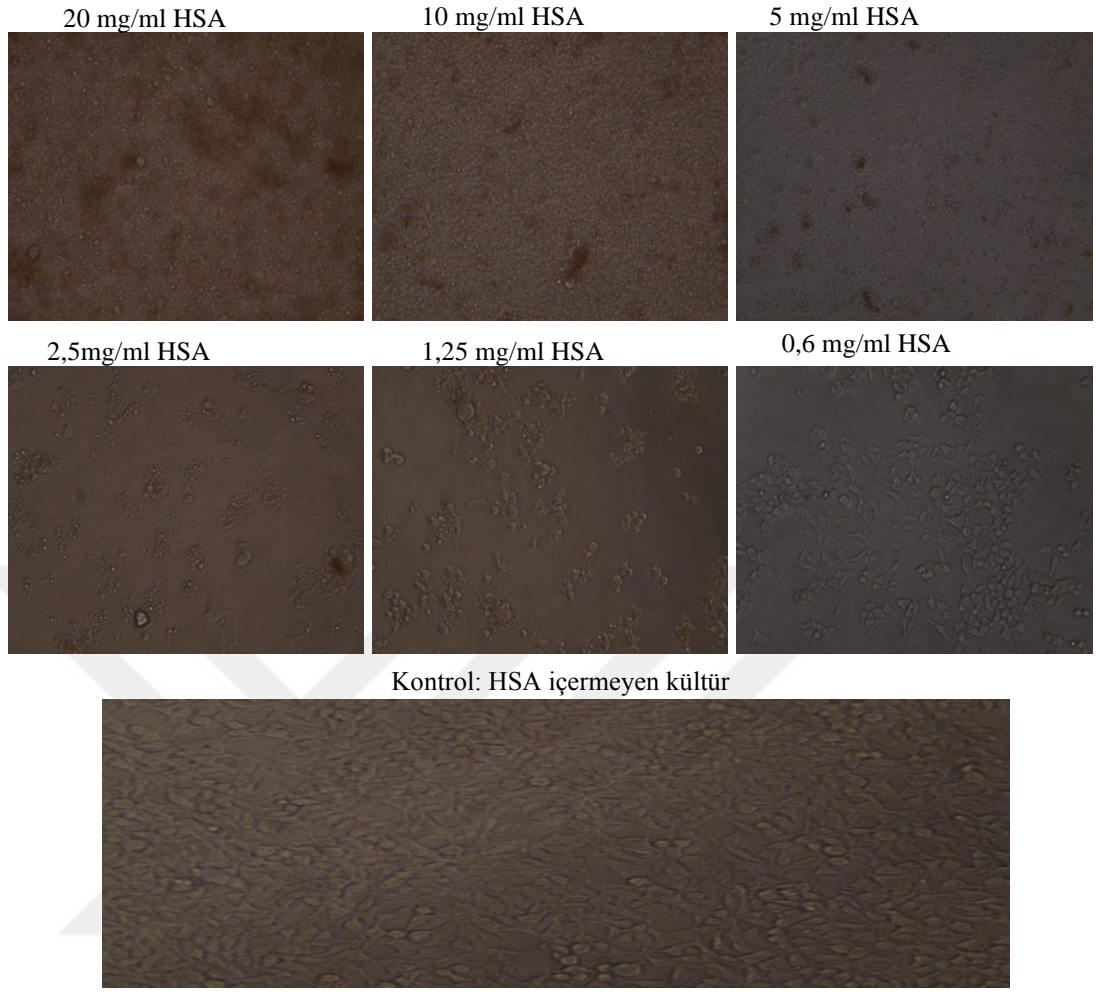
Şekil 3.9. HSA özütünün farklı konsantrasyonlar ile PC-3 hücre hattı üzerinde doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi



Şekil 3.10. Farklı dozlardaki HSA özütüne 24 saat maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)



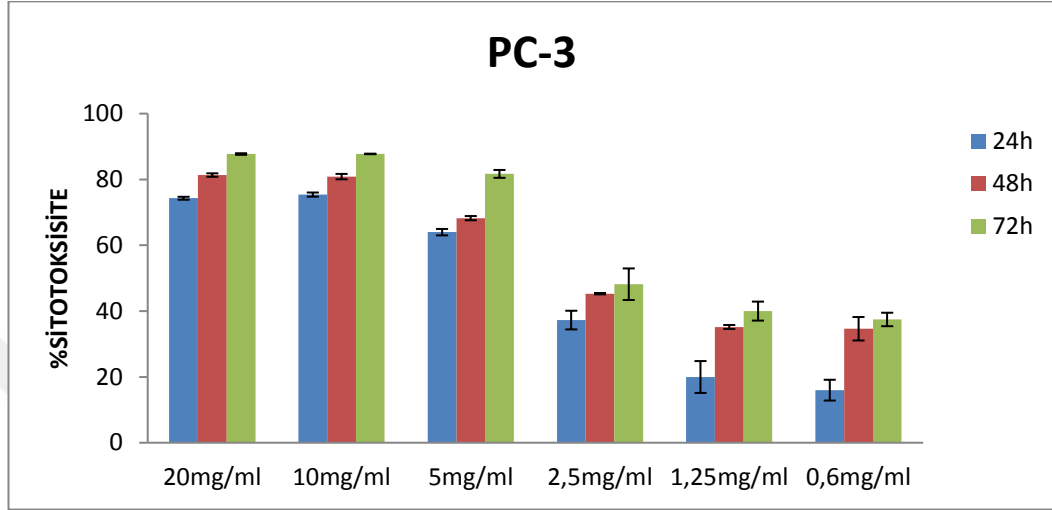
Şekil 3.11. Farklı dozlardaki HSA özütüne 48 saat maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)



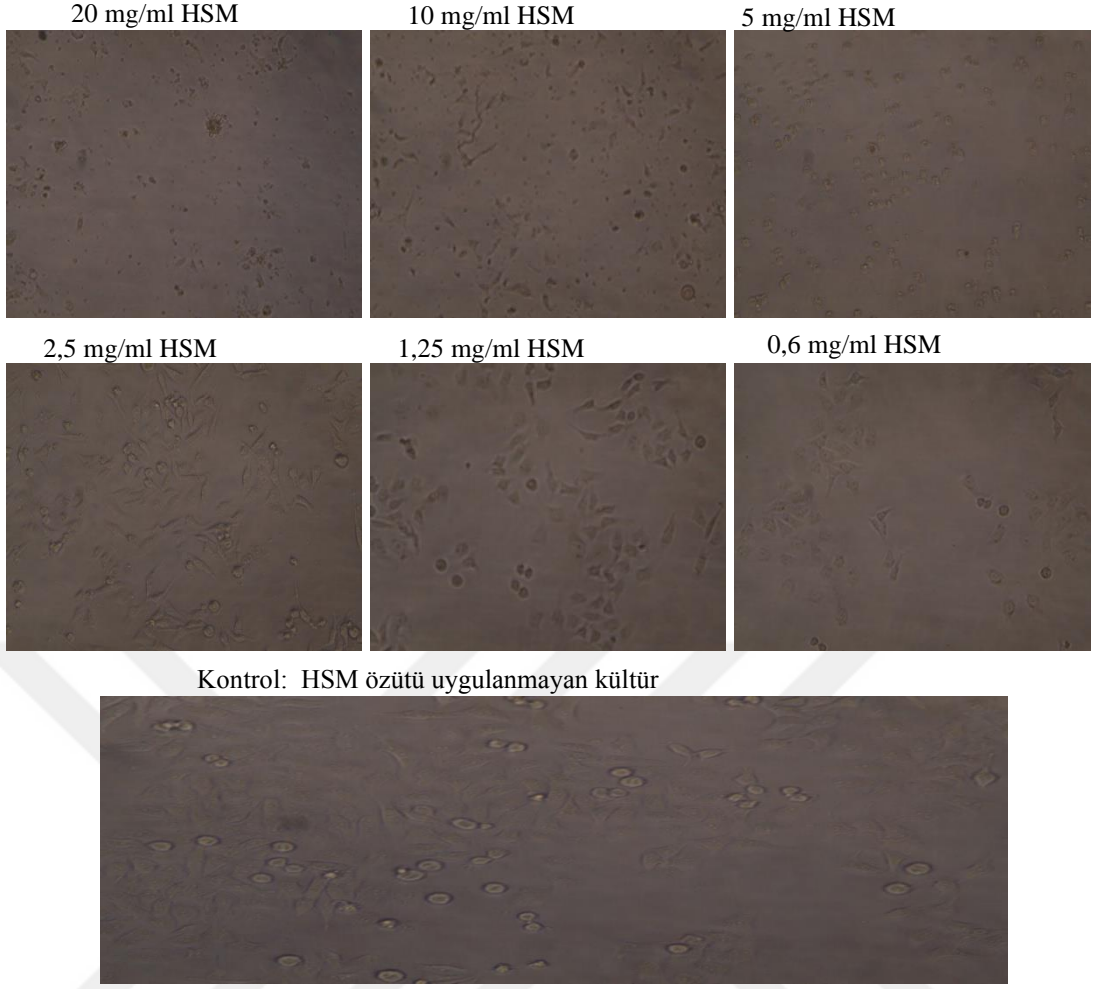
Şekil 3.12. Farklı dozlardaki HSA özütüne 72 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)

PC-3 hücre hattı, HSM (*Holothuria sanctori* metanol) özütünün altı farklı konsantrasyonuna (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 mg/ml) maruz bırakılmış ve özütün 24, 48 ve 72 saatteki hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etkilere bakılmıştır. Buna göre 20, 10, ve 5 mg/ml ile muamele edilen hücrelerde inkübasyon sürelerinin tamamında sitotoksik etkinin %63'ün üzerinde gözleendiği, en yüksek sitotoksik etkinin 20 mg/ml ile hazırlanan özütte, 72 saatte %88 oranında olduğu gözlenmiştir. Yine aynı şekilde 5 mg/ml ile muamele edilen hücrelerde, 24 ve 48 saatteki sitotoksik etkinin birbirine yakın olduğu, 72 saatte %80 olduğu gözlenmiştir. Diğer bir deyişle, 5mg/ml HSM özütü, PC-3 hücrelerinin 72 saatlik inkübasyonunda, 20 mg/ml HSM özütünde gözlenen sitotoksik etkiye yakın sonuç göstermiştir. Diğer üç alt dozlarda hazırlanan özütlerde ise sitotoksik etkinin %40'ın altında olduğu tespit

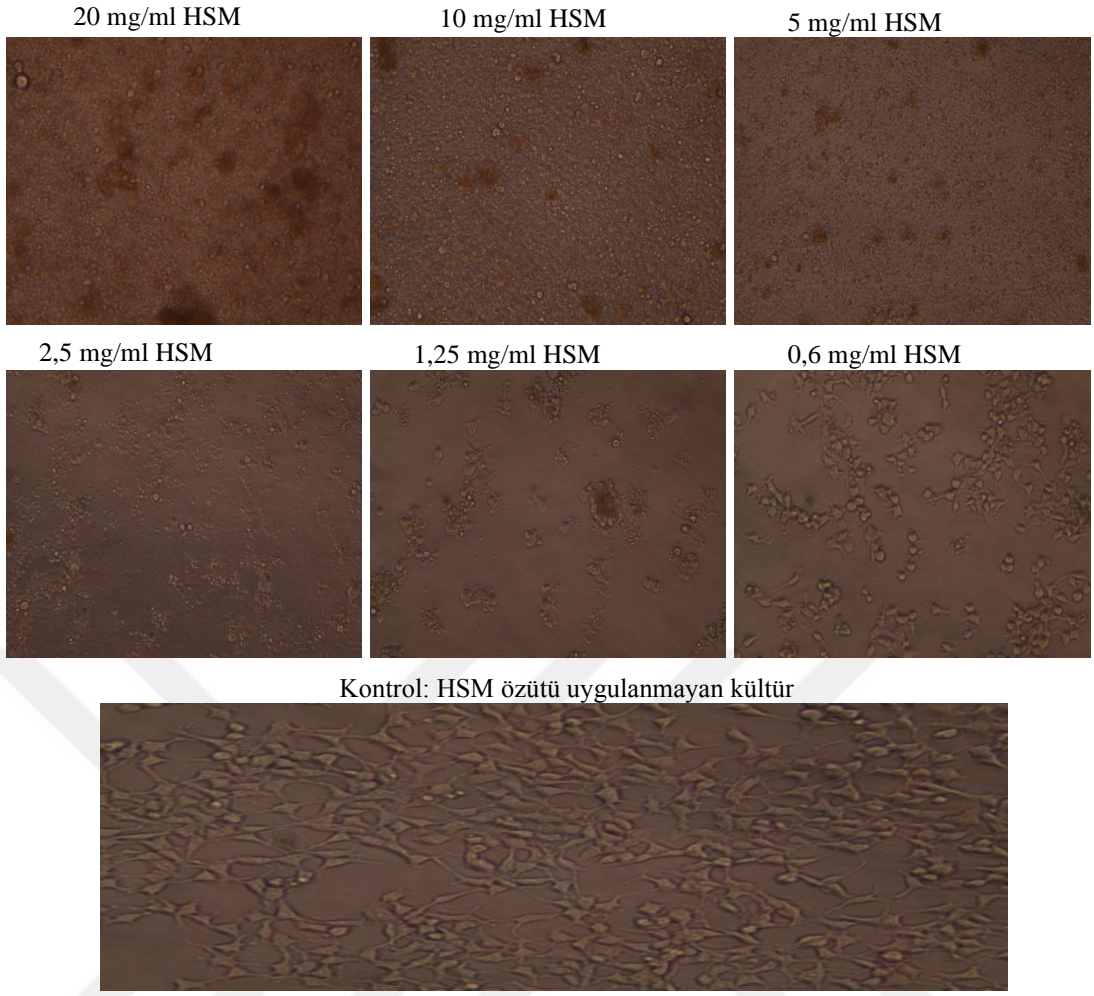
edilmiştir (Şekil.3.13). HSM özütünün; 24, 48 ve 72 saat A549 hücreleri ile inkübasyonları sonrası, uygulanan tüm dozlarda PC-3 hücrelerinde meydana gelen sitotoksik etki, inverted mikroskop altında izlenmiştir (Şekil 3.14; 3.15; 3.16).



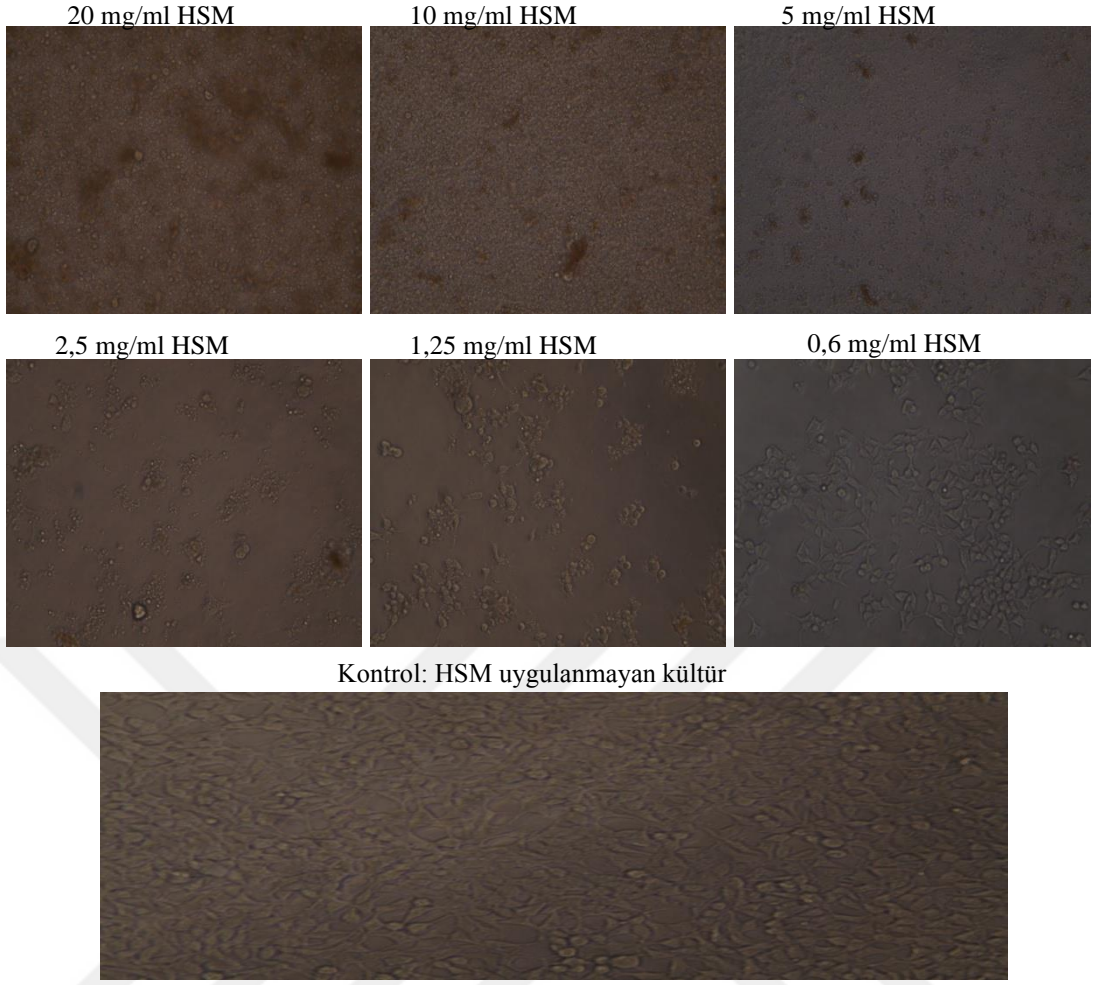
Şekil 3.13. HSM özütünün farklı konsantrasyonlar ile PC-3 hücre hattı üzerinde doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi



Şekil 3.14. Farklı dozlardaki HSM özütüne 24 saat maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)



Şekil 3.15. Farklı dozlardaki HSM özütüne 48 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)



Şekil 3.16. Farklı dozlardaki HSM özütüne 72 saat maruz bırakılan PC-3 hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görünümü (x40 büyütme)

