



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN MEME KANSERİ  
(MCF-7) HÜCRE SERİSİ ÜZERİNDE  
MİKRORNA EKSPRESYONU ve APOPTOZA  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Sema MISIR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON-2017





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TÜRK PROPOLİSİNİN MEME KANSERİ  
(MCF-7) HÜCRE SERİSİ ÜZERİNDE  
MİKRORNA EKSPRESYONU ve APOPTOZA  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Sema MISIR

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

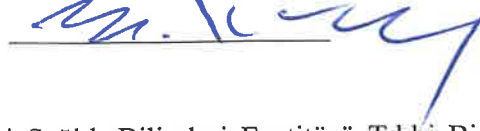
TRABZON-2017

## ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. S. Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Sema MISIR'ın hazırladığı "Türk Propolisinin Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Serisi Üzerinde MikroRNA Ekspresyonu ve Apoptoza Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oybirliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

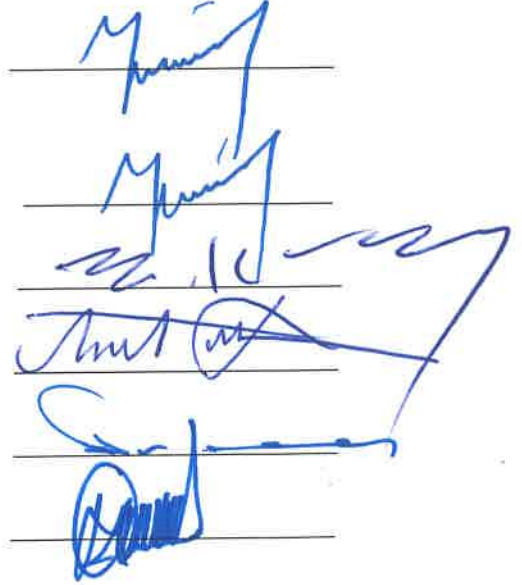
Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Prof. Dr. S. Caner KARAHAN

Prof. Dr. Ahmet AYAR

Prof. Dr. Tefvik NOYAN

Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU



Tarih:17/11/2017

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 17/11//2017

SEMA MISIR

İmza

## İTHAF

*'Ölümü yakıştırmak, ölümü anlatmak kolaydır kanser hastalarına. Kolay olmayan, onlar gibi kanserle mücadele edip umutla bakabilmektir hayata'... Hayata umutla bakarlara... Bu uğurda bilime emek veren herkese...*

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca her konuda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, öğrencisi olmaktan her zaman onur duyduğum, sabır ve güler yüzlülüğü ile bilimin amacını ve bilimsel düşünmeyi bana öğreten danışman hocam Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na,

Lisansüstü öğrenimim boyunca bilimsel ve manevi yönden yetişmemde emekleri geçen değerli hocalarım; Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Eşref Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE ve Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a,

Bir ekip olmanın getirdiği birlik ve bütünlüğü bana her zaman hissettiren, çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve onların çırakları olmaktan her zaman gurur duyduğum değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Selim DEMİR ve Gümüşhane Üniversitesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. İbrahim TURAN'a,

Tanıdığım ilk günden beri başarılı, sevgi dolu ve yardımsever kişilikleriyle her zaman her konuda yanımda olan dostlarım Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN ve Dr. İmran İNCE'ye,

Laboratuvar çalışmalarım süresince hiçbir konuda yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ersan KALAY'a,

Çalışmanın çeşitli kademelerinde emekleri bulunan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm değerli arkadaşlarım, Arş. Gör. İdris ER, Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU BUDAK başta olmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki tüm değerli arkadaşlarım ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tüm öğretim üyesi ve çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasında, her koşulda yanımda olup benimle ağlayıp...benimle gülen sevgili dostlarım Arş. Gör. İnci DURUKAN ve Dilek KOCABAŞ'a,

Bugünlere gelmemde sonsuz özveri ve emek veren, yaptığım tüm tercihlerde yanımda duran, mutluluk kaynağım aileme minnet ve şükranlarımı sunarım. Varlığına her daim şükrettiğim güzel insanlar iyi ki varsınız...

Bu tez çalışması KTÜ BAP 2016-5680 numaralı proje bütçesi tarafından desteklenmiştir.

Arş. Gör. SEMA MISIR





## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>KABUL ve ONAY</b>	
<b>BEYAN</b>	
<b>TEŞEKKÜR</b>	
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b>	<b>xiii</b>
<b>SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ</b>	<b>xiv</b>
<b>1.ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>3. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>3</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER</b>	<b>5</b>
4.1. Propolis	5
4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri	6
4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği	6
4.1.2.1. Propolisin İçeriğinde Bulunan Flavonoidler	8
4.1.2.2. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)	9
4.1.2.3. Arı Mumu, Yağ Asitleri ve Esansiyel Yağlar	9
4.1.2.4. Mineral Elementler	9
4.1.3. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri	9
4.1.4. Propolisin Antikanser Özellikleri	10
4.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres	11
4.2.1. Serbest Radikaller	11
4.2.2. Serbest Radikal Türleri	12
4.2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri	13
4.2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	14
4.3. Kanser	15
4.3.1. Meme Kanseri	17
4.3.2. Kanser ve Reaktif Oksijen Türleri	18
4.4. MikroRNA	21
4.3.1. MikroRNA'ların yapısı ve Oluşumu	21

4.3.2. MikroRNA'ların Fonksiyonu ve Moleküler Etki Mekanizması	23
4.3.3. MikroRNA ve Kanser	24
4.4.4. Tümör Supresör ve Onkogen MikroRNA'lar	26
4.4.4.1. Tümör Supresör MikroRNA'lar	27
4.4.4.2. Tümör Onkogen MikroRNA'lar	28
4.4.5. Meme Kanseri ve MikroRNA İlişkisi	29
4.4.6. MikroRNA ve Kanser Tedavisi	31
4.4.7. MikroRNA ve Polifenol İlişkisi	32
4.5. Hücre Döngüsü	33
4.5.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü	37
4.5.2. Hücre Döngüsü ve MikroRNA	37
4.5.3. Hücre Döngüsü ve Reaktif Oksijen Türleri	39
4.6. Hücre Ölümü	39
4.6.1. Apoptoz	40
4.6.1.1. Apoptoz Yolakları	41
4.6.2. MikroRNA ve Apoptoz	44
4.7. Sitotoksikite Testleri	46
4.8. Flow Sitometri	48
4.8.1. Flow Sitometri ile DNA Analizi	48
4.9. Apoptoz Tayininde Kullanılan Yöntemler	49
4.10. Western Blot Yöntemi	50
4.11. RealTime-PCR	50
<b>5. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	
5.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	52
5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	53
5.3. Etanollü Propolis Ekstraktının Hazırlanması	54
5.4. Propolis Ekstraktının Antioksidan İçeriğinin Belirlenmesi	55
5.4.1. Toplam Polifenolik İçeriğinin Belirlenmesi	55
5.4.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi	56
5.5. Hücre Kültürü	58
5.5.1. Meme Kanseri ve Fibroblast Hücre Serilerinin Eldesi ve Kültürü	58
5.5.2. Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması	59

5.6. Hücrelerin Canlılık Testi, MTT Analizi	60
5.7. Hücre Döngüsü ve Apoptozun Flow Sitometrik Olarak Belirlenmesi	61
5.7.1. Hücre Döngüsü Analizi	62
5.7.2. Anneksin V Analizi	63
5.8. Western Blot Analizi	64
5.8.1. Hücrelerden Protein Lizat Eldesi	66
5.8.2. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması	67
5.8.2.1. SDS-PAGE Jel Elektroforez Camlarının Hazırlanması	67
5.8.2.2. Ayırma Jelinin Hazırlanması	67
5.8.2.3. Yükleme Jelinin Hazırlanması	68
5.8.3. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi	68
5.8.4. Western Blotlama (Islak Blotlama)	69
5.9. MikroRNA Ekspresyon Seviyelerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi	70
5.9.1. MikroRNA İzolasyonu	71
5.9.2. MikroRNA Örneklerinden cDNA Sentezi	72
5.9.3. Real Time PCR Protokolü	73
5.10. İstatistiksel Yöntemler	75
<b>6. BULGULAR</b>	
6.1. Etanollü Propolis Ekstraktının Antioksidan İçeriğinin Belirlenmesi	76
6.2. Sitotoksisite Analizi ile İlgili Bulgular	76
6.2.1. MCF-7 ve Fibroblast Hücre Serilerinde Sitotoksisite Çalışmaları	76
6.2.1.1. Etanollü Propolis Ekstraktının Sitotoksik Etkisi	76
6.2.1.2. Paklitakselin Sitotoksik Etkisi	77
6.2.1.3. Kuersetinin Sitotoksik Etkisi	78
6.3. Flow Sitometrik Analiz Bulguları	79
6.3.1. Hücre Döngüsü Analiz Bulguları	81
6.4. Western Blot Analiz Bulguları	85
6.5. MikroRNA Ekspresyonu Analiz Bulguları	86
6.5.1. miR-34 Ekspresyon Seviyeleri	87
6.5.2. miR-15a Ekspresyon Seviyeleri	88
6.5.3. miR-16-5p Ekspresyon Seviyeleri	88
6.5.4. miR-145 Ekspresyon Seviyeleri	89

6.5.5. miR-21 Ekspresyon Seviyeleri	89
<b>7. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	91
<b>8. KAYNAKLAR</b>	102
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	123



## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> Propoliste bulunan başlıca bileşenler	7
<b>Tablo 2.</b> Propolisin içeriğinde bulunan flavonoid türleri	8
<b>Tablo 3.</b> Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri	12
<b>Tablo 4.</b> Antioksidan savunma sistemi elemanları	15
<b>Tablo 5.</b> Hücre döngüsünün ilerleyişini sağlayan siklin-CDK kompleksleri ve etki ettikleri evreler	36
<b>Tablo 6.</b> CDK inhibitör ailelerinin üyeleri ve işlevleri	36
<b>Tablo 7.</b> Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler	52
<b>Tablo 8.</b> Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri ve üretici firmalar	53
<b>Tablo 9.</b> Propolis ekstraktının toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi	56
<b>Tablo 10.</b> Propolis ekstraktının toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi	57
<b>Tablo 11.</b> Ayırma jeli İçeriği	68
<b>Tablo 12.</b> Yükleme jeli içeriği	68
<b>Tablo 13.</b> cDNA sentezi için kullanılan primer dizileri	72
<b>Tablo 14.</b> miRNA örneklerinden cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri	72
<b>Tablo 15.</b> RT-PCR’da kullanılan primer dizileri	73
<b>Tablo 16.</b> RT-PCR analizi için gerekli reaksiyon bileşenleri	74
<b>Tablo 17.</b> RT-PCR protokolü	75
<b>Tablo 18.</b> Etanollü propolis ekstraktının antioksidan içeriği	76
<b>Tablo 19.</b> Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi	76
<b>Tablo 20.</b> Etanollü propolis ekstraktının Fibroblast hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi	76
<b>Tablo 21.</b> Paklitakselin MCF-7 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi	77
<b>Tablo 22.</b> Paklitakselin Fibroblast hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi	77
<b>Tablo 23.</b> Kuersetinin MCF-7 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi	78
<b>Tablo 24.</b> Kuersetinin Fibroblast hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi	78
<b>Tablo 25.</b> MCF-7 hücre serisinde Anneksin V analizi % hücre oranları	79
<b>Tablo 26.</b> MCF-7 hücre serisindeki tüm gruplara ait hücre döngüsü analizi % hücre oranları	82