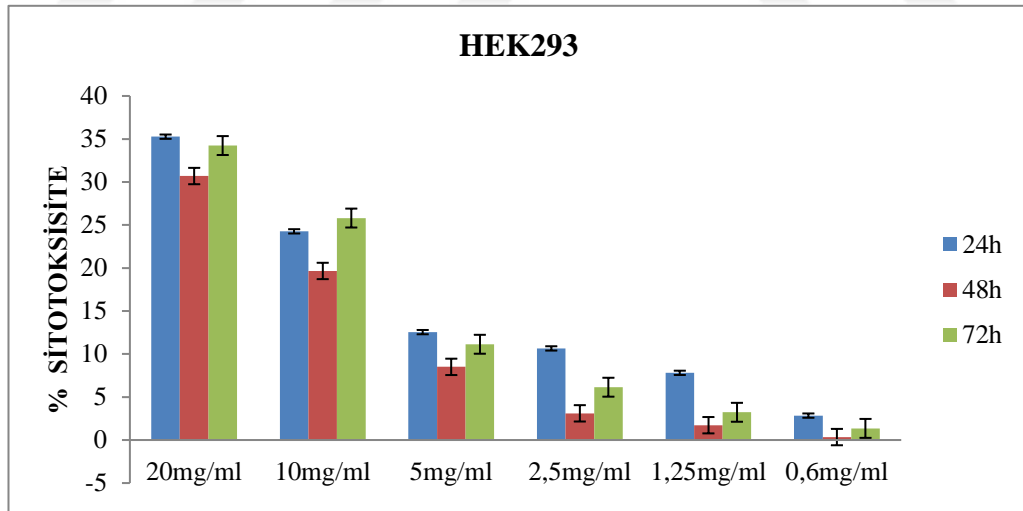
Sonuç olarak, HSA ve HSM ile aynı konsantrasyonlarda hazırlanan özütlerin, PC-3 hücre hattı üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkiye bakıldığında, her iki özütünde ilk üç yüksek dozlarının birbirine yakın sitotoksik etki gösterdiği gözlenirken, 2,5 mg/ml HSA ile hazırlanan özütün de bunlara yakın etki gösterdiği belirlenmiştir. 1,25 mg/ml ve 0,6 mg/ml olarak hazırlanan HSA özütünün 72 saatteki sitotoksik etkisinin %45'in üstüne çıktığı ancak; HSM'nin aynı konsantrasyonlardaki özütünün inkübasyon sürelerinin tamamındaki sitotoksik etkisinin %40'ın altında kaldığı gözlenmiştir. HSM ve HSA ile hazırlanan özütlerin PC-3 hücre hattı için zamana bağlı olarak sitotoksik etkilerinin arttığı söylenebilir. Ayrıca, HSA ve HSM özütlerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerindeki IC₅₀ değerleri kıyaslandığında, her iki özütünde benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Çizelge 3.1.2).

Çizelge 3.3.2. HSM ve HSA özütlerinin PC-3 hücre hattı üzerinde belirlenen IC₅₀(mg/ml) değerleri

Özütler(mg/ml) / Zaman	24h	48h	72h
HSM	3,6	2,4	1,7
HSA	4	2.8	1,2

3.1.3. HEK293 sağlıklı hücre hattı üzerinde özütlerin sitotoksik etkileri

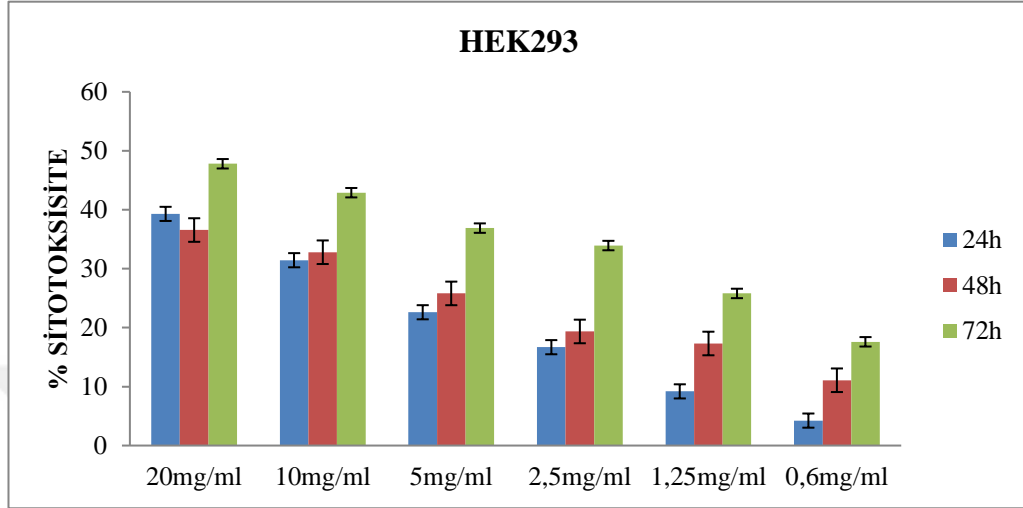
HEK293 sağlıklı hücre hattı HSM ile muamele edilen hücrelerin 24, 48 ve 72 saatteki sitotoksik etkilerine bakıldığında, sitotoksik etkinin genel olarak %35'in altında kaldığı ve en yüksek sitotoksik etkinin 24 saatte 20 mg/ml ile hazırlanan özütte görüldüğü ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkinin azaldığı gözlenmiştir. Kısacası; HSM özütünün A549 ve PC-3 kanser hücrelerini normal hücre hattı HEK293'e kıyasla anlamlı bir şekilde seçici olarak öldürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. HSM özütünün HEK293 sağlıklı hücre hattı üzerindeki doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi

Benzer şekilde, HSA ile muamele edilen HEK293 sağlıklı hücre hattında ise sitotoksik etkinin bütün konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde %50'nin altında kaldığı, en yüksek sitotoksik etkinin 24 saatte %48 oranında görüldüğü gözlenmiştir.

Buna karşın; HSA ile hazırlanan özütte HSM'den farklı olarak sitotoksik etkinin 72 saatte %48-%18 arasında değiştiği ve zamana bağlı olarak arttığı kaydedilmiştir (Şekil 3.18).



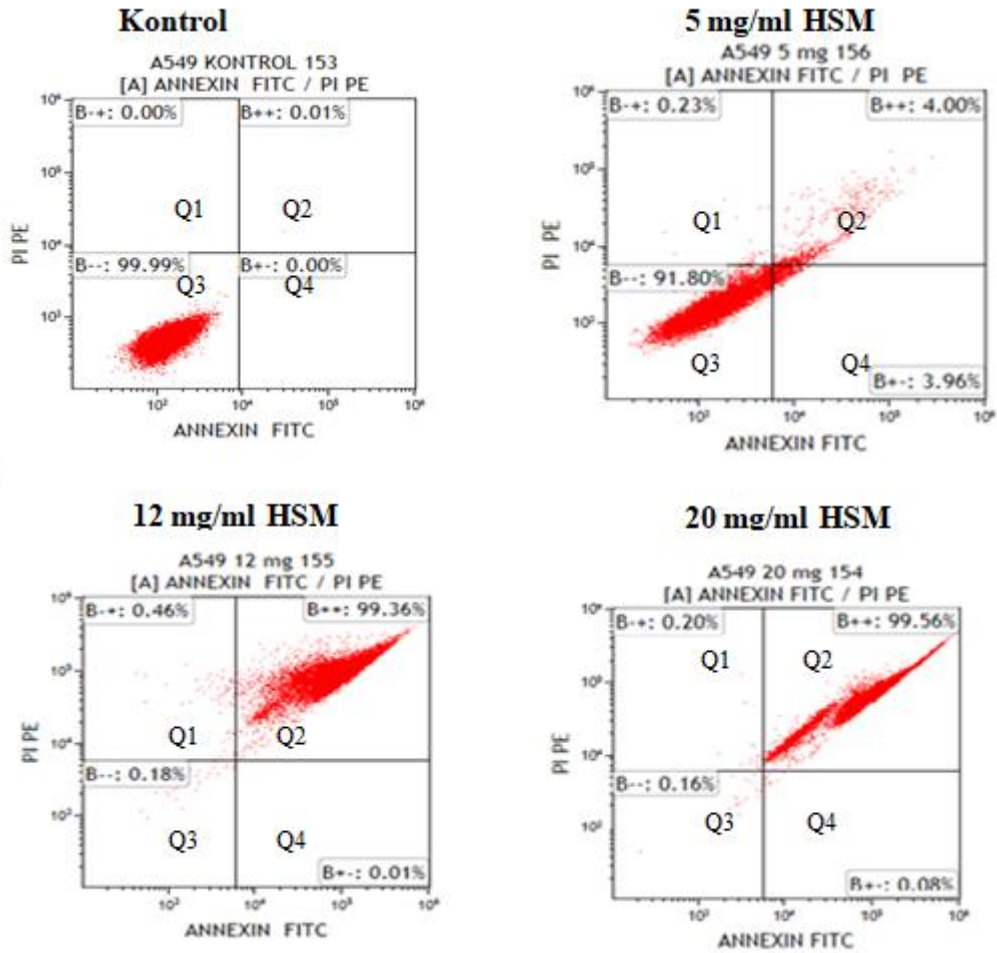
Şekil 3.18. HSA özütünün HEK293 sağlıklı hücre hattı üzerindeki doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi

3.2. Denizhiyari *Holothuria sanctori* Özütlerinin Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Flow Sitometri Analizi İle Belirlenmesi

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak bilinmektedir. Hem gelişimsel morfogenezde rol oynar, hem de hücre sayısını kontrol eder. Apoptoz, önemli tümör baskılama mekanizmasıdır. Bu işlemin yanlış düzenlenmesi tümör oluşumuna yol açar. Diğer hücre ölüm mekanizmalarından nekroz ve otofaji ise hücre stres altına girdiğinde ortaya çıkan ölümlerdir. Kanser tedavisinde geliştirilen ilaçların en önemli özelliği, kanser hücrelerinde apoptozu uyarmaları ve hücre ölümlerine neden olmalarıdır. Bu nedenle, sitotoksik etkisi kanser hücreleri A549 ve PC-3 üzerinde tespit edilen HSM ve HSA özütlerinden sadece HSM özütünün apoptotik hücre ölümüne yol açıp açmadıkları, flow sitometri analizi ile araştırılmıştır. Annexin V (FITC) / PI (PE) ismiyle alınan iki renk ticari kit ile protokole göre A549 hücre hattı 20-12-5 mg/ml, PC-3 hücre hattı ise 20-8-4 mg/ml şeklinde üç doz HSM özütü ile muamele edilen hücreler bu boyalarla boyanmış ve 24 saat sonraki apoptotik etkilere bakılmıştır.

3.2.1. A549 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri

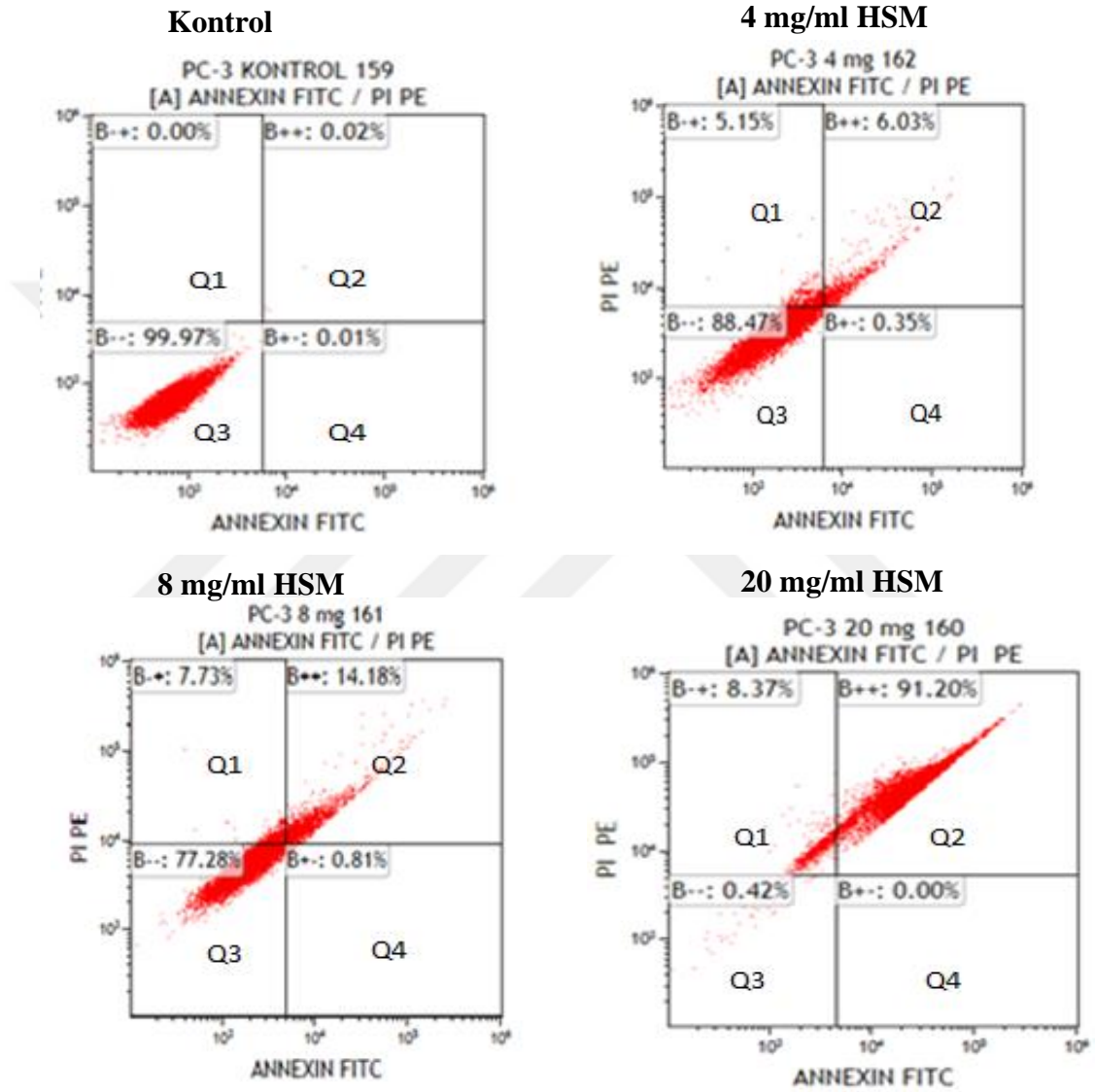
Flow sitometrik analizde Q3'te canlı hücreler, Q4'te erken apoptozdaki hücreler, Q2'de geç apoptozdaki hücreler ve Q1'de nekroza giden hücreler oransal olarak gösterilmektedir. HSM'nin farklı konsantrasyonlarına 24 saat maruz bırakıldığında 5 mg/ml'de hücrelerin %91.8'i canlı, %3.9'u erken apoptozdaki hücreleri, %4'ü ise geç apoptozdaki hücreleri göstermektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (12 ve 20 mg/ml) ise %99 hücre geç apoptozda yer almıştır. HSM özütünün A549 hücrelerini apoptoza sürüklediğini göstermektedir (Şekil 3.19).. Özüte daha kısa süreli maruziyet erken apoptozdaki hücre popülasyonunu da gösterebilir.



Şekil 3.19. Farklı konsantrasyonlardaki HSM özütünün A549 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerinin flow sitometri analizi

3.2.2. PC-3 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerin araştırılması

Benzer şekilde, farklı konsantrasyonlardaki HSM özütüne maruz kalan PC-3 kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümü olduğu gözlenmiştir. 20 mg/ml'de hücrelerin %91'i geç apoptotik hücrelerdir (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. Farklı konsantrasyonlardaki HSM özütünün PC-3 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerinin flow sitometri analizi

3.3. Kaspaz -3 aktivitesi

Kaspazlar, apoptozu indükleyen ve sistein içeren proteazlardır. Hücrede inaktif olarak bulunan kaspazlar, 100 farklı hedef proteini keserek apoptoza neden olurlar ve aynı zamanda DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Bu deney apoptoz sırasında aktive edilen kaspaz-3 tarafından DEVD-pNA bağının kesilmesiyle hücre içinde oluşan serbest p-nitrolanilide(pNA) miktarının ölçülmesine dayanır. Kaspaz-3 deneyi “Caspase-3 Colorimetric assay kit” (ab39401 Abcam, USA) kiti kullanılarak yapılmıştır. A549 ve PC-3 hücreleri 2×10^6 hücre/kuyucuk konsantrasyonda 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra hücreler 15 mg/ml konsantrasyondaki özüt ile 36-48 saat inkübe edilmiştir. Özüt eklenmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. 15 mg/ml HSM özütü ile muamele edilen A549 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrol hücreleri ile kıyaslandığında yaklaşık 2.1 kat arttığı belirlenmiştir. PC-3 hücrelerin de ise bu değerlerin 1.9 kat olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.21). Bulunan bu değerler, HSM özütünün A549 ve PC-3 hücre hattında apoptozu indüklediğini ve flow sitometri analizi ve MTT deneyi sonuçlarına göre elde edilen verilerle de tutarlı olduğu söylenebilir.



Şekil 3.21. 15 mg/ml HSM özütü ile muamele edilen A549 ve PC-3 hücre hattında kaspaz-3 aktivitesi. K: kontrol; Ö: özüt.

3.4. HS özütünün, kanser hücre hatları üzerinde, kanser ilaçlarıyla sinerjistik etkisinin incelenmesi

Günümüzde kemoteröpatik ilaçların bitkisel ekstraktlarla kombinasyonel tedavisinin aynı kanser etkisini elde etmek için kullanılan kemoteröpatik ilacın konsantrasyonunu düşürdüğünü gösteren çalışmalar yapılmaktadır. Denizhıyarlarının da içerdikleri etken maddeler nedeniyle anti-proliferatif, anti-inflamatuar ve apoptoz gibi pek çok biyolojik aktivitede yer aldığı bilinmektedir. Dolayısıyla, bazı kanser hücreleri üzerinde denizhıyarı özütlerinin sitotoksik etki göstermesi, bu özütlerin geleneksel kanser ilaçlarıyla etkileşime girip, sitotoksik aktivite üzerinden sinerjistik etki gösterip göstermeyeceği araştırılmıştır. Bu amaçla A549 ve PC-3 kanser hücre hatları, HSM ve HSA özütlerinin farklı dozları ve geleneksel kemoterapi ilaçlarıyla (Cisplatin ve Docetaxel) kombine edilerek sinerjistik etkileşim olup olmadığına bakılmıştır.