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1.</b> Çalışma için kullanılan propolis örnekleri	6
<b>Şekil 2.</b> Flavonoidlerin genel yapısı	8
<b>Şekil 3.</b> Oksidan ve antioksidan denge	14
<b>Şekil 4.</b> Tümör oluşum evreleri	17
<b>Şekil 5.</b> Kanser hücrelerinde üretilen ROS tümör mikroçevre oluşturmaya anjiyojeneze ve tümör progresyonuna etki eder	20
<b>Şekil 6.</b> Pre-miRNA sap-ilmik yapısı	22
<b>Şekil 7.</b> miRNA sentezi ve mRNA ile regülasyonu. Regülasyon miRNA tarafından mRNA degradasyonu veya translasyonun inhibe edilmesi ile gerçekleşir	23
<b>Şekil 8.</b> miRNA genlerinin transkripsiyonel olarak regülasyonu	25
<b>Şekil 9.</b> Tümör supresör ve onkogen olarak davranan miRNA'ların etkisi	26
<b>Şekil 10.</b> Meme kanserini etkileyen onkogen ve supresör miRNA'lar	30
<b>Şekil 11.</b> Polifenol bileşikler çeşitli onkojenik veya tümör supresör miRNA'ları hedefleyerek gen ifadelerini düzenler	33
<b>Şekil 12.</b> Hücre döngüsü evreleri	34
<b>Şekil 13.</b> Hücre döngüsü evrelerinde siklin-CDK kompleksleri	35
<b>Şekil 14.</b> Hücre döngüsü kontrolünde yer alan mikroRNA ve etki molekülleri	39
<b>Şekil 15.</b> İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları	42
<b>Şekil 16.</b> Apoptotik süreçte yer alan miRNA'lar	44
<b>Şekil 17.</b> p53'ün hücre döngüsünde etki ettiği miRNA ve hedef molekülleri	46
<b>Şekil 18.</b> p53'ün hücre canlılığının düzenlenmesine dair etki ettiği miRNA ve hedef molekülleri	46
<b>Şekil 19.</b> Toplam polifenol içerik tayini için kullanılan gallik asit standart grafiği	56
<b>Şekil 20.</b> Toplam flavonoid içerik tayini için kuersetin standart grafiği	58
<b>Şekil 21.</b> Etanollü propolis ekstratının MCF-7 ve Fibroblast hücre serilerindeki sitotoksik etkisi yüzde canlılık grafiği	77
<b>Şekil 22.</b> Paklitakselin MCF-7 ve Fibroblast hücre serilerindeki sitotoksik etkisi yüzde canlılık grafiği	78
<b>Şekil 23.</b> Kuersetinin MCF-7 ve Fibroblast hücre serilerindeki sitotoksik	

	etkisi yüzde canlılık grafiği	79
<b>Şekil 24.</b>	Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde p53 protein ekspresyonu üzerine etkisi	85
<b>Şekil 25.</b>	Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde p21 protein ekspresyonu üzerine etkisi	85
<b>Şekil 26.</b>	Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde Bax protein ekspresyonu üzerine etkisi	86
<b>Şekil 27.</b>	Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde miR-34 ekspresyon üzerine etkisi	87
<b>Şekil 28.</b>	Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde miR-15a ekspresyon üzerine etkisi	88
<b>Şekil 29.</b>	Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde miR-16-5p ekspresyon üzerine etkisi	89
<b>Şekil 30.</b>	Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde miR-21 ekspresyon üzerine etkisi	90

**RESİMLER DİZİNİ**

<b>Resim</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Resim 1.</b>	Annexin V analizinde hücrelerin yaptığı floresans ışımalar sonucu elde edilen bölgeler	80
<b>Resim 2.</b>	MCF-7 hücre serisinde Anneksin V analizi sonucu elde edilen grafikler	81
<b>Resim 3.</b>	Negatif kontrol grubunu oluşturan hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu	82
<b>Resim 4.</b>	Etanollü propolis ekstratının 25 µg/mL konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu	83
<b>Resim 5.</b>	Etanollü propolis ekstratının 50 µg/mL konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu	83
<b>Resim 6.</b>	Etanollü propolis ekstratının 75 µg/mL konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu	84
<b>Resim 7.</b>	Etanollü propolis ekstratının 100 µg/mL konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu	84
<b>Resim 8.</b>	miRNA ekspresyon analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri	87



## SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>Ago2</b>	Argonat 2 protein
<b>Bak</b>	Bcl-2 homologous antagonist killer protein
<b>Bax</b>	Bcl-2-ilişkili X protein
<b>Bcl-xL</b>	B-cell lymphoma-extra large protein
<b>Bcl-2</b>	B-cell lenfoma 2 protein
<b>CAPE</b>	Kafeik asit fenetil esteri
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>Cdc 25</b>	Cell division cycle 25 protein
<b>CDK</b>	Siklin bağımlı kinaz
<b>CDI</b>	Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
<b>CHOP</b>	C/EBP homolog protein
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's medium
<b>EDTA</b>	Etilen diamin tetraasetik asit
<b>EGCG</b>	Epikateşin galat
<b>EGFR</b>	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
<b>EMEM</b>	Eagle's minimal essential medium
<b>ER</b>	Endoplazmik retikulum
<b>FADD</b>	Fas-associated protein with death domain
<b>MCF-7</b>	İnsan meme adenokarsinomik hücre serisi
<b>Mdm2</b>	Murin double minute 2 protein
<b>miRNA</b>	MikroRNA
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil hidrazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
<b>Myc</b>	Myelocytomatosis onkogen
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponu
<b>PDCD4</b>	Programlanmış hücre ölümü 4 protein
<b>PI3K/Akt</b>	Fosfoinositid 3-kinaz/ Protein kinaz B
<b>pRb</b>	Retinoblastoma protein
<b>PUMA</b>	p53 upregulated modulator of apoptosis

<b>p53</b>	Tumor protein 53
<b>Ras</b>	Rat sarkoma
<b>RISC</b>	RNA-susturucu kompleks
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>RT-PCR</b>	Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PTEN</b>	Fosfataz ve tensin homolog geni
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor nekroz faktör alfa
<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis inducing ligand
<b>VEGF</b>	Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\mu$	Mikro

### Formüller

<b>Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O</b>	Alüminyum nitrat nonahidrat
<b>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH</b>	Etanol
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>KCH<sub>3</sub>COO</b>	Potasyum asetat
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Sodyum karbonat
<b>OH<math>\cdot</math></b>	Hidroksil radikali
<b>O<sub>2</sub><math>\cdot^-</math></b>	Süperoksit

## 1. ÖZET

### **Türk Propolisinin Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Serisi Üzerinde MikroRNA Ekspresyonu ve Apoptoza Etkilerinin İncelenmesi**

Kanser genetik ve gelişimsel bir süreçle ortaya çıkan, hücrelerin aşırı proliferasyonu ve apoptoz fonksiyonlarını kaybederek oluşan patolojik bir durumdur. İlaçların yan etkilerinin ortaya çıkması, insanları ilaç olarak bilinen doğal ürünlerin tüketilmesine yöneltmiştir. En çok kullanılan ürünlerden biri de arı ürünü olan propolis'tir. Literatürde propolisin antikanser ve antiproliferatif etkilerine yoğunlaşan çok sayıda çalışmanın mevcut olduğu görülmektedir. Ancak Türk propolisinin kanser hücre serilerindeki sitotoksik etkinliğini konu alan çalışmaların sınırlı olduğu ve miRNA seviyelerindeki değişimlerine ait meme kanseri hücre serilerinde herhangi bir *in vitro* çalışma yapılmadığı görülmektedir. Bu çalışmada; Türk propolisinin meme kanseri hücre serilerindeki miRNA seviyeleri üzerine etkisi, hücre proliferasyonu ve apoptoz ile ilişkisinin incelenmesi amaçlandı.

Etanollü propolis ekstraktının antioksidan kapasitesi toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik analizleriyle, sitotoksik etkinliği ise MTT metoduyla belirlendi. Propolis ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etki mekanizması; apoptoz, hücre döngüsü yönünden flow sitometrik ve western blot yöntemleri ile incelendi. miRNA seviyeleri ise RT-qPCR yöntemiyle belirlendi.

Çalışmamızda propolis ekstraktının toplam polifenolik ve flavonoid içerikleri gram propolis başına sırasıyla; 122.5 mg gallik asit, 50.9 mg kuersetin eşdeğeri olarak bulundu. Ekstraktın MCF-7 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisinin normal fibroblast hücrelerine göre seçici olduğu saptandı. Ekstraktın MCF-7 hücrelerini hücre döngüsünün G1 evresinde durdurduğu; p53 protein seviyesinin artmasına bağlı olarak p21 ve Bax protein düzeylerini, apoptozu ve supresör miRNA'ların seviyelerini arttırarak sitotoksik özellik gösterdiği belirlendi.

**Anahtar Sözcükler:** Apoptoz, Meme Kanseri, miRNA, Propolis

## 2. SUMMARY

### **Investigation of Turkish Propolis Effects microRNA Expression and Apoptosis on Breast Cancer Cells Line (MCF-7)**

Cancer is a pathological state that is an occurring with genetic and developmental process due to the excessive proliferation of the cells and loss of their apoptosis functions. The emergence of the side effects of the drugs has led people to the consumption of natural products known as medicine. One of the most widely used products is propolis, which is a bee product.

There have been many studies about anticancer and antiproliferative effects of propolis in the literature. Even now, there are limited studies about cytotoxic effects of Turkish propolis on cancer cell lines and no in vitro studies are performed on the breast cancer cell lines related to changes of miRNA levels. Present study it has been aimed to examination of the effects Turkish propolis on miRNA levels of breast cancer cells line, and its relationship with cell proliferation and apoptosis.

Antioxidant capacity of ethanolic propolis extract was determined by total phenolic and flavonoid contents analysis and cytotoxic activity of ethanolic propolis extract was evaluated using MTT assay. Mechanisms involved in the cytotoxic action of Turkish propolis on MCF-7 cells were investigated with regard to apoptosis and cell cycle using flow cytometry and western blot. miRNA levels were detected by RT-qPCR method.

In our study the values of total polyphenolic and total flavonoid contents were found 122.2 mg gallic acid and 50 mg quercetin equivalents per gram propolis, respectively. Propolis extract exhibited selective toxicity against MCF-7 cells compared to normal fibroblast cells. We determined that ethanolic extract of propolis demonstrated cytotoxic activity by inducing G1 cell cycle arrest of MCF-7 cells, increasing p21 and Bax protein levels, apoptosis and tumor suppressor miRNA levels by increasing the levels of p53 proteins.

**Keywords:** Apoptosis, Breast Cancer, miRNA, Propolis

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser normal büyüme ve farklılaşmayı sağlayan mekanizmalar üzerindeki kontrolün kaybolması nedeniyle değişime uğramış hücrenin sınırsız çoğalması sonucu gelişen bir hastalıktır (1, 2). Meme kanseri tüm dünyada akciğer kanserinden sonra, kansere bağlı ölümlerin en sık ikinci nedenidir (3). Kanser araştırmalarına her yıl milyarlarca dolar harcanmasına rağmen kanserin hala tam olarak nasıl geliştiği anlaşılamamıştır. Günümüzde kanser tedavisi için kullanılan yöntemlerdeki gelişmelere rağmen ileri evre hastalıkta beklenen iyileşme arzu edilen düzeyde değildir. Kullanılan ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması insanları yeniden doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Bu bağlamda yeni ilaç keşifleri için doğal ürünlere potansiyel hammadde gözüyle bakılmaktadır (4).

Propolis, polifenolik ve flavonoid bileşikler açısından zengin, toplandığı bölgenin coğrafyasına ve iklimine göre içeriği değişebilen, antitümoral, antioksidatif, antimutajenik, antibakteriyal, anti kanser ve pek çok aktivitesi olan önemli bir arı ürünüdür (5). Polifenollerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra; çeşitli sinyal yollarını etkilediği, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve hücreler arası sinyal mekanizmasını inhibe, DNA tamir enzimlerini ise aktive edebildikleri ortaya konulmuştur (6, 7). Son yıllarda yapılan çalışmalarla polifenol içeren ürünlerin çeşitli onkogenik veya tümör supresör miRNA'ları hedefleyerek gen ifadelerini düzenledikleri ortaya konulmuştur (8).

Küçük RNA sınıfında yer alan miRNA'lar protein kodlamayan (non-coding) RNA molekülleridir. miRNA'lar hücre proliferasyonu, apoptoz, gelişim ve metabolizma gibi farklı biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (9, 10). miRNA'ların kanser ve çeşitli hastalıklardaki rolü ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve moleküler patolojisinin aydınlatılmasında önemli ipuçları elde edilmiştir (11-13).

Polifenollerin hücresel sinyal yollarındaki transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini düzenleyerek gen ekspresyonunu düzenleyebileceği öne sürülmektedir. Bu düzenleyici yol ile polifenollerin miRNA ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir (14, 15).

Bu tez çalışmasında; Türk propolisinin meme kanseri hücre serilerindeki sitotoksik etkisinin incelenip, hücre proliferasyonu, apoptoz ve ilk kez Türk propolisinin miRNA ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Propolis

Yıllar boyunca, ilaçların keşfi için doğal ürünler umut vadeden kaynaklar olmuşlardır (16). Özellikle son yıllarda sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir. Bu doğal ürünler arasında en yaygın olarak kullanılanlardan biri de bir arı ürünü olan propolistir (5, 16). Arı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılmasına "Apiterapi" denilmektedir. Apiterapi, arıcılık kadar eskidir (17) ve birçok ülkede yüzyıllardır alternatif tıp olarak kabul edilmiştir (18). Antik çağlardan (M.Ö. 300) bu yana, insanoğlu propolisi sağlık, gıda, koruma ihtiyaçlarını karşılamak için farklı amaçlar için kullanmıştır. Mısırlılar ölümlerini mumyalamak için propolisin çürümeyi engelleyici özelliğinden yararlanırlarken, Yunan ve Roma hekimleri propolisin antiseptik, sikatrize edici ajan ve diş sağlığı için kullanımından bahsetmektedir. Propolis, 17. yy. ve sonrasında Avrupa'da çok popüler olmuş (5, 16) ve 17. yüzyıl İngiltere farmakopelerine yara iyileştirici özelliği ile girmiştir (19). Propolisin kimyasal bileşimi ile ilgili ilk çalışmalar 20. yüzyılda başlamış, bilim insanları bir yandan propolisin içeriğindeki maddeleri belirlerken bir yandan da biyolojik aktivitelerini ortaya koymaya başlamışlardır (20). Bir arı ürünü olan propolis; bal arıları tarafından ağaçların kabuk, bitkilerin filiz ve tomurcuklarından toplanan çeşitli polenler, balmumu ve özel reçine maddelerin tükürük enzimleri ile sindirilmesi sonucu oluşur (5, 18). Arılar propolisi; kovanın içindeki delikleri, çatlakları kapatmada, soğuğa, dışarıdan gelen istilacılara karşı kovanın korunmasında ve leşlerini mumyalamada kullanır. Ayrıca kovanda oluşabilecek çeşitli enfeksiyonlara karşı bakteri, mantar ve virüslerle mücadelede koruyucu olarak görev yapmaktadır (21).