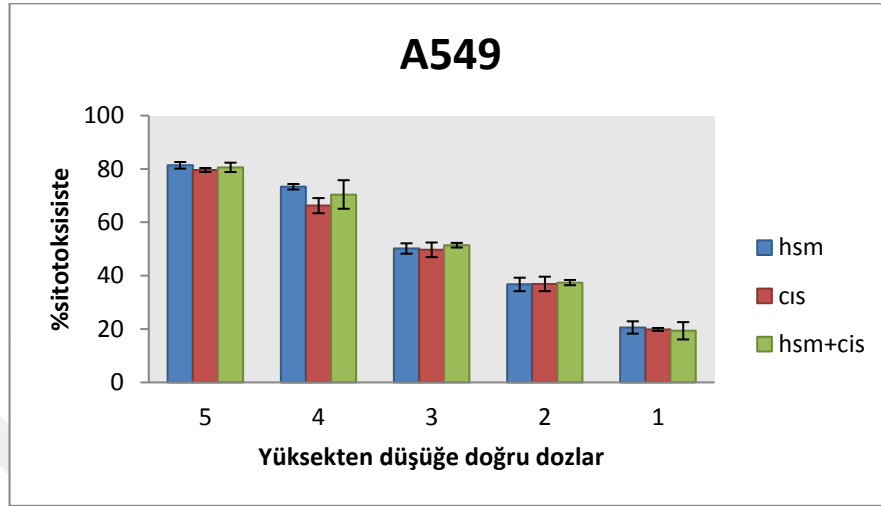
3.4.1. A549 kanser hücre hattı üzerinde HSM özütünün, cisplatin ve docetaxel ile sinerjistik etkisinin araştırılması

A549 hücre hattı beş farklı doz ve konsantrasyonda, önce sadece HSM ve sadece Cisplatin, sonra HSM+Cisplatin kombine üç tekrarlı olacak şekilde muamele edilmiştir. Daha sonra 24 saat inkübasyona bırakılmış ve MTT yöntemiyle de elde edilen değerler verilerin kombinasyonel indeksi Chou ve Talalay (1984) 'a göre hesaplanmıştır.

Deney kombinasyonu HSM özütünün IC_{50} (6mg/ml) değerinin iki alt ve iki üst değeri (24-12-6-3-1.5 mg/ml) şeklinde, yine benzer şekilde Cisplatin'de IC_{50} (288 μ M olan değer 200 μ M olarak alındı) değerinin iki alt ve iki üst değeriyle (600 μ M, 400 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M) oluşturulmuştur.

Bunun sonucunda HSM için 24-12 mg/ml ile muamele edilen hücrelerde sitotoksik etkinin %65'in üzerinde olduğu, Cisplatin 600-400 μ M ile muamele edilen hücrelerde de yine %60'ın üzerinde olduğu gözlenmiştir. HSM+ Cisplatin 'in en yüksek dozu ile muamele edilen hücrelerde sitotoksik etkinin %80 olduğu gözlenirken, HSM ile tek başına maruz bırakılan hücrelerde bu oranın %83 olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.22). Yine aynı şekilde diğer kombinasyonlarda da benzer

sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre HSM'nin cisplatin ile sinerjistik etkisinin bulunmadığı, aksine yapılan hesaplama sonucu antagonizm etkisinin olduğu gözlenmiştir.



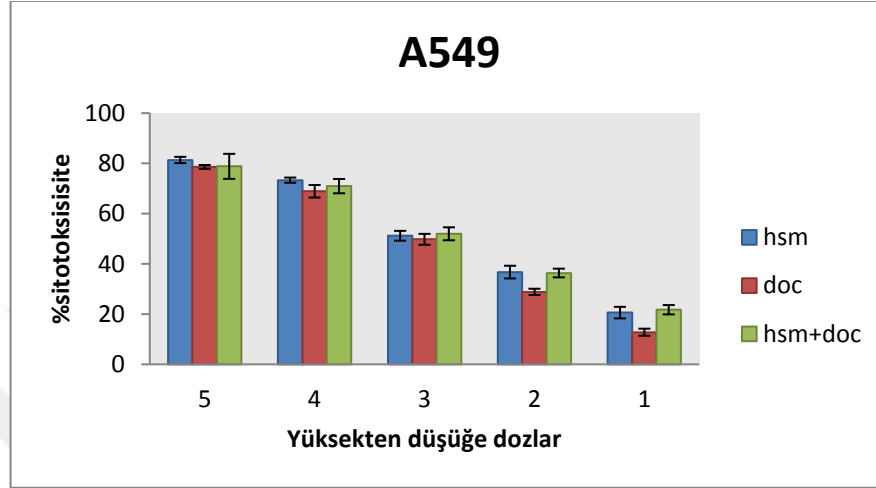
şekil 3.22. 24 saat inkübasyon sonrası HSM özütünün Cisplatin ile A549 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi (5:24mg/ml HSM(mavi bar), 600 μ M Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar),4:12mg/ml HSM(mavi bar), 400 μ M Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 3:6mg/ml HSM(mavi bar), 200 μ M Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 2:3mg/ml HSM(mavi bar), 100 μ M Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 1:1.5mg/ml HSM(mavi bar), 50 μ M Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar))

HSM'nin Docetaxel ile etkileşimine bakıldığında, aynı şekilde A549 hücre hattı beş farklı doz ve konsantrasyonda, sadece HSM ve sadece Docetaxel daha sonra ise HSM+Docetaxel kombine olarak üç tekrarlı olacak şekilde muamele edilmiştir. Daha sonra 24 saat inkübasyona bırakılmış ve “malzeme ve yöntem” de gösterilen indekse göre hesaplanmıştır.

Deney kombinasyonu HSM özütünün IC_{50} (6mg/ml) değerinin iki alt ve iki üst değeri (24-12-6-3-1.5 mg/ml), Docetaxel için de yine benzer şekilde IC_{50} (497.9 μ M, yaklaşık 500 μ M olarak alındı) değerinin iki alt ve iki üst değeriyle (1500 μ M, 1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M) oluşturulmuştur.

Buna göre iki yüksek doz HSM ve Docetaxel ile tek başına maruz bırakılan hücrelerde, sitotoksik etkinin %70'in üzerinde olduğu gözlenirken, HSM+Docetaxel ile maruz bırakılan hücrelerde bu etkinin %78 civarında olduğu gözlenmiştir. (şekil

3.23). Bu oranın HSM ile tek başına maruz bırakılan hücrelerdeki sitotoksik etkiyi geçemediği gözlenmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda HSM ve Docetaxel'in sitotoksik etkisinin azaldığı ve kombine kullanımında sitotoksik etkide bir artış olmadığı aksine yapılan hesaplama sonucu antagonizm etkisi olduğu belirlenmiştir (çizelge 3.1.3).



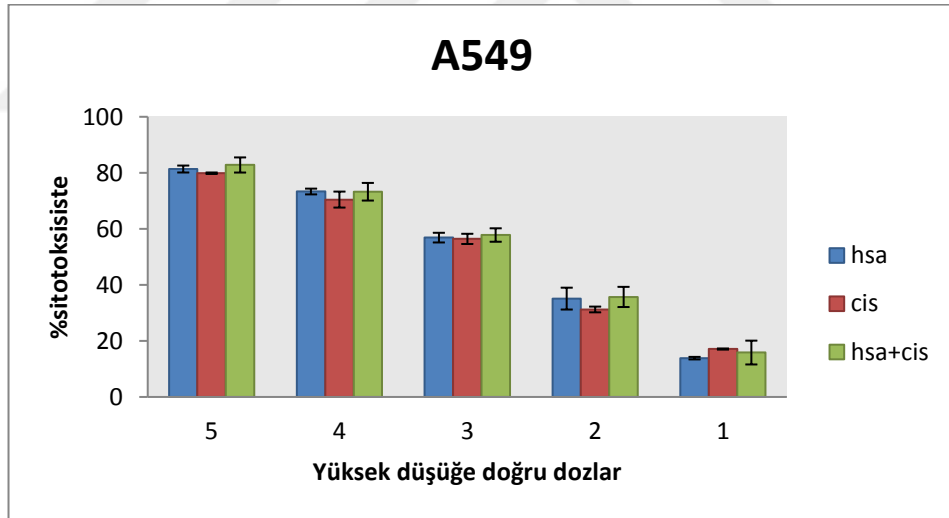
Şekil 3.23. 24 saat inkübasyon sonrası HSM özütünün docetaxel ile A549 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi (5:24mg/ml HSM(mavi bar), 1500 µM Docetaxel(kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 4:12mg/ml HSM(mavi bar), 1000 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 3:6mg/ml HSM(mavi bar), 500 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 2:3mg/ml HSM(mavi bar), 250 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 1:1.5mg/ml HSM(mavi bar), 125 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar))

Çizelge 3.3.3. A549 hücre hattı üzerinde HSM özütünün cisplatin ve docetaxel ile etkileşimlerinin hesaplanması

Toksin		IC50	CI değeri	ETKİ
Cisplatin(µM)+HSM (mg/ml)	D1	214	1,6	Antagonizm
Cisplatin (µM)	D*1	288		
HSM (mg/ml)	D*2	6		
HSM(mg/ml)+cisplatin (µM)	D2	5,4	1,31	Antagonizm
Docetaxel (µM)+HSM(mg/ml)	D1	240		
Docetaxel (µM)	D*1	498		
HSM(mg/ml)+Docetaxel (µM)	D2	5		
HSM (mg/ml)	D*2	6		

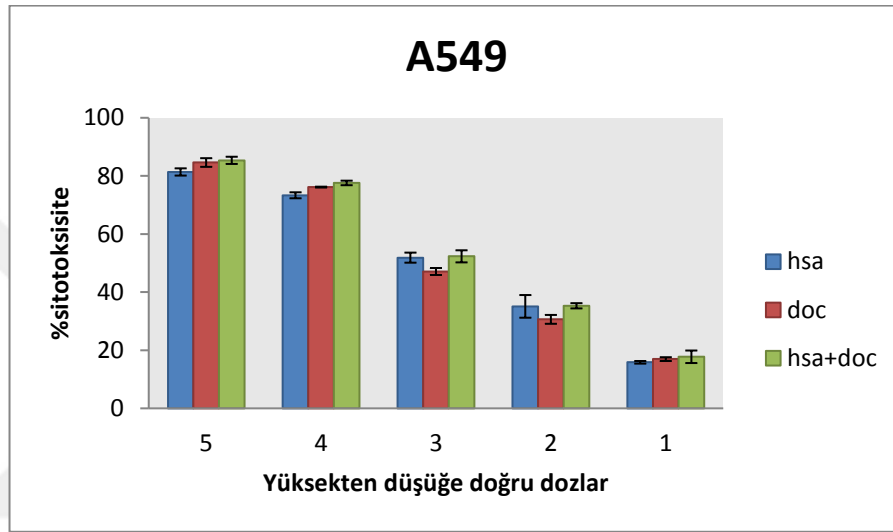
3.4.2. A549 kanser hücre hattı üzerinde HSA özütünün, Cisplatin ve Docetaxel ile sinerjistik etkisinin araştırılması

A549 hücre hattı beş farklı doz ve konsantrasyonda, önce sadece HSA ve sadece Cisplatin sonra HSA + Cisplatin kombine üç tekrarlı olacak şekilde muamele edilmiştir. Daha sonra 24 saat inkübasyona bırakılmış ve “malzeme ve yöntem” de gösterilen indekse göre hesaplanmıştır. Deney kombinasyonu HSM ile yapılan deneyde olduğu gibi aynı doz ve konsantrasyonlarda kurulmuştur. Buna göre ilk üç yüksek dozda HSA ve Cisplatinin tek başına gösterdiği sitotoksik etki %60'ın üzerinde gözlenirken, kombine oldukları dozlarda gösterdiği sitotoksik etkinin, tek başına HSA'nın en yüksek olduğu dozdaki sitotoksik etkisini geçemediği gözlenmiştir. Azalan doz ve konsantrasyona rağmen sitotoksik etkinin artmadığı belirlenmiş ve yapılan hesaplama sonucu HSA+Cisplatinin kombine kullanımının antagonizm etkisine yol açtığı belirlenmiştir (Çizelge 3.1.4).



Şekil 3.24. 24 saat inkübasyon sonrası HSA özütünün Cisplatin ile A549 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi (5:24mg/ml HSA(mavi bar), 600 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 4:12mg/ml HSA(mavi bar), 400 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 3:6mg/ml HSA(mavi bar), 200 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 2:3mg/ml HSA(mavi bar), 100 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 1:1.5mg/ml HSA(mavi bar), 50 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar))

A549 hücre hattının HSA ile Docetaxel etkileşimine bakıldığında, deney kombinasyonu HSM+Docetaxel ile aynı doz ve konsantrasyonlarda yapılmış ve HSM+Docetaxel ile benzer sonuçlar alınmıştır. Buna göre tek başına kullanılan HSA ve Docetaxel 'in ilk iki yüksek dozdaki sitotoksik etkisi %60'ın üzerinde gözlenirken, bu oranın kombine şekilde kullanıldığı orana bakıldığında çok fazla yükselmediği gözlenmiştir (Şekil 3.24). Dolayısıyla azalan doz ve konsantrasyona göre HSA+Docetaxel kombinasyonunun oluşturduğu etki yapılan hesaplama sonucu antagonizm olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1.5)



Şekil 3.25. 24 saat inkübasyon sonrası HSA özütünün Docetaxel ile A549 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi (5:24mg/ml HSA(mavi bar), 1500 µM Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar) , 4:12mg/ml HSA(mavi bar), 1000 µM Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 3:6mg/ml HSA(mavi bar), 500 µM Docetaxel(kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 2:3mg/ml HSA(mavi bar), 250 µM Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 1:1.5mg/ml HSA(mavi bar), 125 µM Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar))

Çizelge 3.3.4 Cisplatin ve Docetaxel ilaçlarının A549 hücre hattı üzerinde belirlenen IC₅₀ değerleri

İlaçlar(µM)	24h	48h	72h
Cisplatin	288,5	48,8	14,9
Docetaxel	497,9	57,5	6,6

Çizelge 3.3.5. A549 hücre hattı üzerinde HSA özütü ile cisplatin ve docetaxel etkileşimlerinin hesaplanması

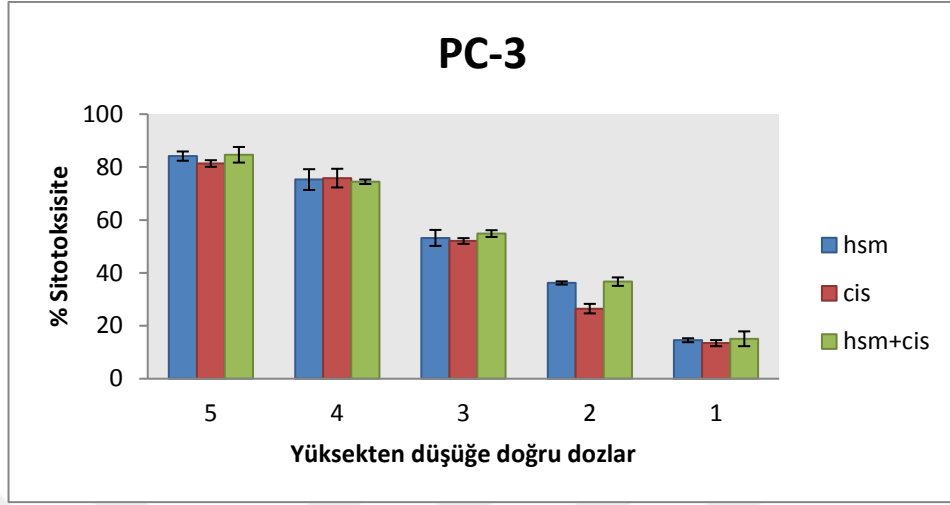
Cisplatin(μM)	D*1	288		
HSA(mg/ml)	D*2	6,1		
HSA(mg/ml)+cisplatin(μM)	D2	4,4	1,42	Antagonizm
Docetaxel(μM)+HSA(mg/ml)	D1	377		
Docetaxel(μM)	D*1	498		
HSA(mg/ml)+Docetaxel(μM)	D2	3,8		
HSA(mg/ml)	D*2	6,1	1,37	Antagonizm

3.4.3. PC-3 hücre hattı üzerinde HSM özütünün, cisplatin ve docetaxel ile sinerjistik etkisinin araştırılması

PC-3 hücre hattı beş farklı doz ve konsantrasyonda, önce sadece HSM ve yalnız cisplatin sonra HSM+Cisplatin kombine üç tekrarlı olacak şekilde muamele edilmiştir. Daha sonra 24 saat inkübasyona bırakılmış ve “malzeme ve yöntem” de gösterilen indekse göre hesaplanmış ve elde edilen veriler Çizelge 3.1.6’da gösterilmiştir.

Deney kombinasyonu HSM özütünün PC-3 hücre hattı üzerindeki IC_{50} (4mg/ml) değerinin iki alt ve iki üst dozlarıyla (16-8-4-2-1 mg/ml), Cisplatin için de yine aynı şekilde IC_{50} (yaklaşık 50 μM olarak alındı)değerinin iki alt ve iki üst konsantrasyonlarda (150 μM , 100 μM ,50 μM , 25 μM , 12.5 μM) oluşturulmuştur.

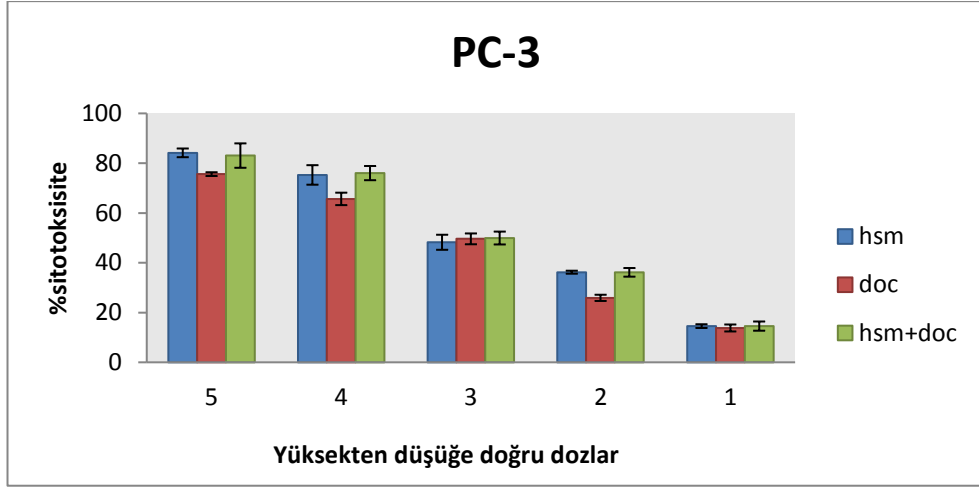
Buna göre HSM ve Cisplatinin en yüksek iki dozunun tek başına gösterdiği sitotoksik etkinin oranı %80 civarında gözlenirken, kombine halindeki dozunun gösterdiği sitotoksik etkinin bu oranı çok arttırmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.26). Azalan doz ve konsantrasyona göre de sitotoksik etkinin azaldığı belirlenmiştir. Yapılan hesaplaması sonucu HSM’nin cisplatin ile antagonizm etkisinin olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.1.6).



Şekil 3.26. 24 saat inkübasyon sonrası HSM özütünün cisplatin ile PC-3 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi (5:16mg/ml HSM(mavi bar), 200 μ M Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 4:8mg/ml HSM(mavi bar), 100 μ M Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 3:4mg/ml HSM(mavi bar), 50 μ M Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 2:2mg/ml HSM(mavi bar), 25 μ M Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 1:1mg/ml HSM(mavi bar), 12.5 μ M Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar))

HSM'nin Docetaxel ile etkileşimine bakıldığında, Cisplatin ile benzer şekilde kurulan deneyde elde edilen değerler Çizelge 3.1.6'da gösterilmiştir.

Buna göre en yüksek ilk iki dozda tek başına kullanılan HSM ve Docetaxel'in gösterdiği sitotoksik etki %60 ve üzeri gözlenirken, kombine şekilde gösterdiği sitotoksik etkinin %70 ve üzeri olduğu, diğer alt doz ve konsantrasyonlarının kombine kullanımında yine HSM'nin tek başına oluşturduğu sitotoksik etkinin pek üzerine çıkamadığı belirlenmiştir (Şekil 3.27). Yapılan hesaplama sonucu HSM'nin Docetaxel üzerinde orta derecede antagonizm etkisinin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.27. 24 saat inkübasyon sonrası HSM özütünün docetaxel ile PC-3 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi (5:16mg/ml HSM(mavi bar), 200µM Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar) , 4:8mg/ml HSM(mavi bar), 100 µM Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 3:4mg/ml HSM(mavi bar), 50 µM Docetaxel(kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 2:2mg/ml HSM(mavi bar), 25 µM Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 1:1mg/ml HSM(mavi bar), 12.5 µM Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar))

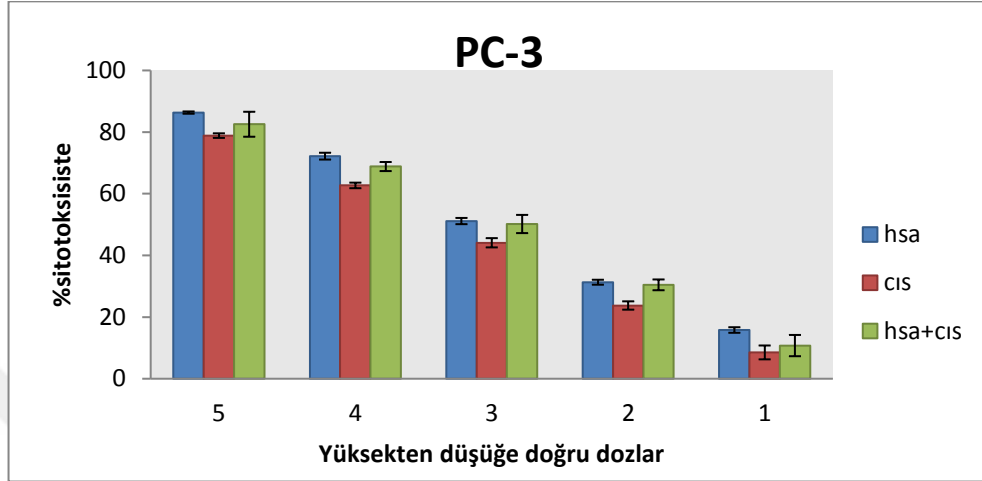
Çizelge 3.3.6. PC-3 hücre hattı üzerinde HSM özütünün Cisplatin ve Docetaxel ile etkileşimlerinin hesaplanması

Toksin		IC50	CI değeri	ETKİ
Cisplatin(µM)+HSM (mg/ml)	D1		30	Antagonizm
Cisplatin(µM)	D*1		48	
HSM(mg/ml)	D*2		3,6	
HSM(mg/ml)+cisplatin(µM)	D2		2,8	
			1,4	
Docetaxel(µM)+HSM(mg/ml)	D1		21,9	orta antagonizm
Docetaxel(µM)	D*1		52,5	
HSM(mg/ml)+Docetaxel(µM)	D2		3	
HSM(mg/ml)	D*2		3,6	
			1,26	

3.4.4. PC-3 hücre hattı üzerinde HSA özütünün, Cisplatin ve Docetaxel ile sinerjistik etkisinin araştırılması

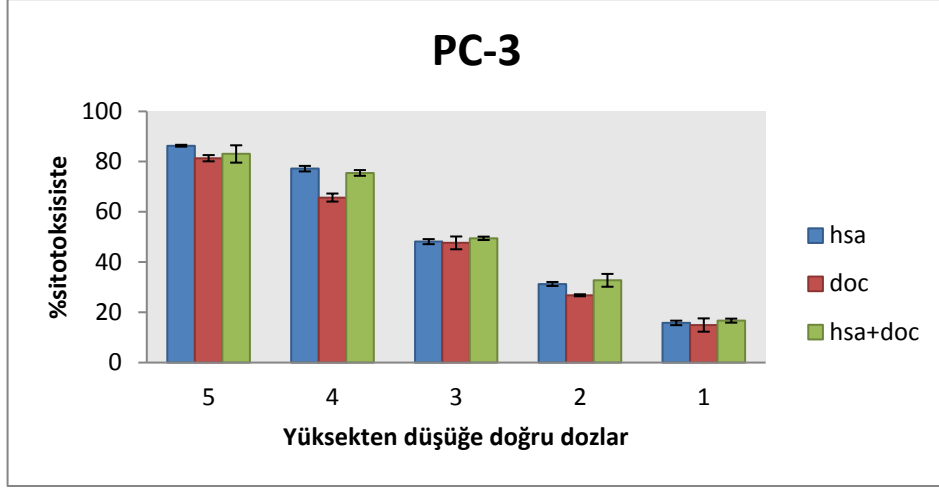
PC-3 hücre hattının HSA ve Cisplatin ile sinerjizm deneyi, HSM ile yapılan deneyde olduğu gibi beş farklı doz ve konsantrasyonlarda yapılmış ve elde edilen veriler Çizelge 3.1.8’de gösterilmiştir. Buna göre HSA’nın ilk iki yüksek dozu %60 ve üzeri sitotoksik etki gösterirken, Cisplatin’in ilk iki yüksek dozu %60 ve üzeri sitotoksik

etki göstermiştir. Bütün kombinasyon dozundaki sitotoksik etki değerlerine bakıldığında, doz ve konsantrasyon azalmasına bağlı olarak sitotoksik etkinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.28).



Şekil 3.28. 24 saat inkübasyon sonrası HSA özütünün cisplatin ile PC-3 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi (5:12mg/ml HSA(mavi bar), 200 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar),4:8mg/ml HSA(mavi bar), 100 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 3:4mg/ml HSA(mavi bar), 50 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 2:2mg/ml HSA(mavi bar), 25 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 1:1mg/ml HSA(mavi bar), 12.5 µM Cisplatin (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar))

PC-3 hücre hattının HSA ve Cisplatin ile sinerjizm deneyi, HSM ile yapılan deneyde olduğu gibi beş farklı doz ve konsantrasyonlarda yapılmış ve elde edilen veriler Çizelge 3.1.8’de gösterilmiştir. Buna göre HSA ‘nın ilk iki yüksek dozu %60 ve üzeri sitotoksik etki gösterirken, Cisplatinin ilk iki yüksek dozunun %50 ve üzeri sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Yine aynı şekilde bütün kombinasyon doz ve konsantrasyonlarına bakıldığında, doz ve konsantrasyonun azalmasına bağlı sitotoksik etkinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.29). Yapılan hesaplama sonucu HSA’ nın cisplatin üzerinde orta derecede antagonizm etkisinin olduğu gözlenmiştir(Çizelge 3.1.7).



Şekil 3.29. 24 saat inkübasyon sonrası HSA özütünün docetaxel ile PC-3 hücre hattı üzerinde sinerjistik etkisi (5:16mg/ml HSA(mavi bar), 200 μ M Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar) , 4:8mg/ml HSA(mavi bar), 100 μ M Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 3:4mg/ml HSA(mavi bar), 50 μ M Docetaxel(kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 2:2mg/ml HSA(mavi bar), 25 μ M Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar), 1:1mg/ml HSA(mavi bar), 12.5 μ M Docetaxel (kırmızı bar), ikisinin bileşimi (yeşil bar))

Çizelge 3.3.7. Cisplatin ve Docetaxel ilaçlarının PC-3 hücre hattı üzerinde belirlenen IC₅₀ (μ M) değerleri

İlaçlar(μ M)	24h	48h	72h
Cisplatin	48,06	15,4	4,1
Docetaxel	52,5	8,16	2,1

Çizelge 3.3.8. PC-3 hücre hattı üzerinde HSA özütü ile Cisplatin ve Docetaxel etkileşimlerinin hesaplanması

Toksin		IC ₅₀	CI değeri	ETKİ
Cisplatin(μ M)+HSA(mg/ml)	D1	22,3	1,31	Antagonizm
Cisplatin(μ M)	D*1	48		
HSA(mg/ml)	D*2	4		
HSA(mg/ml)+cisplatin(μ M)	D2	3,6	1,2	Orta antagonizm
Docetaxel(μ M)+HSA(mg/ml)	D1	23,4		
Docetaxel(μ M)	D*1	52,5		
HSA(mg/ml)+Docetaxel(μ M)	D2	3,1	1,2	Orta antagonizm
HSA(mg/ml)	D*2	4		

Sonuç olarak; HSA ve HSM'nin Cisplatin ve Docetaxel ile sinerjistik etkileşiminin araştırılmasında, sinerjizm açısından doz ve konsantrasyon azalmasına bağlı olarak sitotoksik etkinin artması beklenirken, deneyimizde sitotoksik etkinin azaldığı, A549 hücre hattında HSM ve HSA'nın Cisplatin ve Docetaxel deneyi ile PC-3 hücre hattının HSA ve HSM Cisplatin deneyinde antagonizm etki gözlenirken, PC-3 hücre hattının HSM ve HSA Docetaxel deneyinde orta derecede antagonizm etki oluşturduğu gözlenmiştir.

3.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri

HPLC analizi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (BİLTEKMER) Laboratuvarı'nda hizmet alımı kapsamında elde edilen veriler kapsamında, standart HPLC kromatogramı şekil 3.30'te, HSM özütüne ait kromatogram ise şekil 3.31'de gösterilmiştir. Bu analize göre HSM özütünde 12 fenolik bileşik belirlenmiş ve bunların listesi çizelge' 3.10 da gösterilmiştir. Sonuçlar µg/g olarak verilmiştir. HSM özütünde belirlenen bileşikler çoktan aza doğru şu şekildedir; ellagic asit (178,080), epicatechin (106,934), 2,5 dihidroksi benzoik asit(55,613), gallic asit(53,300), caffeic asit (30,828), vanilic asit (6,038), naringin (2,443), cinnamic asit (1,044), 3,4 dihidroksi asit (0,945), chlorojenik asit (0,478), 4 hidroksi beznoik asit (0,344), p-coumaric asit (0.030)'dur. Ferulik asit, rutin ve Quercetin bileşikleri özütte bulunamamış ya da referansının çok altında belirlenmiştir.

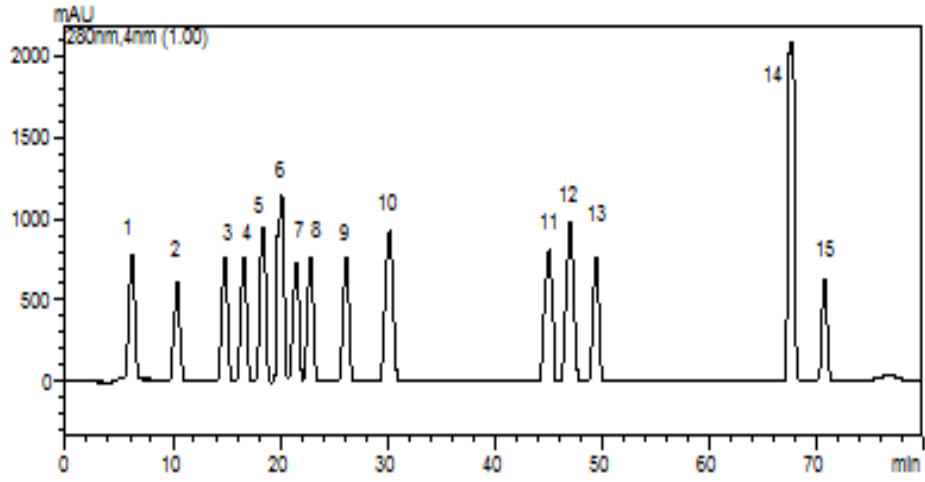
Çizelge 3.3.9. Standart Kromatogram

	Gallik (1)	3,4dihidroksi (2)	4-hidroksi (3)	2,5dihidroksi benzoik asit (4)	Chloro (5)
LOD (ppm)	0,01	0,03	0,01	0,75	0,01
Dalga Boyu	280	280	280	320	320
RT	6,8	10,7	15,7	17,2	18,2
	Vanilic (6)	Epicatechin (7)	Caffeic (8)	p-Coumaric (9)	Ferulic (10)
LOD (ppm)	0,11	0,43	0,01	0,01	0,01
Dalga Boyu	320	260	280	320	320
RT	19,2	21,3	22,7	26,1	30,1

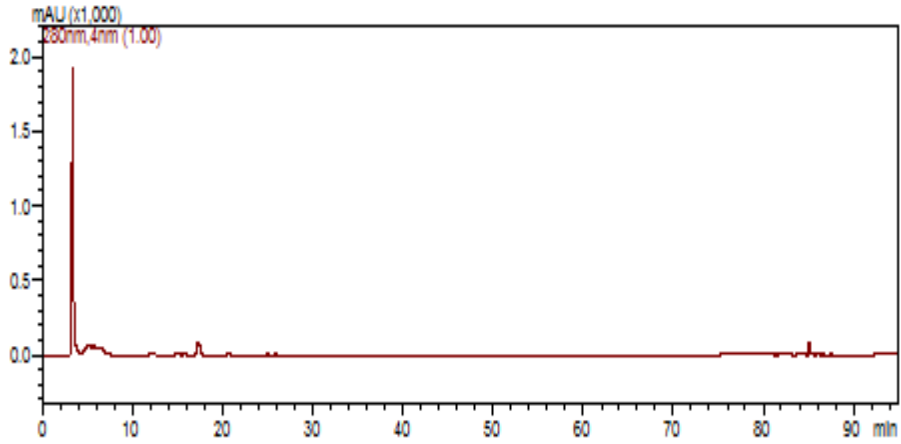
	Rutin (11)	Ellagic (12)	Naringin (13)	Cinnamic (14)	Quercetin (15)
LOD (ppm)	0,57	0,45	0,40	0,01	0,57
Dalga Boyu	360	240	280	280	360
RT	45,6	47,7	49,7	71,1	70,4

Çizelge 3.10. HSM kromatogram sonuçları

Fenolik Bileşikler	Numune($\mu\text{g/g}$) (hsm)	Dalga Boyu (nm)	Alıkonma süresi(RT)
1.Gallik asit	53,300	280	6,8
2.3,4-dihidroksi benzoik asit	0,945	280	10,7
3.4-hidroksi benzoik asit	0,344	280	15,7
4.2,5 dihidroksi benzoik asit	55,613	320	17,2
5.Chlorojenik asit	0,478	320	18,2
6.Vanilic asit	6,038	320	19,2
7. Epicatechin	106,934	260	21,3
8.Caffeic asit	30,828	280	22,7
9.p-Qumaric asit	0,030	320	26,1
10.Ferulic asit	-	320	30,1
11.Rutin	-	360	45,6
12.Ellagic	178,080	240	360
13.Naringin	2,443	280	49,7
14.Cinnamic asit	1,044	280	71,1
15-Quercetin	-	360	70,4



Şekil 3.30. Standartların HPLC kromatogram yerleri 1: Gallic asit, 2: 3,4hidroksi, 3:4-hidroksi, 4:2,5 dihidroksi benzoik asit, 5:Chloro, 6:Vanilic , 7:Epicatechin, 8:Caffeic asit, 9:p-Qumaric asit, 10: Ferulic asit, 11:Rutin, 12: Ellagic, 13:Naringin, 14: Cinnamic asit, 15:Quercetin



Şekil 3.31. HSM özütünün HPLC kromatogramı

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Denizhıyarı, *Holothuria sanctori* Özütlerinin A549 Ve PC-3 Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

Denizhıyarları besinsel olarak zengin derin deniz türleridir ve yüzyıllarca Kore, Japonya, Endonezya ve Çin’de anti-inflamatör ajan ve hastalıklara karşı etkili bir besin kaynağı olarak kullanılmıştır (Kelly vd., 2005; Aydın vd., 2011). Deniz hıyarları vitaminler, mineraller, cerebrositler ve peptidler içerdikleri gibi triterpen glikosid bileşikler, glikozamino glikanlar ve kondrosit sülfat gibi pek çok özel molekül içerirler. Bu bileşiklerin anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-anjiyogenik, anti-inflamatör ve anti-tümör etkileri olduğu gösterilmiştir (Tian vd., 2005; Althunibat vd., 2009; Janakiram vd., 2010; Janakiram et al. 2015 A). Çeşitli denizhıyarı türlerinden elde edilen özellikle triterpen glikozit ve saponin içeren özütlerin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile antikanser ve anti-metastatik etki gösterdikleri belirlenmiştir (Aminin vd., 2015). Echinaside A ve Bivittoside D gibi aktif bileşikler mitozun inhibe edilmesini ve DNA kırılmasının indüklenmesini sağlayan bileşiklerdir. Bunlara ilaveten, fukosile edilmiş kondroitin sülfat (LFCS) gibi denizhıyarlarından elde edilen bileşiklerden türevlenen düşük moleküler ağırlıklı yeni antikanser bileşikler de bulunmaktadır (Liu vd., 2016). Ayrıca, deniz hıyarındaki aktif bileşikler; EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü), Akt (protein kinaz B), ERK (hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar), FAK (fokal adezyon kinazı) ve MMP-9 (matrismetalo proteinaz-9) yolları aracılığıyla kanser hücrelerinin büyümesinin kontrol edilmesinde oldukça hızlıdır (Aminin vd., 2015).