Propolisin kaynağı; kavak (*Populus spp.*), kayın (*Fagus sylvatica*), huş (*Betula alba*), kestane (*Castanea sativa*), at kestanesi (*Alnus glutinosa*) gibi bitkiler olabilmektedir (5).

Son 50 yılda propolisin; antibakteriyel, antifungal, antiviral, sitotoksik, antikaryojenik, antiinflamatuvar, antioksidan, tümörisidal ve antimitojenik özellikleri çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (16, 17, 22-24). Propolis, tüm dünyada yürütülen birçok çalışmanın konusu haline gelmiş, ayrıca ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde de kullanılmaktadır (5, 18). Propolisin kimyasal ve biyolojik özelliklerine dair pek çok

önemli veri bulunmasına rağmen ilaç endüstrisindeki kullanımları ve tedavi edici uygulamaları sınırlıdır (5, 25).



Şekil 1. Çalışma için kullanılan propolis örnekleri (Mısır'dan, 5)

#### 4.1.1. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis soğukta katı ve kırılgan, sıcakta ise yumuşak, 25-45 °C arasında ise oldukça esnek yapıdadır. Genel olarak 60-70 °C arasında bir erime noktasına sahip olmasına rağmen bazı örneklerde bu 100 °C'dir. Propolis sarı-yeşil, kırmızı ve koyu kahverenginde olabilmektedir. Propolis karakteristik aromatik kokuya sahiptir. Propolisin rengi, kokusu, kimyasal kompozisyonu toplandığı bölgenin bitki örtüsüne ve mevsime göre değişebilmektedir (19, 26). Propolisin reçinemi yapısı göz önüne alındığında, nadiren ham haliyle kullanılabilir. Propolis çeşitli çözücüler kullanılarak ekstrakt haline getirilmektedir. En yaygın olarak kullanılan çözücüler arasında su, metanol, etanol, kloroform, diklorometan, eter ve aseton yer almaktadır (26). Propolis örnekleri Şekil 1' de gösterilmiştir (5).

#### 4.1.2. Propolisin Kimyasal Özellikleri ve İçeriği

Yapılan çalışmalarda propolisin kimyasal bileşiminin sabit olmadığı, toplandığı bölgenin bitki örtüsüne, iklimine ve toplayan arı ırkına göre farklılıklar gösterebildiği belirlenmiştir (19, 21). Propolis kimyasal bileşimi açısından genel olarak %50 reçine, %30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 diğer organik maddelerden oluşmaktadır (16, 24). Propolisteki temel kimyasal sınıflar; fenolik, flavonoid ve çeşitli aromatik bileşiklerdir. Ayrıca birçok B-kompleks vitamini, aminoasit, önemli mineraller ve eser elementleri de içermektedir (5, 24). Flavonoidler bitkilerde glikozitleri şeklinde bulunurlarken, propolis içeriğindeki flavonoidler ise



aglikonları şeklinde bulunmaktadır. Bu durumun arıların propolis toplarlarken salgıladıkları  $\beta$ -glikozidazların bitkisel flavonoidlerdeki şeker birimlerini kesmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (27). 2012 yılına kadar pek çok ülkeye ait propolis örneğinde flavonoid, terpen ve fenolik bileşenlerine ait 500'den fazla bileşik tespit edilmiştir (24).

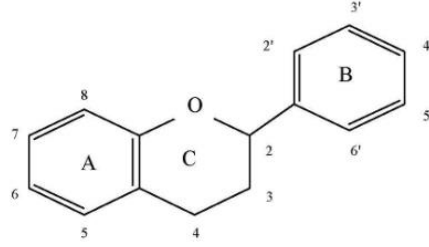
Avrupa, Asya, Kuzey ve Güney Amerika ile Afrika'dan toplanan propolis örneklerinin kimyasal içeriklerinin birbirinden farklı olduğu bildirilmektedir. Avrupa ve Çin propolis örneklerinin çoğunlukla flavonoid ve fenolik asit türevlerini içerdikleri, tropikal bölge propolis örneklerinin ise genellikle flavonoid bakımından fakir olduğu bilinmektedir (19). Ilıman kuşak ülkelerinden elde edilen propolis örneklerinden bugüne kadar fenolik asitler, fenolik asit esterleri ve flavonoidler gibi ana sınıflara dahil 300 kadar bileşik belirlenmiştir. Tablo 1'de propoliste bulunan başlıca bileşenler, bulunma oranlarıyla birlikte verilmiştir (5). Gözlenen kimyasal farklılıkların farklı biyolojik aktivitelere sebep olabileceği belirtilmektedir (21).

**Tablo 1.** Propoliste bulunan başlıca bileşenler (Demir'den, 19)

Bileşenler	Ana Maddeler	Miktar(%)
<b>Reçine</b>	Flavonoidler	
	Terpenler	
	Kumarinler	45-55
	Fenolik asitler ve esterleri	
<b>Mum ve yağ asitleri</b>	Arılardan veya bitkilerden çoklu doymamış yağ asitleri	25-30
<b>Esansiyel yağlar</b>	Uçucu bileşenler	10
<b>Polen</b>	Proteinler	
	Serbest aminoasitler	5
	Vitaminler (A,B,C,E vs)	
	Eser elementler(Cu, Mn, Fe vs)	
<b>Diğer maddeler</b>	Ketonlar	
	Laktonlar	5
	Kinonlar	
	Steroidler	

#### 4.1.2.1. Propolisin İçeriğinde Bulunan Flavonoidler

Flavonoidler, polifenollerin alt gurubu olup, benzo- $\gamma$ -piron (kromon) türevleri olarak kabul edilirler. Flavonoidler, güçlü antioksidan özellikleriyle karakterize edilir (27) ve propolisin farmakolojik aktiviteleri büyük ölçüde flavonoidlerin varlığına atfedilmektedir (24). Flavonoidlerin genel yapısı Şekil 2’de gösterilmiştir (27).



Şekil 2. Flavonoidlerin genel yapısı (27)

Flavonoidler kimyasal yapılarına göre; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar, kateşinler, kalkonlar gibi alt sınıflara ayrılmaktadırlar (27, 28). Tablo 2’ de propolisin içeriğinde bulunan flavonoid türleri verilmiştir (29).

**Tablo 2.** Propolisin içeriğinde bulunan flavonoid türleri (29)

Flavonoid çeşidi	Bileşik
Flavonoller	Kuersetin, Kaempferol, Galangin
Flavononlar	Naringin, Pinosembrin, Hesperedin
Flavonlar	Apigenin, Luteolin

Flavonoidler; meyvelerde, sebzelerde doğal olarak bulunan polifenolik bileşik grubunda yer alıp, sekonder bitki metabolitleridir. Bu bileşikler, insanlar tarafından sentezlenemezler ancak insan diyetinin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Propolis içeriğindeki en büyük bileşen sınıfını flavonoid pigmentleri oluşturmaktadır (30).

Bugüne kadar propolisten 38’den fazla flavonoid izole edilmiştir (27). Bunlara galangin, kaempferol, kuersetin, pinosembrin, pinostrobin ve pinobanksin örnek olarak verilebilir (31). Flavonoidlerin serbest radikal toplama kapasitelerinden dolayı gösterdikleri antioksidan özelliklerinin yanı sıra, hücre proliferasyonu üzerine etkili oldukları, angiogenezi ve hücreler arası sinyal mekanizmasını inhibe ettikleri ve DNA tamir enzimlerini stimüle ettikleri ortaya konulmuştur (32). İnflamasyon, hipertansiyon,

mutasyonlara ve karsinojenlere, kanser ve AIDS' e karşıda etkili oldukları belirtilmiştir (5).

#### **4.1.2.2. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)**

Fenolik bileşikler; sahip oldukları aromatik halkalarının sayısına ve çeşitli fonksiyonel gruplarına (esterler, metil esterler, glikozitler vb.) bağlı olarak farklı şekilde sınıflandırmak mümkündür (33). En önemli fenolik bileşikler arasında; sinnamik asit, vanilin, benzil alkol, benzoik asit, kafeik asit ve ferulik asit yer almaktadır (6, 31). Fenolik bileşiklerin, bitkilerdeki fizyolojik rollerinin yanı sıra, oksidatif stres ile ilişkilendirilmiş, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı koruyucu olabileceği ortaya konulmuştur (5, 32). Bu bileşenlerin antioksidan özellikleri; serbest radikalleri (süperoksit anyonu, hidroksil iyonu gibi) yakalayabilme, ağır metal (demir, bakır gibi) iyonlarını şelatlayabilme ve oksidazları inhibe ederek enzim aktivitelerini değiştirebilme şeklinde ifade edilmektedir (27).

#### **4.1.2.3. Arı Mumu, Yağ Asitleri ve Esansiyel Yağlar**

Propolisin içeriğinde yer alan arı mumu ve yağ asitleri propolisin yaklaşık %30' unu oluştururken, uçucu bileşenler ise propolisin yaklaşık %10' unu oluşturmaktadır (26). Arı mumu başlıca mono esterler, diesterler, uzun zincirli hidrokarbonlar, hidroksiesterler, poliesterler, uzun zincirli yağ asitleri, triesterler ve asit esterlerinden oluşur (32).

#### **4.1.2.4. Mineral Elementler**

Propolis içeriğinde bulunan mineral elementler arasında Ca, Mg, K, Na, Fe, Zn, Al ve Si büyük miktarlarda mevcuttur. Ayrıca propolis içeriğinde A, B, C ve E vitaminlerinin yanı sıra az miktarda arıların tükürük salgılarından kaynaklanan  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz,  $\alpha$ -laktamaz,  $\beta$ -laktamaz, maltaz, esteraz gibi enzimlerin bulunabildiği de belirtilmiştir (27, 34).

#### **4.1.3. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri**

Günümüzde kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi birçok hastalığın altında yatan oksidatif stres etkilerini ortadan kaldırmak için doğal ürünlerle ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Eski çağlardan beri propolisin biyolojik özellikleri bilinmekte (27) ve insanlar tarafından farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (5). Son yıllarda

propolis, tüm dünyada yürütülen birçok çalışmanın konusu haline gelmiş (16, 17, 22-24) ve araştırmacılar propolisin farmakolojik aktiviteleri ve bu etkinliklerden sorumlu etki mekanizmalarına odaklanmışlardır (18).

Propolisin antibakteriyel, antiviral, antifungal, antikaryojenik, antiülser, immünomodülatör, antiinflammatuar, antioksidan, anestetik, antitümöral, antikanser, radyoprotektif, nöroprotektif, antiproliferatif ve tümör indüklü anjiogeneze karşı koruyucu gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (6, 27, 35-40). Propolisin antioksidan mekanizması, serbest radikallerin oluşturduğu DNA hasarlarını tamir edici özellikte olmasından ve lipid peroksidasyonuna neden olan polimer zincir reaksiyonlarını kırıncı özelliği ile ROS' ları dokulardan uzaklaştırıcı etki göstermesinden kaynaklanmaktadır (5).

Propolisin antibakteriyel etkisi RNA polimeraz inhibisyonuna bağlanmaktadır. Galangin, kafeik asit, pinocembrin gibi bileşenler antibakteriyel etki gösterir. Antiviral etki gösteren bileşenler ise kafeik asit, luteolin ve kuersetindir. Propolisin yanıklar, yara iyileşmesi, cilt inflamasyonları ve diğer deri hastalıklarında tedavi edici etkisinin olduğu belirtilmiştir. Bunlarla birlikte tüm flavonoidlerin tamamen sağlıklı olduğunu düşünmek yanlış olur. Bazı polifenol türlerinin konsantrasyona bağlı olarak mutajenik ve prooksidan özellik gösterebileceği, dolayısıyla topoizomeraz enzim aktiviteleri, prostanoit biyosentezi ve sinyal transdüksiyonu gibi esansiyel biyokimyasal yolları olumsuz etkileyebileceği de ileri sürülmektedir (5, 19).