Kanser hücrelerinin sitotoksik aktivitesinin belirlenmesinde MTT, XTT, MTS, Sulforhodamine B, Resazurin ve nötral red gibi yöntemler kullanılmaktadır (Kueste vd., 2017). MTT yöntemi, sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntem olup, optik yoğunluk ve sayılan hücre sayısı ile bağlantılı olarak hücre konsantrasyonları bu yöntem ile belirlenebilmektedir. MTT analizi, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimlerinin

tetrazolyum boyası MTT'yi suda çözünmeyen, mor renkli formazan kristallerine indirgemesine dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrojenaz enzimlerinin tetrazolyum tuzlarını suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgemesi sonucunda hücre canlılığını ölçer. MTT analizinde dimetil sülfoksit, asitleştirilmiş etanol çözeltisi veya deterjan sodyum dodesil sülfat çözeltisi ile, suda çözünmeyen formazan kristallerinin çözülerek 500-600 nm arasında bir dalga boyunda verdiği absorbans ölçülür. Ölçüm sonucunda herhangi bir madde ile muamele edilmiş hücrelerin optik yoğunluk değeri kontrol hücrelerinin yoğunluğu ile karşılaştırılarak hücre canlılığı belirlenir (Winikoff vd., 2005; Lu vd., 2012).

Bu çalışmada Gökova körfezinden toplanan denizhiyari *Holothuria sanctori* türünün aseton ve metanol muamelesi sonucunda elde edilen özütlerinin; anti-tümör etkileri, A549 ve PC-3 kanser hücre hatları ve bir sağlıklı hücre hattı olan HEK-293 hücre hattı üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. MTT hücre canlılığı ve çoğalmasını ölçmek için kullanılan en yaygın yöntemlerden biri olup; *Holothuria* türlerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Satari vd., 2017; Kim vd., 2019).

Bu tez çalışmasında, HSA (*Holothuria sanctori* aseton) ve HSM (*Holothuria sanctori* metanol) özütlerinin; 24, 48 ve 72 saatlik üç farklı inkübasyon aralığında ve 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ve 0.6 mg/ml olmak üzere altı farklı dozda A549, PC-3 ve HEK-293 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

A549 hücreleri üzerinde, HSA özütünün kullanılan tüm dozlarının hücre canlılığını farklı seviyelerde etkilediği belirlenirken; doz-zaman çalışmaları sonucunda inkübasyon süresinin artışına ve aynı şekilde özüt dozunun artışına bağlı olarak sitotoksitenin de arttığı gözlemlenmiştir. Elde edilen verilere göre HSA özütünün A549 hücreleri üzerinde gösterdiği en yüksek sitotoksitenin yüzde 85 olup; 20 mg/ml özüte maruz bırakılan hücrelerde 72 saat inkübasyon sonrasında gözlenmiştir. HSM özütünün A549 hücreleri üzerinde, 20, 10 ve 5 mg/ml'lik dozlarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin tümünde %70'den fazla sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. En yüksek sitotoksik etki 72 saat inkübasyon sonrasında, 20 mg/ml HSA ile muamele edilen hücrelerde tespit edilmiş olup bu oran % 87'dir. Sonuç olarak, aseton ve metanol ile hazırlana iki özütün de A549 hücre hattı için doz ve

zamana bağılı olarak sitotoksik etkilerinin arttığı söylenebilir. Aynı zamanda A549 hücreleri üzerine uygulanan özütlerin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonrasında IC₅₀ değerleri de hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri en az iki bağımsız deneyden elde edilen ortalama sonucunda %50 inhibisyona neden olan bileşiğin konsantrasyonudur (Fassy vd., 2017). İlk 24 saatlik inkübasyon sonrasında her iki özütün IC₅₀ değeri 6mg/ml bulunmuştur. 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda HSA'nın IC₅₀ değerleri sırasıyla, 2.4 ve 1.7 mg/ml iken; HSM özütünün sırasıyla 3 ve 2.2 mg/ml'dir. Kısacası, sitotoksikiteyi gösteren grafiklerde de görüldüğü üzere inkübasyon süresi uzadıkça hücreler üzerinde toksik etki gösteren özütlerin dozu azalmaktadır. Dolayısıyla, *Holothuria sanctori* aseton ve metanol özütlerinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin doza ve zamana bağılı olarak değiştiği; en etkili doz –zaman ikilisinin 72 saat ve 20 mg/ml'lik dozlar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, her iki özütün de en etkili olduğu 72 saat inkübasyon sonrasında IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında, HSA'nın (1.7 mg/ml) daha düşük dozlarda daha yüksek etki gösterdiği gözlenmiştir.

PC-3 hücreleri üzerine uygulanan HSA özütünün neden olduğu en yüksek sitotoksik etki %83 oranında olup; 20 mg/ml uygulanan özütün 72 saat inkübasyonu sonucunda elde edilmiştir. HSM özütünün yol açtığı en yüksek sitotoksikite oranı ise %88 olup; 20 mg/ml özütte, 72 saat inkübasyon sonrasında gözlenmiştir. PC-3 hücreleri üzerine uygulanan HSA ve HSM özütlerinin, PC-3 hücre hattı üzerinde oluşturduğu sitotoksik etki kıyaslandığında, her iki özütünde ilk üç yüksek dozlarının birbirine yakın sitotoksik etki gösterdiği gözlenirken, 2.5 mg/ml HSA özütün de bunlara yakın etki gösterdiği belirlenmiştir. 1,25 mg/ml ve 0,6 mg/ml'lik HSA özütünün 72 saatteki sitotoksik etkisi %45'in üstüne çıktığı ancak HSM'nin aynı konsantrasyonlardaki özütünün inkübasyon sürelerinin tamamındaki sitotoksik etkisinin %40'ın altında kaldığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, HSM ve HSA ile hazırlanan özütlerin PC-3 hücre hattı için zamana bağılı olarak sitotoksik etkilerinin arttığı söylenebilir. Ayrıca HSA ve HSM özütlerinin 24,48 ve 72 saatlerdeki IC₅₀ değerleri kıyaslandığında, her iki özütünde benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Elde edilen özütün potansiyel bir anti-kanser ajanı olarak tanımlanabilmesi için sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik aktivitesinin minimum seviyede olması gerekmektedir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan teröpotiklerin de en büyük yan etkisi, kanser hücrelerinin büyümesini durdururken aynı etkiyi hızlı büyüme eğiliminde olan sağlıklı hücreler üzerinde de göstermesidir. Dolayısıyla bu

çalışmada elde edilen HSA ve HSM özütlerinin sağlıklı hücre hattı olan HEK-293 hücreleri üzerindeki etkilerine bakıldığında; HSA özütünün bütün konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde sitotoksik etkisinin %50'nin altında kaldığı gözlenirken HSM özütünün ise %35'in altında kaldığı görülmüştür. Kısacası; HSM ve HSA özütlerinin, A549 ve PC-3 kanser hücrelerini normal hücre hattı HEK293'e kıyasla anlamlı bir şekilde seçici olarak öldürdüğü tespit edilmiştir.

Literatürde denizhiyarlarının başka bir deyişle deniz patlıcanlarının antikanser ve antiproliferatif etki gösteren bileşikler ürettiği birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. *Mensamaria intercedens* türü denizhiyarından elde edilen üç yeni triterpen glikozitin 10 farklı insan kanser hücre hattı üzerinde önemli sitotoksik aktiviteye neden olduğu görülmüştür (Zou vd., 2003). *Stichopus japonicas* türü denizhiyarının su ile elde edilen özütünün Caco-2 hücrelerinin çoğalmasının inhibe ettiği ve H₂O₂ sitotoksitesini arttırdığı belirlenmiştir (Ogushi vd., 2005). *Stichopus variegatus* türü denizhiyarının sfingoid kısmından izole edilen cerebroside'lerin insan kolon kanser hücrelerine karşı sitotoksik olduğu gözlenmiştir. Test edilen bileşiklerin kromatin yoğunlaşması gibi morfolojik değişimlere neden olmasını yanında kaspaz-3 aktivitesini de arttırması bu bileşiklerin apoptoza neden olarak hücre canlılığını azalttığı fikrini desteklemektedir (Sugawara vd., 2006). *Cucumaria frondosa* deniz hiyarından izole edilen frondanol A'nın azoksimetan kaynaklı sıçan kolon kanserine karşı etkileri incelenmiş ve Denizhiyarı türevli frondanol A'nın çok iyi büyüme önleyici ve apoptotik aktiviteler sergilediği belirlenmiştir.

Dünya genelinde farklı türlerde denizhiyarı özütleri veya aktif bileşikleri kullanılarak yapılan çalışmalar ile, denizhiyarlarının kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitelerinin kanıtlandığı görülmektedir. Ancak bu tez çalışmasında araştırılan *Holothuria sanctori* türünün sitotoksik etkileri hakkında bir çalışma bulunmamaktadır. Tehlike durumlarında oldukça yapışkan olan ağ şeklinde bir salgı salgılamaları nedeniyle toplanması zor bir türdür. Bu nedenle toplanması ve çalışılması pek fazla tercih edilmemektedir. *Holothuria* türleri, ekonomik öneminin yanı sıra kanserin tedavisinde yeni ve düşük yan etkili yöntemlerin bulunması için doğal bir kaynaktır. Bu çalışma ile de ülkemiz denizlerinde bulunan *Holothuria sanctori* türünün A549 ve PC-3 hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesi gösterilmiştir. Dolayısıyla, anti-kanser özellik taşıyan denizhiyarı türlerine bir yenisi de bu çalışma

ile eklenmiş olup; etkin bileşiklerinin bulunabilmesi için detaylı karakterizasyonlarının yapılması gerekmektedir.

Ayrıca özütlerin hazırlanmasında kullanılan aseton ve metanol gibi organik çözücülerin su ile hazırlanan özütlere kıyasla daha fazla sitotoksik etkiye yol açtığı literatürde yapılan çalışmalarda mevcuttur. (Althunibat vd., 2009). Bu çalışmada kullanılan organik özütler temel olarak hidrofobik bileşikler olduğu için antikanser özelliklere sahip olduğu tespit edilen sfenoid bazlarca zengin olabilirler (Sugwara vd., 2006). Dolayısıyla kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkinin gözlenmesinde özütün eldesinde kullanılan çözücülerin de önemi büyüktür.

4.2. Denizhiyari *Holothuria sanctori* Özütlerinin A549 Ve PC-3 Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz süreci, genellikle belirgin morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterize edilir. Apoptoz, nekroz ve otofaji programlı hücre ölümünün farklı formlarıdır ve birbirlerinden hücrede neden oldukları morfolojik farklılıklar sayesinde ayırt edilirler (Laubenbacher vd., 2009; Hanahan ve Weinberg, 2011). Apoptoz ya da tip I programlı hücre ölümü, hücre yoğunlaşması, nükleer kondensasyon, nükleer fragmentasyon ve membranda tomurcuklanma ile karakterize edilir (Kerr vd., 1972). Apoptoz; normal hücre devri, immün sistemin gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü de dahil olmak üzere çeşitli işlemlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilir. Apoptozun gereğinden az veya fazla gerçekleşmesi nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün hastalıklar ve birçok kanser türüne neden olmaktadır (Elmore, 2007). Programlı hücre ölümü, hücre ölümü ve yaşamı arasındaki dengeden sorumludur. Bu eşitliğin bozulması kansere neden olduğundan programlı hücre ölümü kanser hücrelerinin kaderini belirler (Ouyang vd., 2012). Bu nedenle, hücre döngüsünün tutulmasını ve apoptozu kontrol eden sinyal yolları ve hücre döngüsü mekanizmasının açıklanmasına yönelik araştırmalar, kanser tedavi yöntemlerinin araştırılmasında odak noktadır. Hematoksilen eozin boyama, floresan mikroskopi, elektron mikroskopi, faz-kontrast mikroskopi, Anneksin V yöntemi, TUNEL yöntemi,

Kaspaz-3'ün ölçülmesi, M30 yöntemi, agaroz jel elektroforezi ve western blotting gibi hücrede apoptozu gösteren birçok yöntem mevcuttur (Güleş ve Eren, 2008).

Tez çalışmasının bu aşamasında, *Holothuria sanctori* özütlerinin neden olduğu sitotoksitenin apoptotik yollarla ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. Apoptozun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden flow sitometri ile Annexin V' in ölçülmesi ve kaspaz-3 yöntemleri kullanılmıştır.

4.2.1. Hücre ölümünün Annexin V yöntemi ile Flow sitometrik Analizi

Normal hücrelerde sitoplazmik zarın iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin molekülleri, apoptoz sinyali ile uyarılan hücrelerde membranın dış yüzeyine transloke olur. Dış yüzeye transloke olan fosfatidilserin henüz bozulmaların başlamadığı erken dönemlerde gerçekleşir. Annexin V'de membranda bulunan fosfatidilserine yüksek afinite gösterdiğinden dolayı FITC ile işaretli Annexin V molekülü flow sitometri analizi ile apoptozun ölçülmesine olanak verir (Güleş ve Eren, 2008). Flow sitometri ya da akım sitometrisi, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin DNA ve RNA içeriği, şekil, boyut ve sitoplazmik granüleritesi gibi özelliklerinin incelenmesini sağlayan bir tekniktir. İncelenmesi hedeflenen hücresel yapı floresan boya ile veya propidium iodide ile işaretlenir (Kanev ve Muranlı, 2015). Yöntemin prensibi apoptozun erken aşamalarında hücre yüzeyine transloke olan fosfatidilserinin FITC ile işaretlenmiş Annexin-V ve PI ile saptanmasıdır. PI bozulan membran bütünlüğünden dolayı hücre içine girip DNA ya bağlanabilir. Fakat canlı hücrelerde membran bütünlüğü nedeniyle hücre içine giremez. FITC ile işaretlenmiş Annexin V bağlanması ve DNA ya bağlanan PI miktarı birlikte hesaplanarak apoptoz yüzdeleri ve nekroz belirlenir.

HSM özütünün A549 ve PC-3 hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne yol açıp açmadıkları, Annexin V kullanılarak, flow sitometri analizi ile araştırılmıştır. A549 hücre hattı 20, 12 ve 5 mg/ml, PC-3 hücre hattı ise 20, 8 ve 4 mg/ml olmak üzere; üç doz HSM özütü ile muamele edilen hücrelerin 24 saat inkübasyon sonrasında apoptotik etkilerine bakılmıştır. A549 hücrelerinde, popülasyonun %3.9'u erken apoptozdaki hücreleri, %4'ü ise geç apoptozdaki hücreleri göstermektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (12 ve 20 mg/ml) ise %99 hücre geç apoptozda yer almıştır. Veriler, HSM özütünün A549 hücrelerini apoptoza sürüklediğini

göstermektedir. Özüte daha kısa süreli maruziyet erken apoptozdaki hücre popülasyonunu da gösterebilir. Benzer şekilde, farklı konsantrasyonlardaki HSM özütüne maruz kalan PC-3 kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümü olduğu gözlenmiştir. 20 mg/ml’de hücrelerin %91’i geç apoptotik hücrelerdir.

4.2.2. Kaspaz aktivitesi

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) önemli araçlarıdır. Bunlar arasında, kaspaz-3, birçok önemli hücre proteinin spesifik parçalanmasını katalize eden, sıklıkla aktive olan bir ölüm proteazıdır. Apoptozda Kaspaz-3 aktivasyonuna giden yollar, mitokondriyal sitokrom c salımına ve kaspaz-9 fonksiyonuna bağlı olarak tanımlanmıştır. Kaspaz-3, apoptozun tipik işaretlerinden olan apoptotik kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonunun gerçekleşmesi için vazgeçilmezdir. Her iki apoptotik yolda da etkili bir kaspaz olduğundan dolayı bu çalışmada, kaspaz-3 aktivitesi ölçülmüştür. A549 ve PC-3 hücreleri üzerinde, 15 mg/ml uygulanan HSM özütün kaspaz-3 miktarında neden olduğu değişimler 36-48 saat inkübasyon sonrasında ölçülmüştür. A549 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrol hücreleri ile kıyaslandığında yaklaşık 2.1 kat arttığı belirlenmiştir. PC-3 hücrelerin de ise bu değer 1.9 kat olduğu gözlenmiştir. Bulunan bu değerler, HSM özütünün A549 ve PC-3 hücre hattında apoptozu indüklediğini ve flow sitometri analizi ve MTT deneyi sonuçlarına göre elde edilen verilerle de tutarlı olduğu söylenebilir.