#### **4.1.4. Propolisin Antikanser Özellikleri**

Kanserle mücadelede sıklıkla başvurulan metotlardaki etkisizlik, ciddi toksisite ve çoklu ilaç direnci gibi dezavantajlar kanser tedavisindeki başarı yüzdesini düşürmektedir (19). Antikanser ilaçlara karşı olan direnci yenebilmek için yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır (4). Bu nedenle doğal ürünlere yeni ilaç keşifleri için potansiyel hammadde gözüyle bakılmakta ve doğal ürünlerde bulunan polifenoller bu anlamda yapıları ve aktiviteleri ile ön plana çıkmaktadır (41, 42). Özellikle doğal arı ürünlerinin içerdikleri polifenoller üzerinden gerek *in vivo* ve gerekse *in vitro* antikanser etkinliklerinin ortaya konması, bu özelliğin de tümör hücre büyümesini ve metastazı engelleyerek ya da apoptozu arttırarak ortaya çıktığının belirlenmesi arı ürünlerine olan ilgiyi arttırmıştır (43).

Propolisin; *in vitro* koşullarda kanserli hücrelerin çoğalmasını durdurabilen ve/veya bu hücrelerde apoptozu arttırabilen kafeik asit, kafeik asit fenetil esteri (CAPE), artepilin C, kuersetin, naringenin, galangin, kaemferol ve genistein gibi bileşikleri ihtiva ettiği bildirilmektedir (18, 19, 27). Propolisin deneysel modellerde; akciğer, ağız, deri, özofagus, mide, kolon, prostat ve meme kanserlerinin gelişimini inhibe edebildiği de ortaya konulmuştur (27). Propolisden literatürde sıklıkla tümör karşıtı ve bağışıklık düzenleyici madde olarak bahsedilmektedir. Propolisin *in vivo* antitümöral etkisi immünomodölatör etkinliğine dayandırılmaktadır. Bu da makrofaj aktivasyonu aracılığı ile makrofajlardan salınan faktörlerin üretimini arttığı, bu faktörlerin de doğrudan kanser hücrelerine etki ederek veya diğer immün hücrelerini aktive ederek spesifik olmayan tümör cevabının oluştuğu şeklinde açıklanmaktadır (35).

## **4.2. Radikal Kavramı ve Oksidatif Stres**

### **4.2.1. Serbest Radikaller**

Atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunma eğilimindedirler. Serbest radikaller, bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve genellikle reaktif olan kimyasal maddelerdir. Bu moleküller, molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle (R, R<sup>•</sup>) gösterilirler (5).

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu, normal metabolik olayların seyri sırasında meydana gelebildiği gibi (44), bazı dış etkenlere maruz bırakılmayla da meydana gelebilir. Serbest radikal oluşum nedenleri:

1. Aktive olmuş fagositler (respiratory burst),
2. Ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz tarafından,
3. Adrenalin, dopamin ve kinonlar,
4. Mitokondriyal elektron (e<sup>-</sup>) transportu: Hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağıdır.
5. Araşidonik asit metabolizmasında yer alan lipooksigenaz ve siklooksigenaz tarafından reaktif oksijen türlerini (ROS) oluştururlar.
6. Radyasyon,
7. Çevresel faktörler (sigara dumanı, aromatik hidrokarbonlar),

8. Alkol sayılabilmektedir (45-47). Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri Tablo 3’de gösterilmektedir (19).

**Tablo 3.** Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (Demir’den, 19)

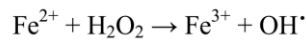
<b>Radikaller</b>	<b>Non-radikaller</b>
Süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ )	Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )
Hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ )	Hipokloröz asidi ( $HOCl$ )
Peroksil ( $RO_2^{\cdot}$ )	Ozon ( $O_3$ )
Alkoksil ( $RO^{\cdot}$ )	Singlet oksijen ( $O^{\cdot}$ )
Hidroperoksil ( $HO_2^{\cdot}$ )	Peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ )
Nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ )	Hidroperoksit ( $L(R)OOH$ )

#### 4.2.2. Serbest Radikal Türleri

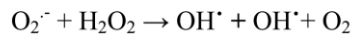
Süperoksit radikali, hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. Uzun bir yarılanma ömrüne sahip olup, lipofilik özellik gösterir ve oluştuğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir (5, 19).

Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikal olarak kabul edilmektedir. Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten ve suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşmaktadır (5).

$H_2O_2$ , süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen dismutasyon reaksiyonu sonucu ortaya çıkar (46).  $H_2O_2$  bir serbest radikal değildir, ancak ROS üretimini sağladığı için reaktif oksijen bileşikleri kapsamına girmektedir (48). Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu oldukça reaktif olan serbest oksijen radikali  $OH^{\cdot}$  radikalini oluşturmaktadır (46).



#### **Fenton Reaksiyonu**



#### **Haber – Weiss Reaksiyonu**

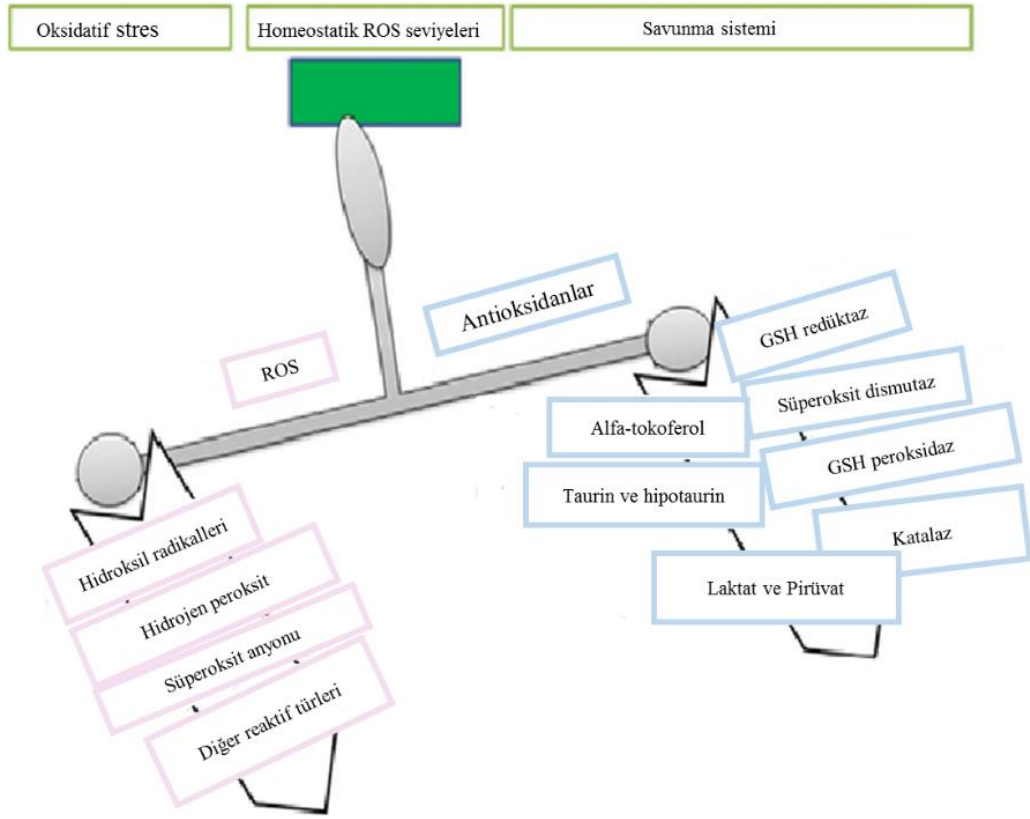
Hücre içi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynakları; peroksizomlar da yer alan D-aminoasid oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit üretmeden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimine sebep olurlar (5, 41).

#### 4.2.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Endojen ve ekzojen olmak üzere üretilen reaktif oksijen türlerinin oluşumu; inflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO<sub>2</sub>), ozon (O<sub>3</sub>), azot dioksit (NO<sub>2</sub>'), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikaller hücre ve dokularda pek çok zarara yol açmaktadır. Hücre ve dokularda ROS;

1. DNA'nın tahrip olmasına,
2. Proteinlerdeki tiyol grupları ve diğer aminoasit kalıntıları oksidasyonuna, proteinlerin fragmentasyonu, agregasyonu veya çapraz bağlanmalar meydana gelmekte bu durum protein-protein etkileşimlerini veya enzim aktivitelerini değiştirmesine,
3. Lipid peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesine ve polisakkaritlerin oksidatif yıkımı sonucu fonksiyon değişikliğine sebep olabilmektedir (5, 41).

Organizmada serbest radikallerin oluşum ve ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde. Bu durum oksidatif denge olarak tanımlanır. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açan prooksidan/antioksidan homeostazındaki bir dengesizliğin oksidanlar lehine bozulmasıyla hasarlara yol açarak insanda pek çok hastalığın oluşmasını sağlayan durum olarak tanımlanır. Oksidan ve antioksidan arasındaki homeostatik denge Şekil 3'de gösterilmektedir (47).



Şekil 3. Oksidan ve antioksidan denge (Rahman'dan, 47)

#### 4.2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta "antioksidan savunma sistemi" adı verilen savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Canlı hücrelerde reaktif oksijen ürünlerini inaktive eden ve bu nedenle oksidatif hasarı önleyen ya da geciktiren bileşikler antioksidanlar olarak bilinirler (49). Antioksidanlar etki mekanizmalarını; serbest oksijen radikallerini tutarak veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, aktivitelerini azaltarak, reaksiyon zincirini kırarak ya da onarım yaparak gösterirler. Enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistemde görevli moleküller Tablo 4'de verilmiştir (5).



**Tablo 4.** Antioksidan savunma sistemi elemanları (Mısır'dan, 5)

<b>Enzimatik</b>	<b>Enzimatik Olmayan</b>	
Süperoksit dismutaz (SOD)	Askorbik asit (Vit C)	$\alpha$ -Tokoferol (Vit E)
Katalaz (CAT)	Glutasyon (GSH)	Seruplazmin
Glutasyon Peroksidaz (GPx)	Transferrin	Polifenoller
Glutasyon Redüktaz (GR)	Laktoferrin	Melatonin
Glutasyon S-transferaz (GST)	Bilirubin	Albümin
Tiyoredoksin Redüktaz (TR)	$\beta$ -karoten	Ürik asit

İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar SOD, CAT ve GPx enzimleridir (17). Hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır. Bu sebeple hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan esas olarak E ve C vitamini, transferrin, haptogloblin, seruloplazmin, albumin, bilirubin,  $\beta$ -karoten, ürik asit, glukoz, sistein gibi moleküller sorumludur. Gıdalar ile alınan antioksidanların başında E vitamini, C vitamini, fenolik bileşikler ve karotenoidler gelmektedir (32, 50).

Antioksidanların oksidatif strese karşı koruyuculukları, reaktif oksijen bileşiklerine karşı olan reaktivitelerine bağlıdır. *In vitro* çalışmalarda flavonoidler, basit fenolik asitler ve karotenoidler gibi doğal bileşiklerin çok etkili serbest reaktif oksijen süpürücüleri olduğu ancak bunların kendilerinin de reaktif sekonder radikaller olabileceğine ilişkin bulgular elde edilmiştir. Bu sekonder radikaller hücre içine ulaşır burada lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik hedeflerde sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açabilecek değişiklikler yapabilirler.

Gıdalarda bulunan antikarsinojen özellikteki bileşiklerin antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir. Birçok rahatsızlığa karşı koruyucu olduğu varsayılan antioksidanlarla ilgili çalışmalar *in vitro* koşullarda yapılmış olup, *in vivo* çalışmalardan elde edilen bilgiler ise sınırlıdır. Antioksidan etkinin kansere karşı koruyucu rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (51).

#### **4.3. Kanser**

Kanser, genetik ve gelişimsel bir süreçle ortaya çıkan, hücrelerin aşırı proliferasyonu ve apoptoz fonksiyonlarını kaybederek oluşan patolojik bir durumdur. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre bulaşıcı olmayan hastalık kaynaklı ölümlerinin

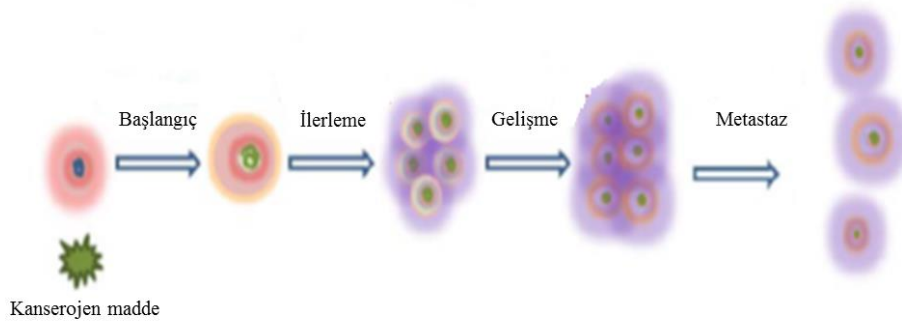
%63'ü kanser ile ilişkilidir. Ölüme en çok sebebiyet veren kanser türlerinin akciğer, mide, kolon, karaciğer ve meme kanserleri olduğu bildirilmektedir (1, 2, 52). Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın verilerine göre; 2008 yılında dünya genelinde 12 milyon olan kanser vaka sayısının 2030 yılında 26 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir (54).

Kanser sıklığının bu kadar yüksek olması; popülasyonun yaş ortalaması, beslenme alışkanlığı, çevresel karsinojenlere maruz kalma süresi gibi demografik durumlardan kaynaklanabilmektedir (2). Genetik ve epigenetik değişimlerin yanı sıra (54) sigara, virüsler, kimyasal ve çevresel karsinojenlere maruziyet, radyasyon gibi etmenler başlıca kanser oluşturma sebepleri arasında sayılmaktadır (19). Kanser in ortaya çıkışında moleküler anlamda iki temel mekanizmanın olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar;

1. Onkogenlerin aktivasyonu,
2. Tümör supresör gen inaktivasyonudur (55).

Hücre büyümesi, farklılaşmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör supresör genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre döngüsünün inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur (56).

Kanser oluşum süreci başlangıç, gelişme ve ilerleme olmak üzere 3 aşamadan oluşur. Başlangıç aşamasında DNA mutasyonlarının olduğu ileri sürülmektedir. Gelişme aşaması; hücrenin çoğalma avantajına sahip olmaya başladığı bir dönem olarak tarif edilirken, ilerleme aşamasında ise hücre sahip olduğu kontrolsüz bölünebilme karakteri sayesinde malign karakterdeki hücre sayısını arttırıp tümör oluşumuna neden olabilmektedir (19). Tümör oluşum evreleri Şekil 4'te gösterilmektedir (57).



**Şekil 4.** Tümör oluşum evreleri (Raghu'dan, 57)

Kanserli hücrelerde tanımlanan karakteristik özellikler; apoptotik hücre ölümünden kaçabilmeleri, çoğalma sinyallerine gereksinim duymadan çoğalabilmeleri, damarlanmayı arttırabilmesi (anjiyojenezis), hücrel metabolizmalarını yeniden programlayabilmeleri, immün yanıtta kaçabilmeleri (özellikle T ve B lenfositlerinden, makrofajlardan ve natural killer hücrelerden), doku invazyonu ve metastaz kabiliyetini arttırabilmeleridir (58, 59).

Kanser araştırmalarına her yıl milyarlarca dolar harcanmasına rağmen hala kanserin tam olarak nasıl geliştiği sorusu yanıt bulamamıştır. Günümüzde kanser tedavisi için kullanılan cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormon replasmanı gibi yöntemlerdeki gelişmelere rağmen ileri evre hastalıkta beklenen iyileşme arzu edilen düzeyde değildir. Kemoterapi kanserle mücadelede sıklıkla başvuru olan metot olup, etkisizlik, ciddi toksisite ve çoklu ilaç direnci gibi dezavantajlar başarı yüzdesini düşürmektedir (19). Bundan dolayı anti kanser ilaçlara karşı olan direnci yenebilmek için yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır (4).

#### **4.3.1. Meme Kanseri**

Meme kanseri tüm dünyada akciğer kanserinden sonra, kansere bağlı ölümlerin en sık ikinci nedeni olup, memenin süt kanallarını oluşturan ve lobüllerini örten epitel hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu sonucu oluşur (3, 54). Kadınlarda en sık görülen ve mortalite oranı yüksek olan meme kanserinin, erkeklerde görülme oranı ise tüm vakaların %1'ini oluşturmaktadır (60). Günümüzde kadınlarda görülen kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanseri kaynaklıdır. Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen 10 kanser tipi içerisinde meme kanseri birinci sırada yer almaktadır (61). Bu nedenle diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserinin erken tanısı ile tedavi sonrası yaşam kalitesini koruma ve sürdürme önemli hale gelmiştir.

Meme kanseri heterojen bir hastalık olup nokta mutasyonları, kromozomal amplifikasyonlar, delesyonlar, translokasyonlar ve dublikasyonları da içeren genetik anormalliklerin progresif birikimi sonucu oluşurken (54), klinik, morfolojik ve moleküler açılardan da farklılıklar gösterir (62). Yapılan epidemiyolojik araştırmalarda meme kanserinin oluşumuna yol açan ya da gelişimini hızlandıran genetik, çevresel, hormonal ve fizyolojik faktörler gibi birçok etken ileri sürülmektedir (54, 63).

Meme kanseri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2/neu) de dahil olmak üzere, belirli proteinlerin ekspresyonu için pozitif ya da negatif olarak sınıflandırılır (11, 64). Bu reseptörlerin gen amplifikasyonu ya da azalması önemli ölçüde göğüs kanseri hücrelerinin biyolojik özelliklerini değiştirir ve tedavisinde kullanılacak terapötik maddeleri de değiştirir (11). Meme kanseri diğer sınıflandırması ise Luminal A, Luminal B, ERBB2 (HER2), bazal ve normal benzeri olmak üzere beş alt gruba ayrılmıştır. Bu moleküler alt tipler, normal yetişkin memede luminal epitel ile miyoepitel hücreleri olmak üzere iki temel epitelyum hücre tipi bulunduğu işaret eder (62).

Meme kanserinde hücre döngüsü kontrolü, hücre proliferasyonunu engelleyen ve DNA tamirinde yer alan pek çok tümör baskılayıcı genin [BRCA1, p16 INK4 $\alpha$ , tümör proteini 53 (TP53), fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) genleri] inaktive olduğu belirtilmiştir (13). Ayrıca meme kanserinde Rat sarkoma (RAS), ve B-cell lenfoma 2 protein (Bcl-2) gibi onkogenlerin ekspresyonlarında artış gözlenmektedir (11).

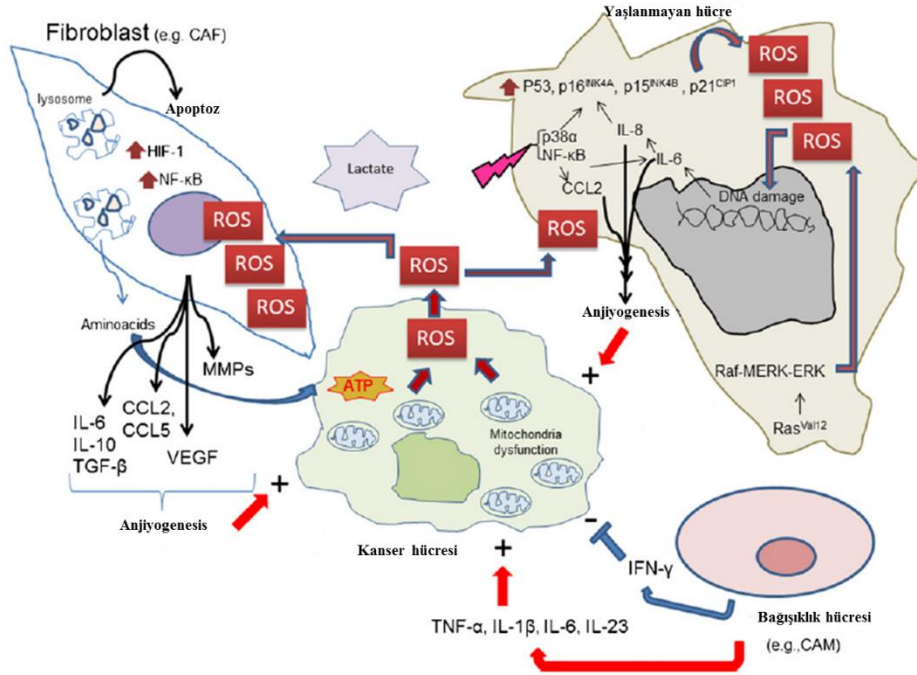
Meme kanseri tedavisinde cerrahi, radyasyon tedavisi, endokrin tedavi ve/veya kemoterapi uygulanmaktadır (65). Doksorubisin (Dok) (66), paklitaksel (Taxol) mikrotübül oluşumunu stabilize eden ve doğrudan hücre bölünmesini inhibe ederek meme kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardır (11). İlerlemiş veya metastatik meme kanseri tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri gelişen ilaç direncidir. Meme kanserine karşı kemoterapötik ilaçların uzun süreli kullanımı nedeniyle ortaya çıkan ilaç direnci ilacı etkisiz hale getirmektedir (67, 68). Meme kanserinde görülen yüksek morbidite ve mortalite nedeniyle, etkin bir tedavi yönteminin geliştirilmesi gerekmektedir (69).

#### **4.3.2. Kanser ve Reaktif Oksijen Türleri**

Reaktif oksijen türleri hücre sinyalizasyonunda ikinci haberci olarak hareket eder ve normal hücrelerde çeşitli biyolojik süreçler için gereklidir. Fizyolojik koşullar altında ROS sürekli olarak üretilir ve redoks homeostazisinin muhafaza edilmesi amacıyla antioksidan sistemler tarafından ortadan kaldırılır. Hücre çoğalması, farklılaşma, bağışıklık stresi ve metabolik uyum gibi hücresel süreçler için redoks dengesinin korunması önemlidir. Redoks dengesinin değişmesi, hücre hasarı veya anormal hücre

sinyalizasyonuna ve hücrel homeostazın bozulmasına neden olur. ROS'un kanser üzerindeki rolünün iki yönlü olduğu belirtilmektedir. Normal hücrelerde görülen ROS, kanserin başlaması, ilerlemesi, yayılması ve anjiyojenezi düzenleyen sinyal yollarını harekete geçirdiği için onkojenik kabul edilir. Bununla birlikte, kanser hücrelerinde görülen aşırı ROS seviyesi, hücre ölüm yollarını, yaşlanmayı ve hücre siklusunun durdurulmasını tetikleyebilmektedir (70).

Karsinogenez sırasında, kanserli hücrelerde ROS seviyesi artar ve antioksidan düzeyleri azalır. Kanser hücrelerinde kanserle ilişkili fibroblastlar (CAM), makrofajlar, hipoksi durumu ve NADPH oksidaz ROS üretiminin artmasına sebep olur. Kanserle ilişkili makrofajlar tarafından ekspresyonu tetiklenen hipoksi indükleyici faktör (HIF-1 $\alpha$ ) ve VEGF anjiyojenez ve tümör ilerlemesine yol açar. Ayrıca, matriks metaloproteinazların salınımı (MMP) ve sitokinler kanser hücrelerinin büyümesini uyaran tümör metastazına ve migrasyonuna yol açarlar. Oksidatif stresin hücre çoğalması ile ilgili birçok sinyal yolağını etkilediği Şekil 5'te gösterilmiştir (50). Protein kinazlar (MAPK), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), fosfolipaz C ve protein kinaz C, oksidatif stres tarafından etkilenir. Ayrıca ROS, apoptozda anahtar rol oynayan p53 tümör supresör geninin ekspresyonunu değiştirir. Böylece gen ekspresyonu, hücre proliferasyonu, apoptoz ve anjiyojenezde değişikliklere neden olan oksidatif stres, tümör başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynar (49, 50).



**Şekil 5.** Kanser hücrelerinde üretilen ROS tümör mikroçevre oluşturmaya, anjiyogenez ise ve tümör progresyonuna etki eder (Sosa'dan, 50).

Hücre içi seviyelerine bağlı olarak ROS; kanser hücrelerinin hayatta kalımına ve ölümüne neden olduğu için "iki ucu keskin kılıç" olarak nitelendirilmektedir. Bu özelliğinden dolayı kanser terapilerinde ROS'a dayalı stratejiler tartışılmaya başlanmıştır (70). ROS arttırıcı ya da antioksidan inhibitörlerin kanser hücrelerini seçici olarak öldürebildiği, tümör oluşumunu ve ilerlemesini baskılayabildiği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (19, 70).

Son yıllarda CAT ve SOD antioksidan enzim inhibitörleri kullanarak kanser hücrelerinin ROS aracılıklı apoptoza sürüklenme stratejisi önem kazanmıştır. Bazı antikanser ilaçların da kanser hücrelerinde ROS miktarını arttırdıkları ortaya konulmuştur (19). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda; 5-fluorourasil, okzaliptatin ilaçlarının kanser hücrelerinde hücre içi ROS miktarını arttırabildikleri ortaya koyulmuştur (19, 50). Paklitaksel; NADPH oksidaz aktivitesini arttırmak suretiyle ROS miktarını da arttırabildiği görülmüş (50) ve benzer özelliklerinden dolayı sisplatin, arsenik trioksit, antrasiklinler ve bleomisin gibi kemoterapötik ajanların hücre içi ROS seviyelerini de arttırdıklarından kemoterapide daha fazla tercih edilmeye başlanmışlardır (71).