Bu çalışmada kullanılan *Holothuria sanctori* türüne ait denizhiyarının sitotoksik aktivite mekanizmasının araştırılmasına yönelik çalışmalar literatürde bulunmamakla birlikte; farklı türlerdeki denizhiyarlarının apoptotik etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur. Denizhiyarlarından izole edilen doğal bileşikler, kanser ilerlemesini engellemek için birkaç farklı mekanizma yoluyla apoptotik yolları indükler (Çizelge, 2) (Wargasetia ve Widodo, 2017). Denizhiyarında en yaygın bulunan metabolit olan Triterpen glikozitler, hücre içi kaspaz ölüm yolları, Fas ve kaspaz-8 aktivasyonu, BCL-2’ nin azalması ve kaspaz-3’ün artması olmak üzere farklı yollarla kanser hücrelerinde apoptozu uyarır (Qian vd., 2015; Ye, 2016; Qian, 2017). *Stichopus variegatus* türü denizhiyarının sfingoid kısmından izole edilen *cerebroside*’ lerin insan kolon kanser hücrelerine karşı sitotoksik olduğu

gözlenmiştir. Test edilen bileşiklerin kromatin yoğunlaşması gibi morfolojik değişimlere neden olmasını yanında kaspaz-3 aktivitesini de arttırması bu bileşiklerin apoptoza neden olarak hücre canlılığını azalttığı fikrini desteklemektedir (Sugwara vd., 2006). *Cucumaria okhotensis*'ten izole edilen frondosid A bileşiğinin HeLA ve THP-1 hücrelerine karşı oldukça sitotoksik olduğu belirkenmiştir. Frondosid A' nın kaskad aktivasyon ve mitokondriyal yollarla apoptozu indüklediği sanılmaktadır (Li vd., 2008). *Cucumaria frondosa* denizhiyarından izole edilen frondanol A'nın azoksimetan kaynaklı sıçan kolon kanserine karşı etkileri incelenmiş ve Denizhiyarı türevli frondanol A çok iyi büyüme önleyici ve apoptotik aktiviteler sergilediği belirlenmiştir.

4.3. HS özütünün, A549 ve PC-3 hücre hatları üzerinde, kanser ilaçlarıyla sinerjistik etkisinin incelenmesi

İlaç kombinasyonları kanser gibi karmaşık hastalıkların tedavisinde umut verici bir yaklaşımdır. İlaç kombinasyonları kullanıldığında farklı birçok sonuç ile karşılaşılabilir. Farmakodinamik etkileşimler genel olarak sinerjik, antagonistik ve arttırıcı etki olmak üzere sınıflandırılır. Birlikte verilen iki ilacın etkisi, bireysel uygulandıklarında gösterdikleri etkinin toplamından büyükse sinerjistik etkileşim; iki ilacın etkisi, bireysel uygulandıklarında gösterdikleri etkinin toplamından daha azsa antagonistik etkileşim; iki ilacın etkisi herbirinin yalnız uygulandığı etkisine yakınsa arttırıcı etki olarak tanımlanır (Scripture ve Figg, 2006). Sinerjizm genellikle tıp ve farmakoloji alanlarında kullanılan bir terim olup en fazla kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Sinerjistik etkileşimde bulunan ilaçlar hücreleri istenen seviyede öldürmeye yarayan en düşük dozda etki edeceklerinden, kullanılan ilaçların yan etkileri azalırken teröpatik etkiyi maksimuma çıkarır (Greco vd., 1996; Foucquier ve Guedj, 2015). Klinik sinerjide kullanılan birçok kemoterapi ajanı bulunmaktadır. Antagonistik etki ise sinerjinin aksine istenmeyen bir etkidir fakat ilaca direnç gelişimine neden olan mutasyonların seçilmesinde faydalı olabilmektedir (Chait vd., 2007).

Bu çalışmada da *Holothuria sanctori*' ye ait HSA ve HSM özütlerinin kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan cisplatin ve docetaxel ile kombinasyonlarının,

A549 ve PC-3 kanser hücre hatları üzerindeki etkileşimleri araştırılmıştır. Özütler ve kemöteropatik ilaçlar hücreler üzerine beş farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Bu deneylerde, her bir özütün bireysel; cisplatin veya docetaxel'in bireysel; cisplatin veya docetaxel'in ilgili özütle birlikte olmak üzere üç farklı şekilde, sitotoksik etkileri MTT ile belirlenmiştir. Elde edilen değerler verilerin kombinasyonel indeksi Chou ve Talalay (1984)' a göre hesaplanmıştır.

A549 hücreleri üzerinde HSM+Cisplatin'in en yüksek dozu ile muamele edilen hücrelerde sitotoksik etkinin %80 olduğu gözlenirken, HSM ile tek başına maruz bırakılan hücrelerde bu oranın %83 olduğu belirlenmiştir. Yine aynı şekilde diğer kombinasyonlarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre HSM ' nin cisplatin ile sinerjistik etkisinin bulunmadığı, aksine yapılan hesaplama sonucu antagonistik etkisinin olduğu gözlenmiştir. HSM+Docetaxel'e maruz bırakılan A549 hücrelerinde sitotoksik etkinin %78 civarında olduğu gözlenmiştir. Bu oranın HSM ile tek başına maruz bırakılan hücrelerdeki sitotoksik etkiyi geçemediği gözlenmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda HSM ve Docetaxel'in sitotoksik etkisinin azaldığı ve kombine kullanımında sitotoksik etkide bir artış olmadığı aksine yapılan hesaplama sonucu antagonistik etkisi olduğu belirlenmiştir. HSA özütünün; uygulandığı A549 hücreleri üzerinde, cisplatin ile kombine oldukları dozlarda gösterdiği sitotoksik etkinin, tek başına HSA'nın en yüksek olduğu dozdaki sitotoksik etkisini geçemediği gözlenmiştir. Azalan doz ve konsantrasyona rağmen sitotoksik etkinin artmadığı belirlenmiş ve yapılan hesaplama sonucu HSA+Cisplatinin kombine kullanımının antagonistik etkiye yol açtığı belirlenmiştir. Aynı şekilde HSA+Docetaxel ile yapılan kombinasyon sonucunda da antagonistik etki gözlenmiştir.

HSM ve cisplatin'in ayrı ayrı uygulandıklarında PC-3 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin, %80 civarında olduğu gözlenirken, kombine halindeki dozunun gösterdiği sitotoksik etkinin bu oranı çok arttırmadığı tespit edilmiştir. Yapılan hesaplama sonucunda HSM'nin cisplatin ile antagonistik etkisinin olduğu görülmüştür. HSM ve docetaxel'in kombinasyonel olarak uygulanması sonucunda da birbirlerinin etkilerini azalttığı ve antagonistik etkiye neden oldukları belirlenmiştir.

PC-3 hücreleri üzerinde, HSA ve HSM 'nin Cisplatin ve Docetaxel ile sinerjizm etkileşiminin araştırılmasında, sinerjizm açısından doz ve konsantrasyon azalmasına bağlı olarak sitotoksik etkinin artması beklenirken, deneyimizde sitotoksik etkinin

azaldığı, A549 hücre hattında HSM ve HSA' nın Cisplatin ve Docetaxel deneyi ile PC-3 hücre hattının HSA ve HSM Cisplatin deneyinde antagonizm gözlenirken, PC-3 hücre hattının HSM ve HSA Docetaxel deneyinde orta derecede antagonizm oluşturduğu gözlenmiştir.

Sinerjistik etkinin araştırılmasına yönelik yapılan bu çalışmada kemöteropatik ilaçlar olan cisplatin ve docetaxel ile *Holothuria sanctori* özütlerinin sinerjik bir etkileşime girmediği, yani birbirlerinin sitotoksik etkilerini artırma eğiliminde olmadıkları aksine; antagonistik bir etkileşimin gerçekleşmesi sonucunda birbirlerinin etkilerini engelledikleri belirlenmiştir. Farklı etki mekanizmalarına sahip ilaçların sinerjistik etkileşimlerinin; terapötik etkinin artırılması, dozu azaltırken etkinliğin artırılması veya sürdürülmesi, ilaç direncinin gelişimini en aza indirmek veya yavaşlatmak ve hedefe karşı seçici sinerjizm sağlamak gibi olumlu sonuçları bulunmaktadır (Chou, 2017). Antagonizmde ise ilaçlar birbirlerinin etkisini sınırladığından dolayı kanserin tedavisi ile ilgili çalışmalarda tercih edilen bir etkileşim değildir.

4.4. HPLC Analizleri

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kolon kromatografisinin bir çeşidi olup, genel olarak aktif bileşenlerin ölçülmesi, tanımlanması ve ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan kolon olarak paketlenen malzemesi; hareketli faz olarak kolon üzerinde hareket edebilen bir pompa ve; moleküllerin tutulma zamanlarını gösteren bir dedektör bulunur. Analizi yapılacak olan örnek küçük miktarlarda mobil fazın akışına eklenir ve sabit fazda spesifik kimyasal veya fiziksel etkileşimlerle yavaşlatılır. Gecikme miktarı analitin yapısı ile sabit ve mobil fazın yapısına göre değişir. Spesifik her bir analitin kolondan ayrıldığı zamana göre örneğin yapısında bulunan bileşenler belirlenir (Malviya vd., 2009).

Denizhiyarları besin ve medikal amaçlarla sıklıkla kullanılmasına rağmen tam olarak fonksiyonları açıklanamamıştır. Anti-tumor, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Bordbar vd., 2011). Deniz salatalıklarının başlıca besinleri, fenolik açıdan zengin olan fitoplanktonlar ve deniz makro alglerinden türeyen parçacıklardır. Bu nedenle denizhiyarlarının dokusunda fenolik bileşiklerin bulunması beklenmektedir. Fenolik maddeler doğal antioksidanların en

önemli grubu olup; oksidatif baskı sonucunda oluşan hücre ölümlerini engellediği belirlenmiştir (Deveci vd., 2016).

Bu çalışmada elde edilen *Holothuria sanctori*'ye ait metanol özütlerinin (HSM), içeriğindeki fenolik bileşiklerin belirlenmesi amacıyla, 15 farklı standart kullanılarak HPLC analizi yapılmıştır. Bu analize göre HSM özütünde; ellagic asit, epicatechin, 2,5 dihidroksi benzoik asit, gallic asit, caffeic asit, vanilic asit, naringin, cinnamic asit, 3,4 dihidroksi asit, chlorojenik asit, 4 hidroksi beznoik asit, p-coumaric asit olmak üzere 12 fenolik bileşik belirlenmiştir.

HSM özütünde en fazla bulunan fenolik bileşik olan ellagic asit, genellikle meyve ve sebzelerde bulunan bir polifenol olup gallic asit dimerizasyonu ile oluşur. antioksidan, antimitojenik ve antikanser özelliklere sahiptir (Jalal ve Pourahmat, 2018). Literatürde yer alan çalışmalarda ellagic asidin mitokondriyal yolağı hedef alan bir apoptotik ajan olduğu öne sürülmüştür. Hücrede ROS üretimini artırarak sitokrom c salınımına neden olduğu, kaspaz -3 aktivasyonunun başladığı ve kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği belirlenmiştir (Salimi vd., 2015).

HSM özütünde ikinci en fazla bulunan fenolik bileşik olan epicatechin CCL B lenfosit hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonu ve PARP'ın kırılmasıyla apoptozu indükleyen ve en fazla yeşilçayda bulunan bir polifenoldür (Ghosh vd., 2009).

Gallic asit veya 3,4,5-trihidroksibenzoik asit bitkilerde en fazla bulunan fenolik bileşik olup; antimikrobiyal, antikanser, antioksidan, antiinflamatuvar etkileri olduğu bilinmektedir (Kahkeshani vd.,2019). Gallic asit gibi caffeic asit, vanilic asit, hidroksi beznoik asit en fazla bulunan fenolik bileşiklerdir. Caffeic acid (3,4-dihydroxy cinnamic acid (CA)) en fazla kahve, sebze, meyve ve zeytinyağında bulunan antioksidan, antiinflamatuvar ve antiproliferatif etkiye sahiptir. Caffeic asidin normal hücrelerde antioksidan ve kanser hücrelerinde pro-oksidan özelliği olduğu bildirilmiştir. Bu pro-oksidan-aracılı oksidatif DNA hasarı ve bununla ilgili sinyaller apoptotik kanser hücresi ölümüne neden olmaktadır (Kanimozhi ve Prasad, 2015). Hidroksisinnamik asitler (HCA'lar), ester, glikozit ve/veya proteinlerin konjugatı olarak oluşan doğal fenilpropenoik asit bileşikleridir. Cinnamic asit, caffeic asit, sinapic asit, o-coumaric asit, m-coumaric asit, p-coumaric asit, ve ferulic asit Hidroksisinnamik asitlerin en bilinenler olup en fazla zeytin ürünlerinde bulunur (Stalmach, 2014).

HPLC analizleri sonucunda HSM özütünde en fazla buldukları belirlenen ellagic asit ve epicatechin' in apoptotik yolla kanser hücreleri üzerine etki ettiği gallic asit ve caffeic asitinde antiproliferatif etkilere yol açtığı literatürde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada da HSM özütünün kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi ve apoptotik yollarla hücre ölümüne neden olduğu yapılan deneylerle belirlenmiş olup; aynı zamanda HSM özütünde bulunan bu fenolik bileşiklerde, yapılan çalışmanın amacına uygun bir şekilde özütün apoptotik yollarla hücre ölümüne neden olduğunu desteklemektedir.

4.5. Sonuçlar ve Öneriler

Bu tez çalışmasında, Gökova körfezinden toplanan ve avlanması zor bir denizhiyari türü olan *Holothuria sanctori*' nin aseton ve metanol ile hazırlanan özütlerinin A549 ve PC-3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri ve mekanizmaları araştırılmıştır. Daha önce sitotoksik aktivitesi araştırılmamış olan *Holothuria sanctori*' nin HSM ve HSA özütlerinin 24, 48 ve 72 saatlerdeki inkübasyon sürelerinde doz ve zamana bağlı olarak sitotoksik aktivitelerine bakıldığında; inkübasyon süresi uzadıkça hücreler üzerinde toksik etki gösteren özütlerin dozu azalmaktadır. Dolayısıyla, *Holothuria sanctori* aseton ve metanol özütlerinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin doza ve zamana bağlı olarak değiştiği; en etkili doz –zaman ikilisinin 72 saat ve 20 mg/ml' lik dozlar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, her iki özütün de en etkili olduğu 72 saat inkübasyon sonrasında IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında, HSA' nın (1.7 mg/ml) daha düşük dozlarda daha yüksek etki gösterdiği gözlenmiştir. PC-3 hücre hattı için ise; HSM ve HSA ile hazırlanan özütlerin zamana bağlı olarak sitotoksik etkilerinin arttığı söylenebilir. Ayrıca HSA ve HSM özütlerinin 24,48 ve 72 saatlerdeki IC₅₀ değerleri kıyaslandığında, her iki özütünde benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda sağlıklı hücre hattı olan HEK293; HSM ve HSA özütlerinin sitotoksik etkilerinin PC-3 ve A549' a kıyasla daha az olduğu görülmüştür.

HSM özütünün A549 hücrelerini apoptoza sürüklediği Annexin V kullanılarak gerçekleştirilen flow sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki HSM özütüne maruz kalan PC-3 kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümü olduğu gözlenmiştir. A549 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrol hücreleri ile

kıyaslandığında yaklaşık 2.1 kat; PC-3 hücrelerinde ise 1.9 kat arttığı belirlenmiştir. Bulunan bu değerler, HSM özütünün A549 ve PC-3 hücre hattında apoptozu indüklediğini ve flow sitometri analizi ve MTT deneyi sonuçlarına göre elde edilen verilerle de tutarlı olduğu görülmektedir.

Holothuria sanctori' ye ait HSA ve HSM özütlerinin kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan cisplatin ve docetaxel ile kombinasyonlarının, A549 ve PC-3 kanser hücre hatları üzerindeki etkileşimleri araştırılmıştır. Bunun sonucunda tüm etkileşimlerin antagonistik olduğu belirlenmiştir.

HPLC analizi ile HSM özütünün içeriğindeki fenolik bileşikler belirlenmiştir. yapılmıştır. Bu analize göre HSM özütünde en fazla bulunan fenolik bileşikler olan ellagic asit ve epicatechin' in apoptotik yolla kanser hücreleri üzerine etki ettiği literatürde yer almakta olup bu çalışmada elde edilen daha önceki verileri de desteklemektedir.

Bu çalışma ile ekonomik değeri oldukça yüksek olan ve ülkemiz denizlerinde de yayılış gösteren bir denizhiyari türü olan *Holothuria sanctori*'nin sitotoksik etkileri ve bu etkiye neden olan mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu türe ait başka bir bilimsel çalışmanın olmamasından dolayı önemlidir. İlerleyen çalışmalarda apoptoza neden olan etkenlerin araştırılması ve saflaştırılarak hücreler üzerinde denenmesi, etki mekanizmalarının açığa kavuşturulması ve son olarak bir antikanser ajanı olarak değerlendirilebilmesi için hayvan deneylerinin yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKÇA

- Abraham, T.J., Nagarajan, J., Shanmugam, S.A. (2002) Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species, *Indian J Mar Sci*, 31:161–164.
- Adrian, T.E. (2007) Novel marine-derived anti-cancer agents, *Curr Pharm Des*, 13: 3417–3426.
- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., Raft, M., Roberts, K. ve Walter, P. (2002). Cancer, In: *Molecular Biology of The Cell*. New York: *Garland Science*, 1313-1362
- Althunibat, O., Hashim, R., Taher, M., Daud, J., Ikeda, M., Zali, B.I. (2009). *In Vitro* Antioksidant and Antiproliferative Activities Of There Malaysian Sea Cucumber Species. *European J Sci Res*, 376-387.
- Aminin, D., Menchinskaya, E., Pislugin, E., Silchenko, A., Avilov, S. ve Kalinin, V. (2015). Anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides, *Mar Drugs*, 1202-1223.
- Aydın, M. (2013) Denizhıyarı *Holothuria (Platyperona) sanctori* Delle Chiaje, 1823 (Echinodermata: Holothuroidea) türünün bazı biyolojik özellikleri, *Biological Diversity and Conservation*, 6(3): 153-159.
- Aydın, M. (2015). Türkiye Denizlerinde Dağılım Gösteren Denizhıyarı (Echinodermata: Holothuroidea) Türleri Hakkında Ön Araştırmalar. *Ekoloji Sempozyumu*, 483 s.
- Aydın, M. ve Erkan, S. (2011). Identification and some biological characteristics of commercial sea cucumber in the Turkey coast waters, *Int J Fish Aquat Stud*, 3(1): 260-265.
- Aydın, M., Sevgili, H., S., Tufan, B., Yılmaz, E., Köse, S. (2011) Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *Int. J Food Sci Technol*, 46: 500–508.