#### 4.4. MikroRNA

DNA'nın yapısı Watson ve Crick tarafından keşfedildiğinden bu yana son 50 yılda, moleküler biyoloji alanında hızlı ilerlemeler gerçekleşti. Bu alandaki gelişmelerin anlaşılması klinikte ilerlemenin önünü açtı (72). İnsan genomunun yalnızca çok küçük bir kısmı (yaklaşık %1) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır. Genomun geriye kalan kısmının çok az önem taşıdığı düşünülmeğe, küçük RNA moleküllerinin keşfi ile bu görüş ortadan kalkmıştır. Küçük RNA sınıfında yer alan miRNA'lar protein kodlamayan (non-coding) RNA molekülleridir. miRNA genleri farklı türlerin genomunun yaklaşık %1'ni teşkil eder ve her birinin yüzlerce korunmuş ve/veya korunmamış hedefleri vardır (9, 10). DNA'dan transkripsiyonu yapılan ancak protein kodlamayan genler tarafından kodlanan miRNA'lar genelde 20-22 nükleotid uzunluğundaki küçük RNA molekülleridir. 2014 yılında yayımlanan miRNA veri tabanına (miRBase) göre şu ana kadar insanda 2588 miRNA belirlenmiş olup gün geçtikçe sayıları artmaktadır. miRNA'ların insan genomunun yaklaşık %60'ını düzenlediği tahmin edilmektedir (73). İnsanlarda yüksek oranda korunmuş ve dokular için spesifik olan miRNA'lar önemli proseslerin kontrolü için; apoptoz, proliferasyon, strese yanıt ve farklılaşma gibi kritik süreçlerde önemli rol oynamaktadırlar (73, 74).

1993 yılında Lee ve ark. (75) tarafından Victor Ambros laboratuvarında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans* üzerinde yaptıkları bir genetik çalışma sırasında ilk miRNA bulunmuş ve lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına rağmen 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkripte ettiğini belirtmişlerdir. 2000 yılında Reinhart ve ark. (76) *C. elegans* üzerinde yaptıkları çalışmada canlılığın gelişim sürecinde etkili olan farklı bir mikroRNA keşfetmişler ve bu miRNA'ya let-7 adını vermişlerdir. MikroRNA terimi ise ancak 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (78). Sonraki yıllarda let-4 ve let-7'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü belirlenmiştir (77).

##### 4.3.1. MikroRNA'ların Yapısı ve Oluşumu

MikroRNA'ların oluşum süreci 3 adımda gerçekleşmektedir; İlk adımda nükleus içerisindeki miRNA genlerinden primer miRNA'ların transkripsiyonu ve sap-ilmik yapısında (Şekil 6'da) primer transkript (pri-miRNA) oluşur. İkinci adımda yine nükleus içinde pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülür. Son

olarak sitoplazma içinde olgun miRNA'ların oluşumu gerçekleşir. miRNA'lar, pri-miRNA olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenip, 500-3000 baz, 5' cap ve 3' poli A kuyruklarına sahip sap-ilmik yapılarındadırlar.

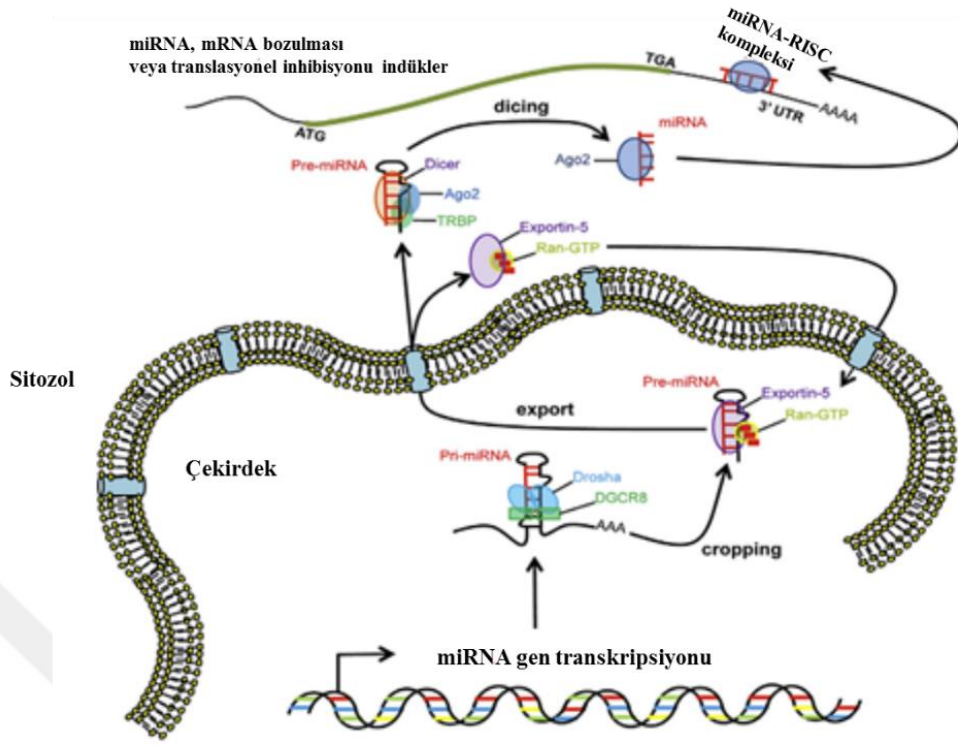


**Şekil 6.** Pre-miRNA sap-ilmik yapısı (Özgün'den, 79)

Saç tokası şeklinde oluşan pri-miRNA nükleusta bulunan RNaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) ile pri-miRNA'yı belirli bölgelerden keserek yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA oluşturulur. Pre-miRNA molekülü nükleer transport reseptörü exportin 5 ve RAN-GTP aracılığıyla nükleustan sitoplazmaya taşınır.

Son adımda olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu; pre-miRNA'lar sitoplazmada bir RNaz III enzimi olan Dicer tarafından kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine çevrilir. Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. miRNA: miRNA dubleksinden sadece biri RISC kompleksine dahil olur. Daha sonra RISC kompleksinde yer alan Argonat 2 (Ago2) proteini, daha kararlı olan ipliği seçerek RISC kompleksine dahil eder (73, 74, 80, 81). miRNA'lar, aktif RISC kompleksine dahil olduktan sonra, ya argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın degradasyonuna ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar. miRNA sentezi ve mRNA ile regülasyonu Şekil 7'de gösterilmiştir (73).





**Şekil 7.** miRNA sentezi ve mRNA ile regülasyonu. Regülasyon miRNA tarafından mRNA degradasyonu veya translasyonun inhibe edilmesi ile gerçekleşir (Acunzo'dan, 73).

#### 4.3.2. MikroRNA'ların Fonksiyonu ve Moleküler Etki Mekanizması

MikroRNA'lar kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. Tek zincirli miRNA'yı içeren aktif haldeki RISC kompleksi baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanarak translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkımına neden olur (52, 77, 82-85). Hedef seçiminde miRNA'nın (5' ucunun 2-8 nükleotidlik bir bölge) çekirdek-seed adı verilen bölgesi mRNA bağlanmayı sağlayan kısımdır. miRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye (untranslated region-UTR) veya hedef mRNA'nın ORF (open reading frame) bölgesine bağlanır. miRNA ile mRNA'nın 3' UTR bölgesi arasında yüksek oranda komplementerlik varsa mRNA yıkımı gerçekleşir. Ancak komplementerlik az ise translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. ORF bölgesi içine bağlanma tam komplementerliği gösterir ve Ago2 tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır. mRNA miktarındaki azalma miRNA aktivitesinin değerlendirilmesi açısından önemlidir. Ayrıca her bir miRNA birden çok mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği gibi her bir mRNA'nında birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (80).

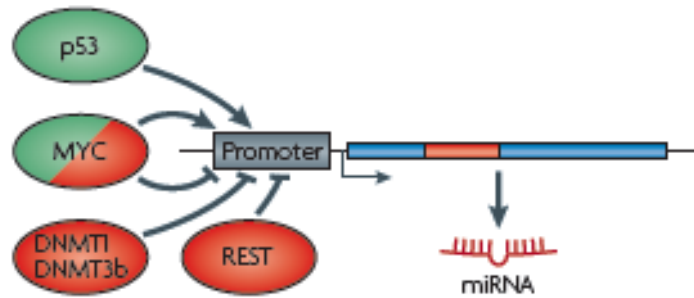
### 4.3.3. MikroRNA ve Kanser

Son yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların kanser de önemli rollere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (81). miRNA genlerinin %50'den fazlasının heterozigozitenin kaybolduğu, kırılğan, amplifikasyonun minimal olduğu kanserle ilişkili gen bölgelerinde olduğu belirtilmiştir. miRNA genleri sıklıkla heterozigozitenin kaybolduğu bölgeler olan kırılğan kısımlarda yer alır. Bu kırılğan kısımlar amplifikasyonun olduğu bölgeler veya genel kromozomal kırılma noktalarıdır. Bu lezyonlar sonucu oluşan hasar spesifik kanserlere yol açabilmektedir (72, 86).

MikroRNA'ların kanser ile ilişkilerinin tespit edilmesi ile kanserin tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Genomda kodlanmayan miRNA'lar kanser başlangıcı, ilerlemesi, invazyonu ve metastazında önemli rol oynamaktadırlar (86, 87). miRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceğinin anlaşılmasından sonra, miRNA'ların farklı kanser türlerindeki ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenmiş normal ve patolojik dokular arasındaki fark kapsamlı bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır. Günümüzdeki güçlü deneysel araçlar-yöntemler, normal ve malign hücrelerdeki kompleks moleküler yapıları anlamayı kolaylaştırmıştır. Anormal (aberrant) miRNA ekspresyonu kanser için ortak bir özelliktir ve spesifik miRNA'ların kanser teşhis ve prognozu için potansiyel biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. miRNA'ların fonksiyon kaybı veya kanser başlangıcı ve ilerlemesine etkisi, bu miRNA'ların ve regüle ettikleri genlerin düzenlenmesi kanser hücrelerinin davranışını değiştirmektedir (88). miRNA ve kanser arasındaki ilişkisi ilk olarak 2002 yılında kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalarda yapılan çalışmayla ortaya koyulmuştur. Hastaların yaklaşık %50'sinde, 13q14 bölgesinin delesyona uğradığı ve bu bölgede sadece miR-15a ve miR-16-1 genlerinin bulunduğu tespit etmişlerdir. 2003 yılında solid tümörlerde ve normal dokularda miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar belirtilmiştir. Benzer şekilde meme kanserinde, Burkitt's lenfomada, malign beyin tümörlerinde, tiroid, akciğer, prostat ve hepatosellüler karsinomda miRNA ekspresyon seviyelerinde farklılıklar gözlenmiştir (72).

Takamizawa ve ark. (89) akciğer kanserinde yapmış oldukları çalışmada azalmış let-7 ekspresyonu ve RAS proteinin de dikkat çekici bir artış gözlemlemişlerdir. Normal ve neoplastik meme dokusunda yapılan çalışmalar miRNA profillerinin farklı olduğunu göstermiştir. Özellikle miR-125b, miR145, miR-21 ve miR-155 miRNA seviyelerinin meme kanseri dokusunda azaldığı rapor edilmiştir (84). Çeşitli gruplar tarafından kanser hastalarında miRNA seviyeleriyle ilgili yapılan çalışmalarda miRNA'ların normal ve tümör dokularında farklı eksprese olduklarını bulmuşlardır (86). Kanserdeki miRNA ekspresyonunda oluşan değişimlerin sebepleri arasında, miRNA'ların biyogenezine katılan enzimlerin ekspresyon ve/veya fonksiyonundaki değişimler, miRNA promoterlerinde oluşan anormal epigenetik değişiklikler, bunların metilasyon durumu veya histon kalıplarının değiştirilmesi yer almaktadır. miRNA ekspresyonu düzenleyici başka bir önemli mekanizma transkripsiyon kontrolüdür. miRNA ekspresyonu kanserle ilişkili transkripsiyonel düzenlemenin ilk örneği myc onkogen tarafından uyarılan miR-17/92 küme transkripsiyonel aktivasyonudur.

MikroRNA'lar ağırlıklı olarak transkripsiyonel aşamada düzenlenmektedir (Şekil 8). p53, myc gibi transkripsiyon faktörleri direkt olarak miRNA promotör bölgelerine bağlanarak miRNA transkripsiyonunu etkilemektedir (90). miRNA'lar, mRNA'lara benzer şekilde transkripsiyon sonrası aşamada da regüle edilmektedirler. p53 gibi proteinler Droscha ve Dicer fonksiyonunu regüle ederek miRNA olgunlaşmasını transkripsiyon sonrası aşamada kontrol etmektedirler (91, 92).



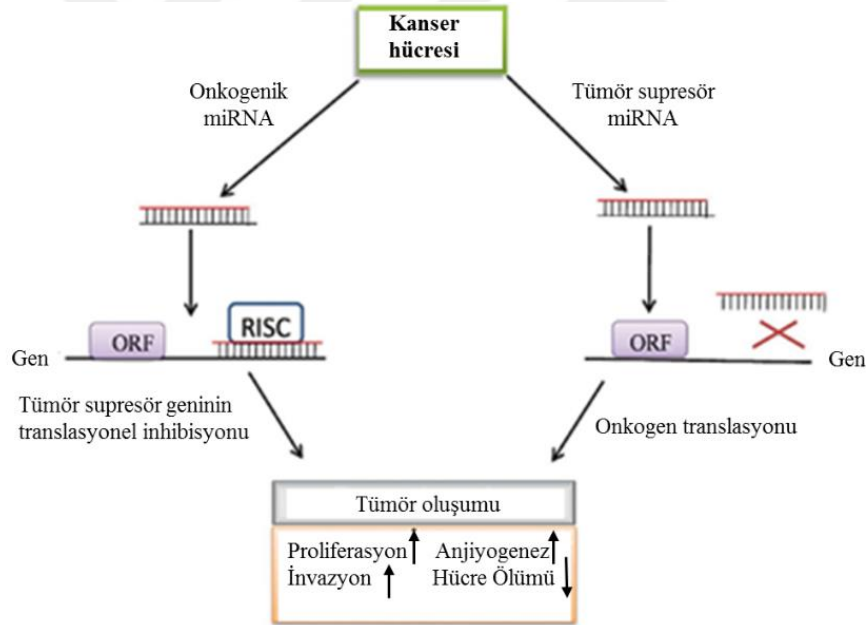
**Şekil 8.** miRNA genlerinin transkripsiyonel olarak regülasyonu (Krol'dan, 90)

MikroRNA profillerin belirlenmesi sadece karsinogenezde rol alan miRNA'ların belirlenmesi açısından değil, aynı zamanda kanserlerin sınıflandırılması açısından da önemlidir. miRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre

onkogenik veya tümör supresör özellik gösterirler. Bir onkogenin ekspresyonunu kontrol eden miRNA'lar tümör supresör, tümör supresörünlerin baskılanmasını sağlayan miRNA'lar ise onkogen olarak adlandırılır (77). Günümüzde kanser araştırmaları sırasında onkogen veya tümör supresör gen olarak görev yapan birçok miRNA bulunmuştur (79).

#### 4.4.4. Tümör Supresör ve Onkogen MikroRNA'lar

Birçok kanser türleriyle ilişkilendirilen miRNA'lardan ekspresyon düzeylerindeki değişiklikleri ve hedefledikleri mRNA'lar göz önüne alındığında miRNA'ların kanser prognozuyla ilişkisi hakkında bilgi sağlanabilmekte ve tümör biyobelirteci olarak kullanılabilir. Ayrıca kanserin tedavi süreci içerisinde faydanılabilecek hedef moleküller olabileceği de ortaya konulmuştur (52, 77, 84). Tümör supresör ve onkogen olarak davranan miRNA'ların etkisi Şekil 9'de gösterilmiştir (82).



**Şekil 9.** Tümör supresör ve onkogen olarak davranan miRNA'ların etkisi (Javed'den, 82)

Tümör dokularında anormal miRNA ekspresyonlarındaki değişikliklerin altında yatan mekanizmaları anlayabilmek amacıyla miRNA'ların düzenlenme mekanizmalarını inceleyen çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

#### 4.4.4.1. Tümör Supresör MikroRNA'lar

MikroRNA'ların karsinogenez ile ilişkisi ilk olarak 2002 yılında miR-15a ve miR16-1'in keşfedilmesi ile belirlenmiş olup, bu miRNA'ların etki mekanizması ise 2005 yılında Cimmino ve ark. yapmış oldukları çalışma ile ortaya konulmuştur. KLL hücrelerinde miR-15a ve miR-16a'nın hedef geninin Bcl-2 olduğunu göstermiş ve bu miRNA'ların tümör supresör aktiviteye sahip olduklarını tespit etmişlerdir (72, 77). Bir başka çalışmada lösemi hücre serisinde miR-15a ve miR-16-1'nin Bcl-2 genini hedef alarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (93).

Tümör supresör özelliği olan diğer bir miRNA, let-7 ailesinin üyeleridir (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g). Akciğer kanseri üzerine *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılan çalışmada kanser dokusu ile normal akciğer dokusu karşılaştırıldığında kanserli dokularda let-7 seviyelerinin düşük olduğu belirtilmiştir. 2005 yılında yapılan çalışmada, let-7'nin RAS onkogenin aktivitesini kontrol ettiği belirtilmiştir. RAS onkogeni let-7'ye komplementer bağlanma bölgeleri içermektedir, böylece let-7 mRNA'ya bağlanır ve proteine translasyonunu engeller. Akciğer tümör dokularında let-7 seviyelerinin düşüken, RAS protein seviyesinin önemli derecede artmış olduğu belirtilmiştir (72).

miR-29 (miR-29a, miR-29b, miR-29c), tümör supresör karakter sergileyen miRNA'lar arasında yer alıp, akciğer kanseri, invaziv meme kanseri, KLL, akut miyeloid lösemi (AML) de tümör supresör aktivite gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (77, 83). miR-29 ailesi üyeleri, Cdc42 ve p53a hedef alır ve p53 upregülasyonuna ve apoptozu yol açar (94).

Bir başka miRNA ailesinin miR-34'ün (miR-34a, miR-34b ve miR-34c) birçok farklı kanser tipinde, p53 tümör supresör tarafından uyarılan tümör baskılayıcı etkisinin olduğu belirtilmiştir. DNA hasarı ve onkogenik stres, p53'ü aktive eder. p53, miR-34a ve miR-34b/c promotörüne bağlanarak bunların ekspresyonlarını indükler (95). miR-34 ailesinin hedef genleri arasında c-myc, cyclin E, CDK4/6, Bcl-2, survivin yer almaktadır (93, 96).

miR-145'in, p53 tarafından düzenlendiği, birden fazla onkogeni hedefleyerek hücre döngüsü, proliferasyon, apoptoz ve invazyon gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenlemede yer aldığı belirtilmiştir. miR-145; IRS-1, IGF-IR veya epidermal büyüme

faktörü reseptörü (EGFR) gibi büyüme faktörü ile ilişkili genleri hedefleyerek hücre çoğalmasını baskılayabildiği, DFF45, CBFβ, CLINT1, PPP3CA veya c-myc'yi inhibe ederek apoptozu indüklediği ve tümör gelişimini baskıladığı gösterilmiştir (97).

miR-143'ün, meme, serviks, kolorektal, mesane ve hipofiz tümörlerinde supresör olarak görev yaptığı belirtilmiştir. miR-143'ün doğrudan Bcl-2 genini hedef aldığı rapor edilmiştir (77, 94).

#### **4.4.4.2. Tümör Onkogen MikroRNA'lar**

Onkogenik miRNA'lar, tümör supresör miRNA'ların aksine, çoğunlukla kanser türlerinde kontrolsüz büyümeyi artırıcı ve/veya antiapoptotik yönde fonksiyon gösterirler (77, 95). Onkogenik özelliklere sahip miRNA'lar onkomir olarak adlandırılmaktadır (96).

miR-17/92 gen kümesi, ilk onkogenik olduğu gösterilen miRNA'yı kodlayan bölgedir (77). miR-17/92 gen kümesi, insan genomunda kromozomun 13q31.3 yerleşik olup, bu gen kümesi altı adet miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1) kodlamaktadır (72). miR-17/92 gen kümesinin üyeleri çeşitli katı tümörlerde, hematolojik malignansilerde, meme, kolon, akciğer, pankreas, prostat, mide ve lenfomalarda yüksek seviyede ekspresyonu gerçekleştirilmektedir. miR-17/92, hedef genleri arasında PTEN ve Retinoblastoma protein (Rb) tümör supresör genleride yer almaktadır. miRNA'lar, hücre proliferasyonunu artırıp, apoptoz inhibisyonunu sağlayarak ve tümör anjiyojenezini indükleyerek kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır (77). miR-17-19b aşırı üretimi, murin lenfoma modelinde, lenfoma gelişimini hızlandırdığı belirtilmiştir (72).

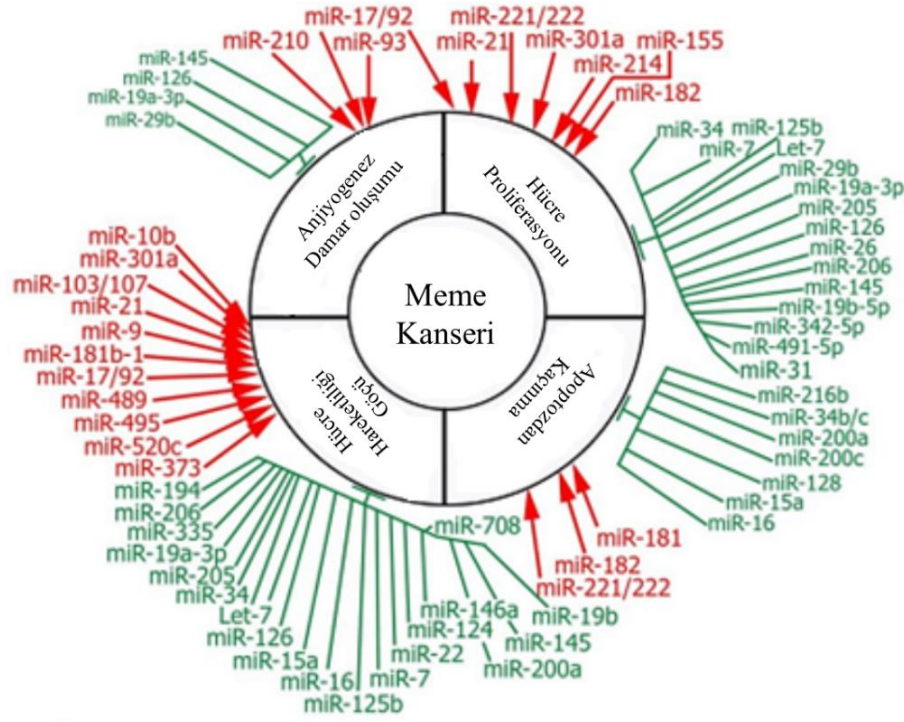
Onkogen olarak fonksiyon gösteren bir diğer miRNA, miR-21'dir. AML, KLL, glioblastoma gibi hematolojik malignlerde ve pankreas, prostat, mide, kolon, akciğer, meme, karaciğer kanseri gibi pek çok kanser türünde yüksek seviyede eksprese edilir (77). miR-21'in PTEN, programlanmış hücre ölümü 4 (PDCD4) ve FAS ligandı dahil olmak üzere birçok tümör baskılayıcı genin mRNA'sını hedef aldığı, metalloproteinaz 3 ve tropomiyozin 1 (TPM1) inhibe ettiği belirtilmiştir. miR-21 artışı birçok tümör supresör hedefin baskılanması, hücre proliferasyonunun artışı ve apoptozun azalması şeklinde gösterilmiştir (87, 98).

miR-155, meme kanseri dahil olmak üzere pankreas, akciğer, B hücreli lenfoma ve Hodgink's lenfoma gibi kanserlerde ekspresyonun yüksek olduğu gösterilmiştir (77, 95) Meme kanserinde, miR-155 “forkhead box O3B pseudogene” (FOXO3B) hedef alır, ayrıca yüksek ifadesi kemoterapötik ajanlara karşı direnç geliştirir ve hücrenin hayatta kalma şansını artırır. Kolorektal kanserde ise miR-155 DNA tamir sistemini hedef alır (98).

miR-31 ise direkt olarak tümör baskılayıcı large tumor suppressor 2 (LATS2) ve PP2A regulatory subunit B  $\alpha$  isoform (PPP2R2A) genlerinin mRNA'larını yıkarak onkojenik etki gösterir (96). miR-17-5p, miR-221 ve miR-222 gibi miRNA'lar doğrudan, PTEN ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir. miR-19, miR-92 ve miR-32'nin, Bim proapoptotik işlevini hedefleyerek, miR-125b prostat kanserinde hastalığın ilerlemesi ve direnç göstermesi için proapoptotik (Bcl-2 homologous antagonist killer protein) Bak 1 hedefleyerek onkogen olarak hareket ederler (94). miR-372, miR-273 miR-181a, miR-483-3p ve miR-10b dahil olmak üzere birçok miRNA'nın tümör oluşmasını teşvik ettiği bilinmektedir (94, 98).