- Aydın, M. (2016) Türkiye Denizlerindeki Deniz Hıyarı (Holothuroidea) Türleri, *Türk Denizcilik ve Deniz Bilimleri Dergisi*, 2(1): 49-584.
- Baharara, J., Amini, E., Afzali, M., Nikdel, N., Mostafapour, A., Kerachian, M. A. (2016). Apoptosis inducing capacity of *Holothuria arenicola* in CT26 colon carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*”, *Iran J Basic Med Sci*, 19(4): 358-3.
- Blunt, J. W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G., Prinsep, M.R. (2016) Marine natural products, *Nat Prod Rep*, 29:144–222.
- Bordbar, S., Anwar, F., Nzamid, S. (2011) High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods-A review, *Mar Drugs*, 9: 1761-1805.
- Bruckner, A.W., Johnson, K.A. and Field, J.D. (2003) Conservation Strategies for Sea Cucumbers. Can a CITES Appendix II Listing Promote Sustainable International Trade? SPC Beche-de-Mer, *Inform Bulletin*, 18: 24-33.
- Chait, R., Craney, A., Kishony, R. (2007) Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature*, 446: 668–671.
- Chapter 42 - Bioavailability of Dietary Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids
Angélique Stalmach Polyphenols in Human Health and Disease, Volume 1, 2014, 561-576.
- Chou T-C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-talalay method, *Cancer Res*, 70(2):440-446.
- Chou, T.C. (2006) Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, *Pharmacol Rev*, 58(3):621-81.
- Cragg, G. M., Newman, D.J. (2013) Natural products: A continuing source of novel drug leads, *Biochim Biophys Acta*, 1830(6): 3670-95.
- Da Rocha, A.B., Lopes, R. M., Schwartsmann, G. (2001). Natural products in anticancer therapy, *Curr Opin Pharmacol*, 1:364-369.
- Deveci, H.A., Gökhan, N., Kırpık, M.A., Harmankaya, A., Yıldız, Y. (2016) Fenolik Bileşik İçeren Bitkisel Antioksidanlar, *Fen Bil Enst Derg*, 9 (1): 26 - 32.

- Elmallah, M.I.Y., Micheau, O. (2015) Marine drugs regulating apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), *Mar Drugs*, 13:6884–6909.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicol Pathol*, 35(4): 495–516.
- Fassy, F., Dureuil, C., Lamberton, S., Mathieu, M., Michot, N., Ronan, B., Pasquier, B. (2017) Chapter Twenty-Six - In Vitro Characterization of VPS34 Lipid Kinase Inhibition by Small Molecules, *Method Enzymol*, 587: 447-464.
- Faulkner, D. J. (2000) Marine natural products, *Nat Prod Rep*, 17: 7–55.
- Fouquier, J., and Guedj, M. (2015). Analysis of drug combinations: current methodological landscape, *Pharmacol Res Perspect* 3(3): e00149.
- Gabrielli, B., Brooks, K., Pavey, S. (2012) Defective cell cycle checkpoints as targets for anti-cancer therapies, *Front Pharmacol* 3:9.
- Gautam, N., Mantha, A.K., Mittal, S. (2014) Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view, *BioMed Res Int*, Article ID 154106, 23.
- Ghosh, A.K., Kay N.E., Secreto, C.R., Shanafelt, T.D.(2009) Curcumin inhibits pro-survival pathways in CLL B-cells and has the potential to overcome stromal protection of CLL B-cells in combination with EGCG, *Clin Cancer Res*, 15(4):1250.
- Greco, W. R., Faessel, H., ve Levasseur, L. (1996). The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: a case of Dorothy and the ruby slippers, *J Natl Cancer Inst*, 88: 699–700.
- Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008) Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Y.Y.Ü Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2): 73-78.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144: 646–674.
- Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, O.M., Stensvag, K. (2002) Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea), *J Invertebr Pathol*, 81(2):94–102.

- Higuchi, R., Inagaki, K., Natori, T., Komori, T., Kawajiri, S. (1991) Biologically-active glycosides from Asteroidea 25. Glycosphingolipids from the starfish *Asterina pectinifera*. 2. Structure of three ganglioside molecular-species and a homogeneous ganglioside, and biological-activity of the ganglioside, *Liebigs Ann*, 1:1–10.
- Hussain, M.S., Fareed, S., Ansari, S., Khan, M.S. (2012) Marine natural products: A lead for Anti-cancer, *Indian J Geo-Mar Sci*, 41(1): 27-39.
- Janakiram N.B., Mohammed A. ve Rao C.V. (2015B) Sea Cucumbers Metabolites as Potent Anti-Cancer Agents, *Mar Drugs*, 13: 2909-2923.
- Janakiram, N.B., Mohammed, A., Taylor, B., Lightfoot, S., Collin, P.D., Steele, V.E., Rao, C.V. (2015A) Improved innate immune responses by Frondanol A5, a sea cucumber extract, prevent intestinal tumorigenesis, *Cancer Prev Res*, 8: 327–337.
- Kahkeshani, N., Farzaei, F., Fotouhi, M., Alavi, S.S., Bahramsoltani, R., Naseri, R., Momtaz, S., Abbasabadi, Z., Rahimi, R., Farzaei, M.H., Bishayee, A. (2019) Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review, *Iran J Basic Med Sci*, 22(3): 225–237.
- Kanadaswami, C., Lee, L., Lee, P.H., Hwang, J.J., Ke, F.C. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, 19:895-909.
- Kaneko, M., Kisa, F., Yamada, K., Miyamoto, T., Higuchi, R. (2003) Structure of a new neuritogenic-active ganglioside from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, *Eur J Org Chem* 6:1004–1008.
- Kanev, M., Muranlı, F.D.G. (2016) Flow sitometri ve kullanım alanları, *SAÜ Fen Bil Der*, 20(1): 33-38.
- Kanimozhi, G., Prasad, N.R. (2015) Anticancer Effect of Caffeic Acid on Human Cervical Cancer Cells, *Coffee in Health and Disease Prevention Chapter 73*, 655-661 s.
- Kelly, M.S. (2005) Echinoderms: Their culture and bioactive compounds. *Prog Mol Subcell Biol*, 39: 139–165.
- Kelly, M.S., Kalinin, V.I., Prokofieva. N.G., Likhatskaya, G.N., Schentsova, E.B., Agafonova, I.G., Avilov, S.A., Drozdova, O.A. (1996) Hemolytic activities of triterpene glycosides from the holothurian order dendrochirotida: some trends in the evolution of this group of toxins, *Toxicon* 34(4):475–483

- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, 26: 239–257.
- Kuete, V., Karaosmanoglu, O., Sivas, H. (2017) Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables 2nd Edition, 2017, 271-297 s.
- Laubenbacher, R., Hower, V., Jarrah, A., Torti, S.V., Shulaev, V., Mendes, P. (2009) A systems biology view of cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1796: 129–139.
- Li, Z.G., Wang, H.L., Li, J.Z., Zhang, G.S. ve Gao, C.J. (2000) Basic and clinical study on the antithrombotic mechanism of glycosaminoglycan extracted from sea cucumber, *Chinese Med J Peking*, 113(8):706–711.
- Liu, X., Liu, Y., Hao, J., Zhao, X., Lang, Y., Fan, F. (2016) *In vivo* anticancer mechanism of low-molecular-weight fucosylated chondroitin sulfate (LFCS) from sea cucumber *Cucumaria frondosa*, *Mol Basel Switz*, 2016;21.
- Lu, L., Zhang, L., Wai, M.S., Yew, D.T., Xu, J. (2012). Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury, *Toxicol In Vitro*, 26 (4), 636–644.
- Maier, M.S., Roccatagliata, A.J., Kuriss, A., Chludil, H., Seldesi A.M., Pujol, C.A., Damonte, E.B. (2001) Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*, *J Nat Prod* 64(6):732–736
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P., Sharma P.K. (2010) High Performance Liquid Chromatography: A Shortreview, *J Glob Pharma Technol*, 2(5): 22-26.
- Migas, E.A., Klemenchenko, E.G. (1990) Pharmacological effects of the sea-cucumber *Stichopus japonicus* extract, *Biol Morya-Mar Biol*, 5:72–76.
- Mourao PAS, Pereira MS (1999) Searching for alternatives to heparin – sulfated fucans from marine invertebrates, *Trends Cardiovas Med*, 9(8):225–232
- Mourao, P.A.S., Pereira, M.S., Pavao, M.S.G., Mulloy, B., Tollefsen, D.M., Mowinckel, M.C., Abildgaard, U. (1996) Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm – sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action, *J Biol Chem*, 271(39):23973–23984.

Murray, A.P., Muniain, C., Seldes, A.M., Maier, M.S. (2001) Patagonicoside A: a novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus*. *Tetrahedron* 57(47):9563–9568

Natural Products website, 2004, <http://www.psoriasis.com/seacucumber.html>.

Neto, C.C. (2007) Cranberry and Its phytochemicals: a review of *in vitro* anticancer studies. *J Nutr*, 137:186–193.

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S. Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B., Bao, J.K. (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Prolif*, 45:487–498.

Pucci, B., Kasten, M., Giordano, A. (2000) Cell cycle and apoptosis, *Neoplasia*, 2(4):291–9.

Qian, B.Z. (2017) Inflammation fires up cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* [Internet].; Available from:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X17302109>.

Qian, B.Z. (2017) Inflammation fires up cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* [Internet]. Available from:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X17302109>.

Qian, W., Tao, L., Wang, Y., Zhang, F., Li, M., Huang, S. (2015) Downregulation of integrins in cancer cells and anti-platelet properties are involved in Holothurian glycosaminoglycan-mediated disruption of the interaction of cancer cells and platelets in hematogenous metastasis, *J Vasc Res*, 52(3):197–209.

Rajasekaran, A., Sivagnanam, G., Xavier, R. (2008) Nutraceuticals as therapeutic agents: A review research. *J Pharm Technol*, 1: 328–340.

Ranjit, P.M., Krishna, M.R., Silpa, P., Nagalakshmi, V., Anjali, M. (2012) *In vitro* cytotoxic activities of *Calotropis procera* latex and flower extracts against MCF-7 and HeLa cell line cultures, *Int J Pharm Pharm Sci*, 4:66-70.

Rodriguez, J., Castro, R., Riguera, R. (1991) Holothurinosides – new antitumor nonsulfated triterpenoid glycosides from the sea-cucumber *Holothuria forskalii*. *Tetrahedron* 47(26):4753–4762

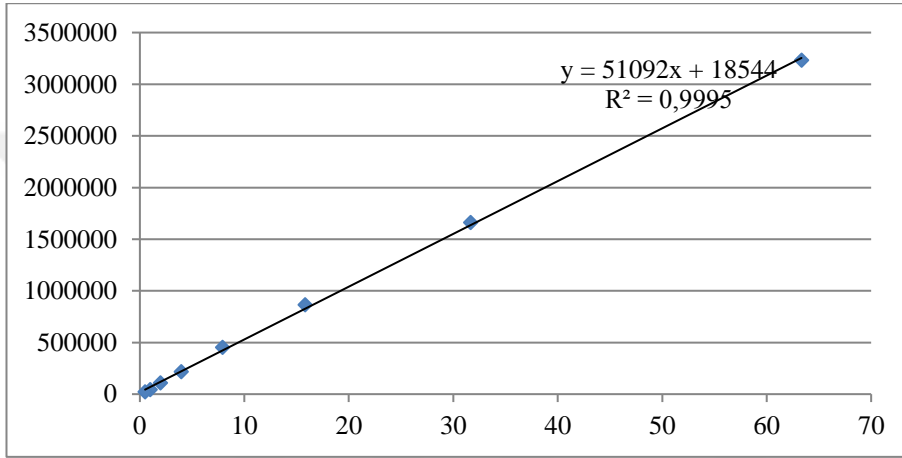
- Salimi, A., Roudkenar, M.H., Sadeghi, L., Mohseni, A., Seydi, E., Pirahmadi, N. (2015) Ellagic acid, a polyphenolic compound, selectively induces ROS-mediated apoptosis in cancerous B-lymphocytes of CLL patients by directly targeting mitochondria, *Redox Biol*, 6:461–71.
- Scripture, C.D. ve Figg W.D. (2006) Drug interactions in cancer therapy Center for Cancer Research, *Nat Rev Cancer*, 6(9):741.
- Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest*. 1999;104(12):1645–53. [https:// doi.org/10.1172/JCI9054](https://doi.org/10.1172/JCI9054)
- Stein, G.S., Luebbers, K.P. (2019) Cancer Prevention, early Detection, Treatment and recovery, Second edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Subramaniya, B.R., Srinivasan, G., Sadullah, S., Sadullah, M., Davis, N., Baddi, L., Subhadara, R., Halagowder, D. (2011) Apoptosis-inducing effect of plumbagin on colonic cancer cells depends on expression of COX-2, *PLoS One*, 6:e18695.
- Sugwara. T., Zamia, N., Yamamoto, A., Sakai, S., Noguchi, R., Hiraia, T. (2006). Isolation of shignoid bases of sea cucumber cerebroside and their cytotoxic activity against colon cancer cells, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2906-2912.
- Tapon-Brethaudiere, J., Chabut, D., Zierer, M., Matou, S., Helley, D., Bros, A., Mourao, P.A.S., Fischer, A.M. (2002) A fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm modulates *in vitro* fibroblast growth factor 2-dependent angiogenesis, *Mol Cancer Res*, 1(2):96–102
- Tian, F., Zhang, X., Tong, Y., Yi, Y., Zhang, S., Li, L., Sun, P., Lin, L., Ding, J. (2005) PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Biol Ther*, 4: 874–882.
- Vincent, T., DeVita, Jr., Edward, Chu. (2008) A History of Cancer Chemotherapy, *Cancer Res*, 68:8643-8653.
- Wang, D., Lippard, S.J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discovery*, 4:307-20.
- Wargasetia, T.L. ve Widodo. (2017) Mechanisms of cancer cell killing by sea cucumber-derived compounds, *Invest New Drugs*, 35:820–826.

- Wargasetia, T.L., Shahib, M.N., Martaadisoebrata, D., Dhianawaty, D., Hernowo, B. (2015) Characterization of apoptosis and autophagy through Bcl-2 and Beclin-1 immunoexpression in gestational trophoblastic disease, *Iranian Reprod Med*, 13(7):413–420.
- Wong, R.S.Y. (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *J Exp Clin Cancer Res*, 30:87
- Yaacob, H.B., Kim, K.H., Mustapha, M.S. (1994) Antinociceptive effect of the water extract of Malaysian sea-cucumber, *Asia Pac J Pharmacol*, 9(1):23–28.
- Yamada, K., Matsubara, R., Kaneko, M., Miyamoto, T., Higuchi, R. (2001) Constituents of Holothuroidea. 10. Isolation and structure of a biologically active ganglioside molecular species from the sea cucumber *Holothuria leucospilota*, *Chem Pharm Bull*, 49(4):447–452.
- Yang, P.Y., Collin, P., Madden, T., Chan, D., Sweeney-Gotsch, B., McConkey, D., Newman, R.A. (2003) Inhibition of proliferation of PC-3 cells by the branched-chain fatty acid, 12-methyltetradecanoic acid, is associated with inhibition of 5-lipoxygenase, *Prostate*, 55(4):281–291.
- Ye, W. (2016) The complexity of translating anti-angiogenesis therapy from basic science to the clinic, *Dev Cell*, 37(2):114–25
- Zhao, Q., Liu, Z.D., Xue, Yet. (2011) Ds-echinoside A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF- κ B-dependent MMP-9 and VEGF expressions, *J Biomed Biotechnol*, 12(7):534–544.
- Zou, Z.R., Yi, Y.H., Wu, H.M., Wu, J.H., Liaw, C.C., Lee, K.H. (2003) Intercedensides A–C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens*, *Lampert. J Nat Prod*, 66(8):1055–1060

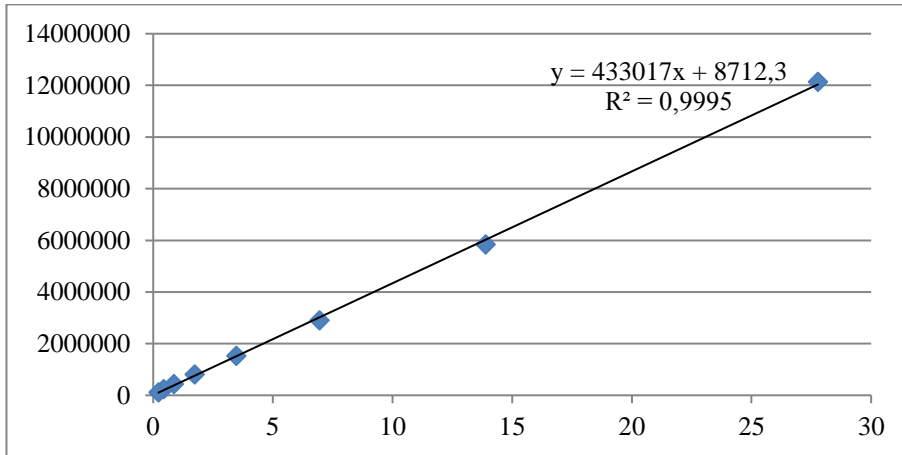
7. EKLER

EK. A: HPLC Standart kalibrasyon eğrileri

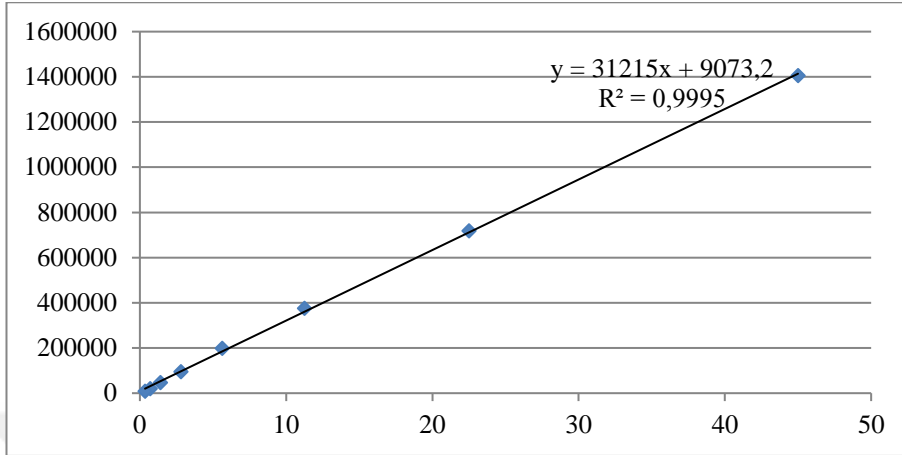
a) Gallic asit kalibrasyonu



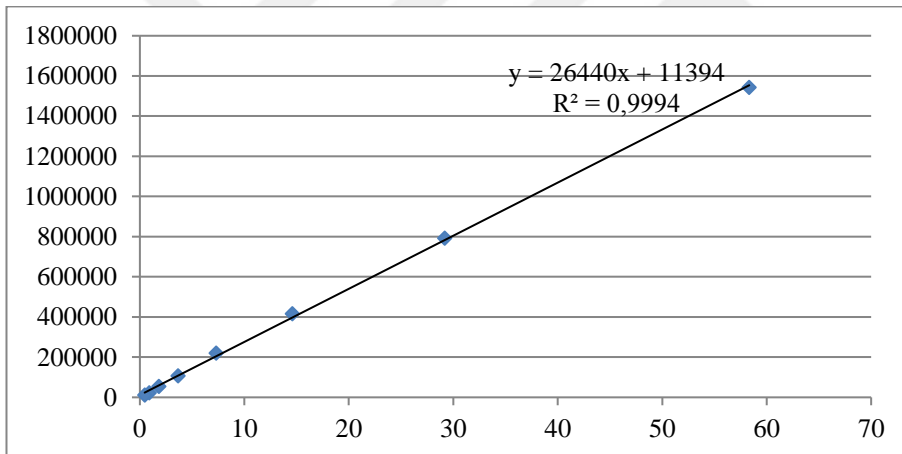
b) 3,4 dihidroksi kalibrasyonu



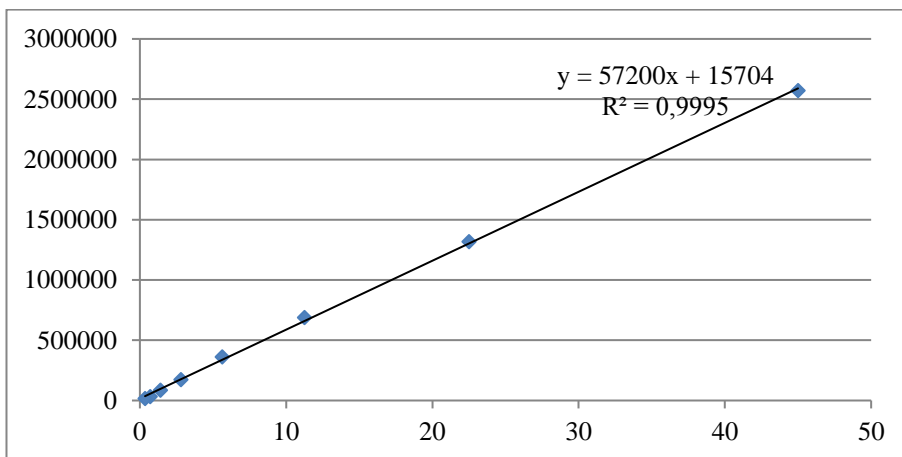
c) 4-dihidroksi kalibrasyonu



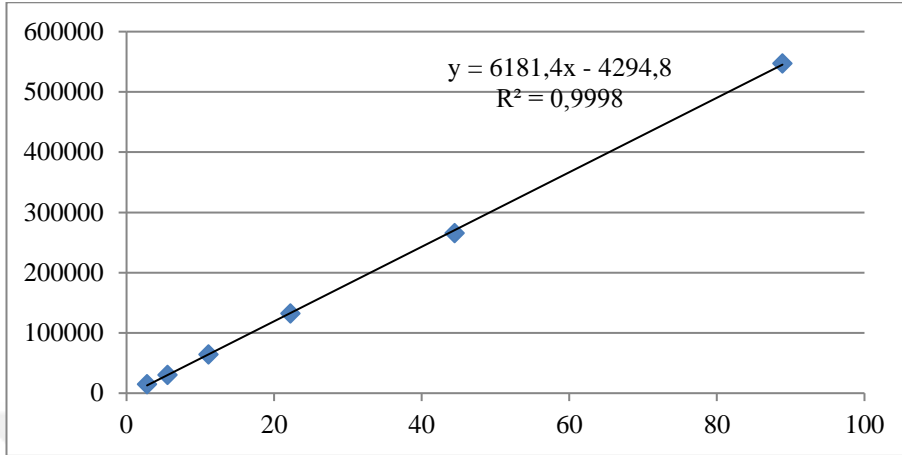
d) Chlorojenik Asit kalibrasyonu



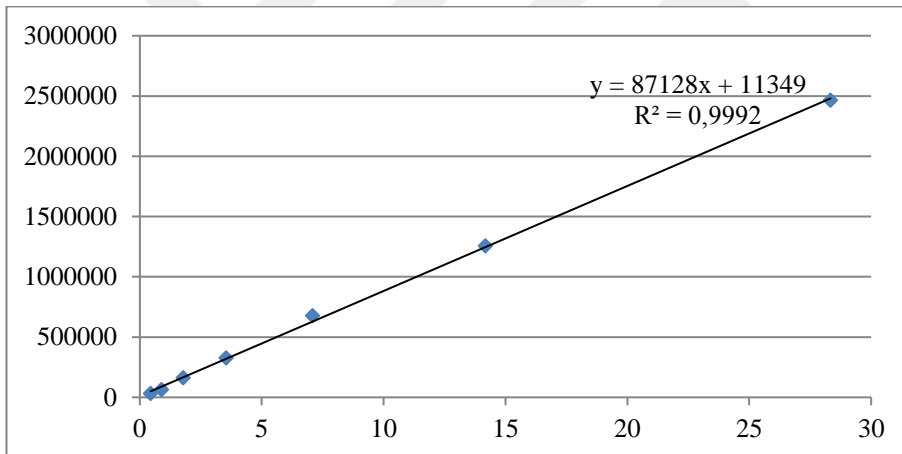
e) Vanilik Asit kalibrasyonu



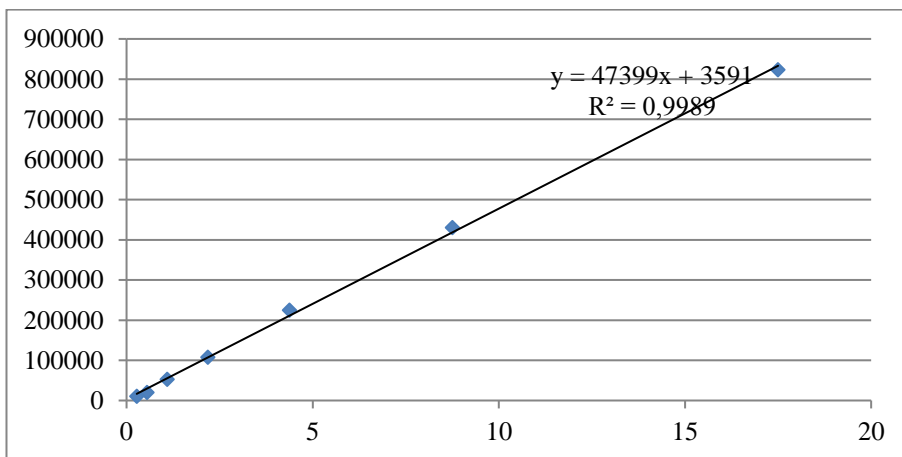
f) Caffeic Asit kalibrasyonu



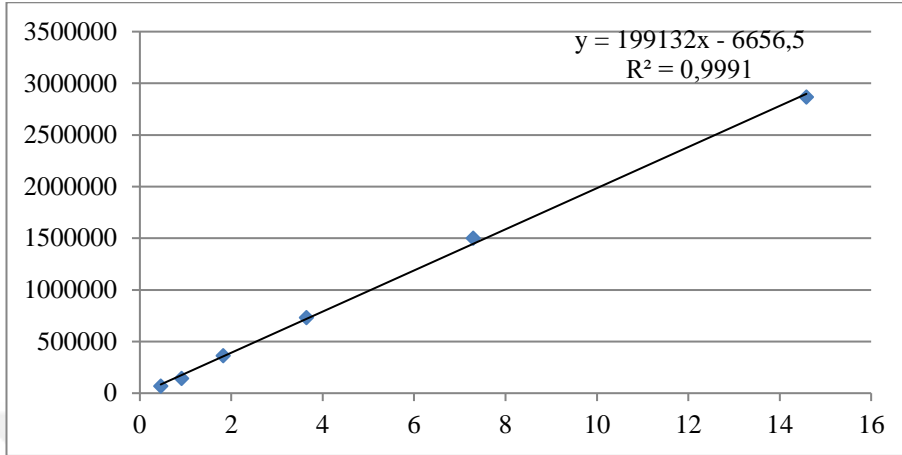
g) p-CoumaricAsit kalibrasyonu



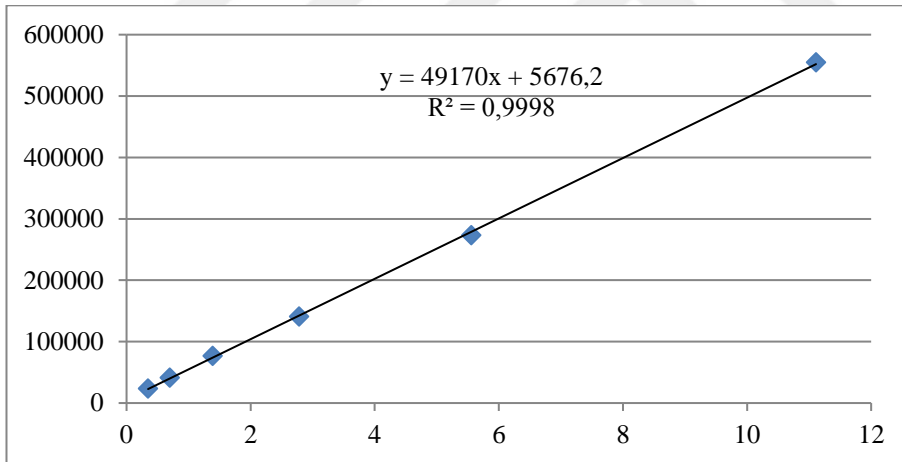
h) Ferulik Asit kalibrasyonu



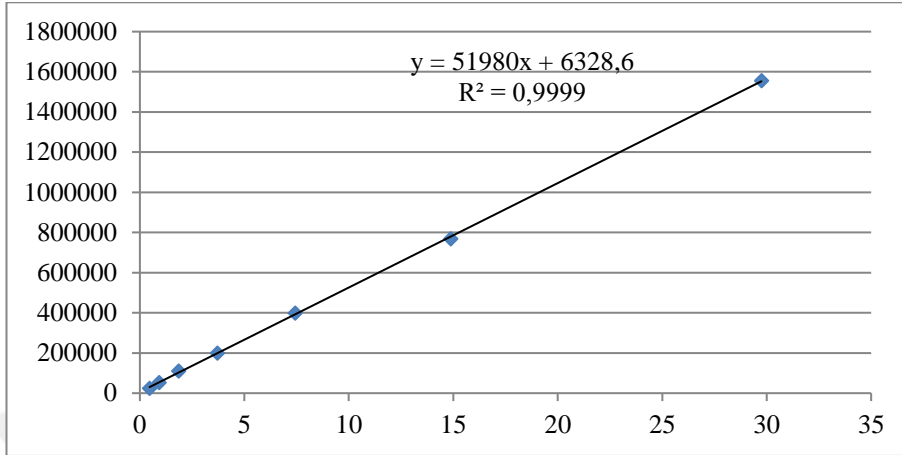
I) Cinnamic Asit kalibrasyonu



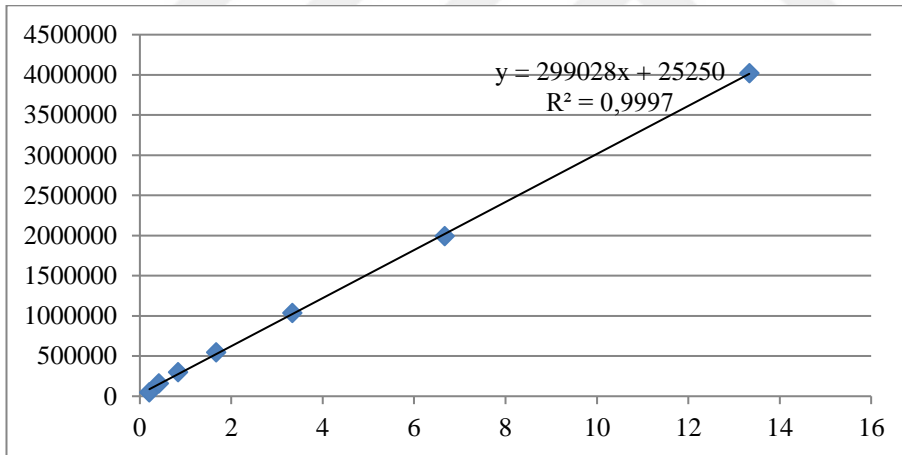
i) 2,5-dihidroksi kalibrasyonu



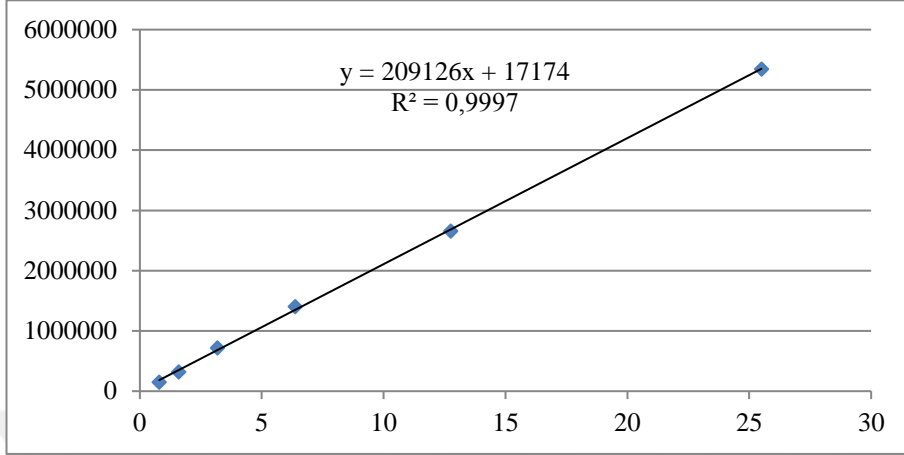
k) Epicatechin kalibrasyonu



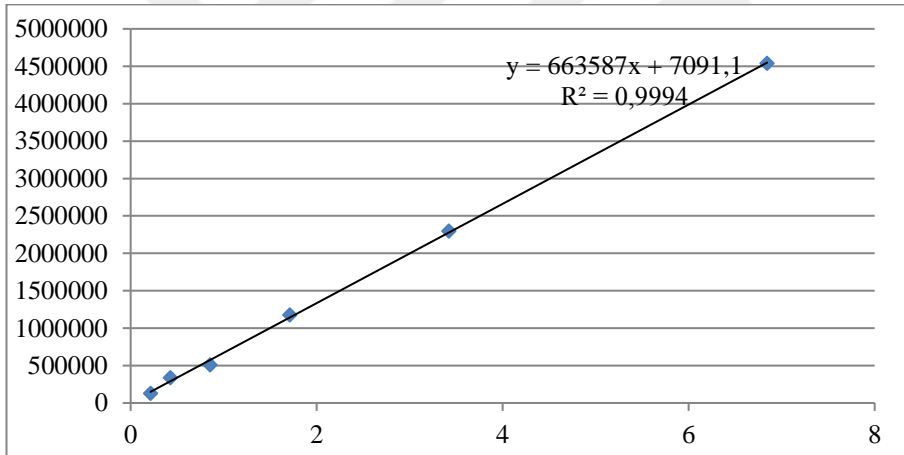
l) Rutin kalibrasyonu



m) Ellagic kalibrasyonu



n) Quercetin kalibrasyonu



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad ve soyad :Nuray ARSLAN

Uyruğu :Türkiye Cumhuriyeti

Doğum yeri ve tarihi :Zonguldak / 28.03.1987

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı kurum/ Üniversite	Bölüm/Mezuniyet yılı
Lise	Ankara Gölbaşı Sağlık Meslek Lisesi	Hemşirelik/2005
Önlisans	Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Hizm. Meslek Yüksek Okulu	Laboratuvar teknisyenliği/2009
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi	Biyoloji/2016
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	Biyoloji/2019

Mesleki Tecrübe

1.08.2005 - 4.08.2007 yılları arası Ankara Özel Akay Hastanesi

9.08.2007 – 15.11.2012 yılları arası Zonguldak Uzun Mehmet Göğüs ve Meslek Hastalıkları Hastanesi

30.11.2012- Halen Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi

İngilizce	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		x	
Konuşma		x	
Anlama		x	
Okuma		x	