#### **4.4.5. Meme Kanseri ve MikroRNA İlişkisi**

Meme kanseri kansere bağlı ölümlerin başta gelen nedenlerinden biridir. Günümüzde ortalama sekiz kadından birinin hayatı boyunca meme kanserine yakalanma riski olacağı tahmin edilmektedir. Meme kanseri tanı ve tedavisi ile ilgili ilerlemeler olmasına rağmen, özellikle kanser tedavisinde hala keşfedilmemiş alanların olduğu bilinmektedir. Çeşitli çalışmalar miRNA'ların meme kanserinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Son birkaç yıl içinde, miRNA'ların meme kanseri hücrelerinde hücre proliferasyon, invazyon, anjiyojenez ve metastazda rol oynadıkları belirtilmektedir (93). Meme kanseri ile ilişkili olan pek çok miRNA mevcuttur. Meme kanseri tedavisinde, öncelikle onkojenik ya da tümör baskılayıcı miRNA'ların rolünü, meme kanseri gelişimini ve ilerlemesini nasıl etkileyebildiklerini anlamak gerekir. Onkogen miRNA'ların baskılanması ve supresör miRNA'ların aşırı ekspresyonu antikanser tedavisinde önemli bir rol oynayabilir. Meme kanserini etkileyen onkogen ve supresör miRNA'lar Şekil 10'da gösterilmiştir (94). miRNA'ların daha iyi anlaşılması özellikle meme kanseri tedavisi için yararlı bir gelişme olabilir (93).



**Şekil 10.** Meme kanserini etkileyen onkogen ve supresör miRNA'lar (Lima'dan, 94)

Liu ve ark. (99) meme kanseri olan insan ve farelerde yaptıkları çalışmada; normal dokuya kıyasla meme kanserinde anormal miRNA ekspresyonunun varlığını belirtmişlerdir.

miR-34a'nın birçok kanser türünde ekspresyonunun azaldığı ve p53 tarafından transkripsiyonel olarak düzenlendiği belirtilmektedir. miR-34a'nın farklı meme kanseri hücre serilerinde düşük seviyede ekspre edildiği bildirilmiştir. miR-34a'nın Bcl-2 ve SIRT1 hedef aldığı, hücre proliferasyonu ve yayılmayı inhibe ettiği gösterilmiştir (92). Ayrıca miR-34a'nın CDK4, CDK6, siklin D1, siklin E2, E2F3 gibi hücre döngüsü proteinleri down regüle ederek hücre döngüsü durduğu ve apoptozu indüklediği belirtilmiştir (96).

miR-17/20 kümesinin, MCF-7 hücre serisinde siklin D1 miktarını azalttığı, hücre proliferasyonunu baskıladığı, G1/S geçişini engellediği bildirilmiştir. Meme kanseri hücre serilerinde azalmış miR-17/20 ekspresyonunun yüksek siklin D1 miktarıyla ters orantılı olduğu belirtilmiştir (97).



miR-145'in c-Myc, siklin D1 ve eIF4E genleri hedef aldığı belirtilmiştir. miR-16'nın Bcl-2, CCND1, CCND3, CCNE1 ve CDK6 da dahil olmak üzere hücre proliferasyonunu teşvik eden çoklu hedef genleri düzenleyebildiği belirtilmektedir (96).

miR-21'in meme kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde ekspresyonunun arttığı bilinmektedir. Meme kanserinde miR-21'in ekspresyonun ileri evre ve metastazla ilişkili olduğu belirtilmiştir. MCF-7'de miR-21 inhibisyonu sonucu hücre proliferasyonunda azalma ve apoptoz da artma gözlemlendiği belirtilmiş olup, miR-21'in olası hedeflerinden birinin Bcl-2 olabileceği öne sürülmüştür (98). MCF-7 hücrelerinde miR-21 hedef genler arasında FAM3C, ACTA2, APAF1, BTG2, FAS, p21 ve PDCD4 yer aldığı belirtilmektedir. Böylece miR-21 ve p53 tümör baskılayıcı yol arasındaki işlevsel bir bağ olduğu düşünülmektedir (97).

Bir tümör supresör olarak bilinen miR-145'in, OCT4, SOX2 ve KLF4'ün 3' UTR'yi hedefleyerek insan kök hücresi büyümesinde ve farklılaşmasında da önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (97). MCF-7 hücrelerinde miR-373/520c ailesinin prometastatik özellikte olduğu ve yapılan diğer çalışmalar da miR-373 ve miR-520c'nin kanser hücre migrasyonu ve invazyonunu ilerlettiği bildirilmiştir (87). miR-335, miR-206 ve miR-126 insan meme kanser metastazının supresör miRNA'lar olarak tanımlanmıştır (97). miR-200 ailesi miR-200a, miR-200b, miR 200c, miR-141 ve miR-429'den oluşur ve miR-200 ailesinin tüm üyeleri meme kanseri metastazında rol oynamaktadır (93).

#### **4.4.6. MikroRNA ve Kanser Tedavisi**

Kanser hücrelerine karşı kullanılan ilaçların direnç geliştirmesi ve bu ilaçların kronik kullanımının normal hücrelerde de toksisite göstermesi, yeni nesil antikanser ilaç geliştirme ve farklı terapötik yöntem arayışını oldukça popüler bir araştırma alanı haline getirmiştir (100). miRNA'ların kanser ve çeşitli hastalıklardaki rolü ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bugün miRNA'ların hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili anahtar moleküller oldukları bilinmektedir. Bu çalışmaların ışığında miRNA'lar birçok kanser türünün moleküler patolojisinin aydınlatılmasında ve tedavilerinde hedef molekül haline gelmişlerdir (101).

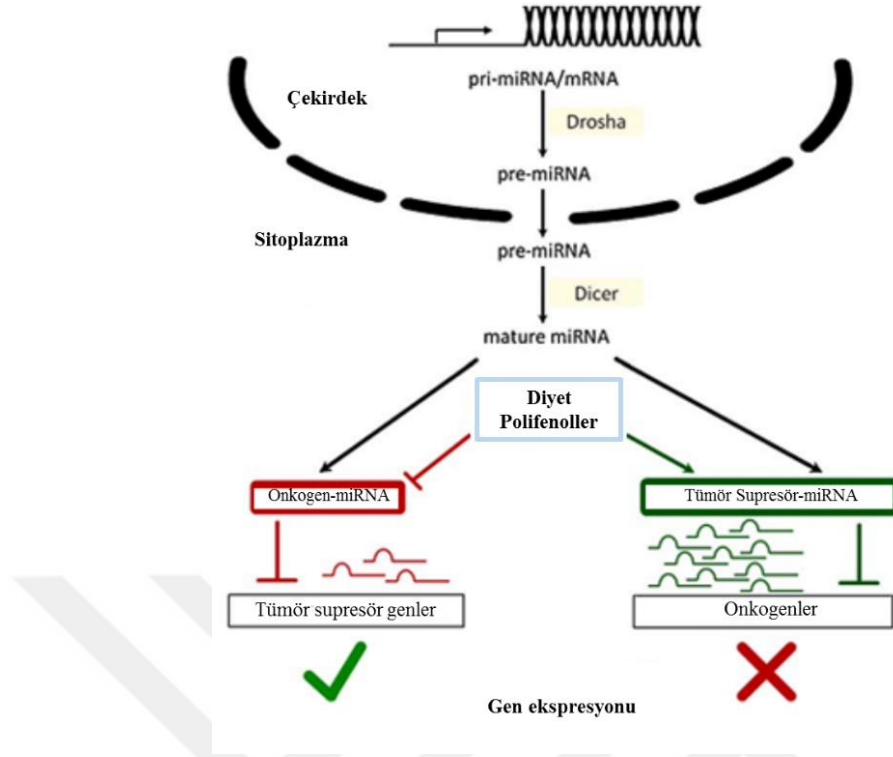
Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kanser hastalarının serumunda miRNA'ların belirlenmesi, kanserin erken teşhis ve tedavisi için yeni bir strateji haline geldi. Elde

edilen bulgular sonucunda bu küçük moleküllerin, prognostik amaçlar için potansiyel klinik biyobelirteç olabileceğine odaklanılmıştır (73).

MikroRNA'nın karsinogenezdeki rolü, bu moleküllerin tedavi amaçlı kullanılabilmesini düşündürmüştür. Onkogen olarak görev yapan miRNA'yı hedef olarak tanıyıp onu bloke ederek onkojenik aktiviteyi durduracak oligonukleotidler sentezlenmiştir ki, bunlara "antagomir" denir. Bunun yanı sıra, tümör supresör etki gösteren bazı miRNA'ların sentetik analogları yapılmıştır. miRNA ve RNA interferans ile ilgili başka bir tedavi yöntemi de antisense oligonukleotidlerdir. Bunlar onkogene ait mRNA'ya bağlanıp, onu bloke ederek mRNA'dan protein sentezini engeller ve o onkogenin etkisi bastırılmış olur. Tedaviye yönelik adımlar şimdiden atılmış olsada miRNA'ların gelecekte kanser tedavisinde daha büyük bir rol oynayacağı düşünülmektedir (79).

#### **4.4.7. MikroRNA ve Polifenol İlişkisi**

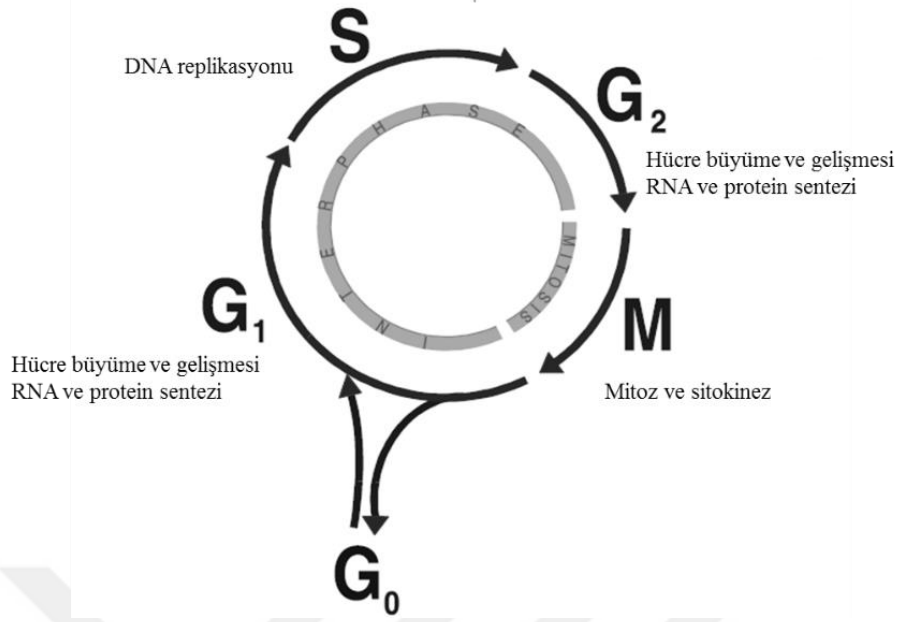
İnsan diyetinin önemli bir bölümünü oluşturan polifenoller, sekonder bitki metabolitleri olduğu için, insanlar tarafından sentezlenemezler (14, 102). Ayrıca flavonoidlerin alkilleyici ajanlara, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, radyoaktif kimyasallara ve diğer mutajenlere/karsinojenlere karşı antigenotoksik aktiviteye sahip olduğu, bundan dolayı da günlük diyetle ilaveten çeşitli kaynaklardan (yeşil çay, kırmızı üzüm, propolis gibi) alınan polifenollerin, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ve kansere karşı koruyucu olabileceği vurgulanmaktadır (6, 7, 103, 104). Son yıllarda polifenollerin antioksidan özelliklerinin yanında; çeşitli sinyal yollarını etkilediği, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve hücreler arası sinyal mekanizmasını inhibe ettiği, DNA tamir enzimlerini ise aktive edebildikleri ortaya konulmuştur (6, 7). Yapılan çalışmalarda polifenol bileşiklerin çeşitli onkojenik veya tümör supresör miRNA'ları hedefleyerek gen ifadelerini düzenlediği ortaya konulmuştur (Şekil 11) (8).



**Şekil 11.** Polifenol bileşikler çeşitli onkojenik veya tümör supresör miRNA'ları hedefleyerek gen ifadelerini düzenler (Link'den, 8)

#### 4.5. Hücre Döngüsü

Çoğalmak üzere uyarılmış hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitenin görüldüğü süreçtir (19). Hücre döngüsü, genel olarak interfaz ve mitoz (M) olmak üzere iki aşamaya ayrılır (105). İnterfaz kendi içerisinde G1, S ve G2 olmak üzere çeşitli bölümlerden oluşur. G1 evresinde hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, büyümeyi indükler, RNA ve protein sentezi olur. İnterfazın en belirgin olayı S evresinde gerçekleşen çekirdekteki replikasyon olayıdır. Bu evrede DNA iki katına çıkar. Mitozdan önce G2 evresine gelir, hücre büyümeye devam eder, aynı zamanda RNA sentezi ve protein sentezi gerçekleşir. Hücre mitozla başlamadan önce DNA miktarının iki katına çıkarıldığından emin olmak ister. G1 ve G2 evlerinin bir başka önemi de mitoz öncesi ve sonrası hücreye büyüme zamanı kazandırmalarıdır (105-107). G1 evresindeki hücreler S evresine girer veya girmezler. Şayet bir hücre S evresine girmezse günlerce, aylarca, hatta yıllarca kalacağı dinlenme evresi olan G0 (G sıfır) evresine girer (2). Hücre döngüsü evreleri Şekil 12'de gösterilmektedir (108).



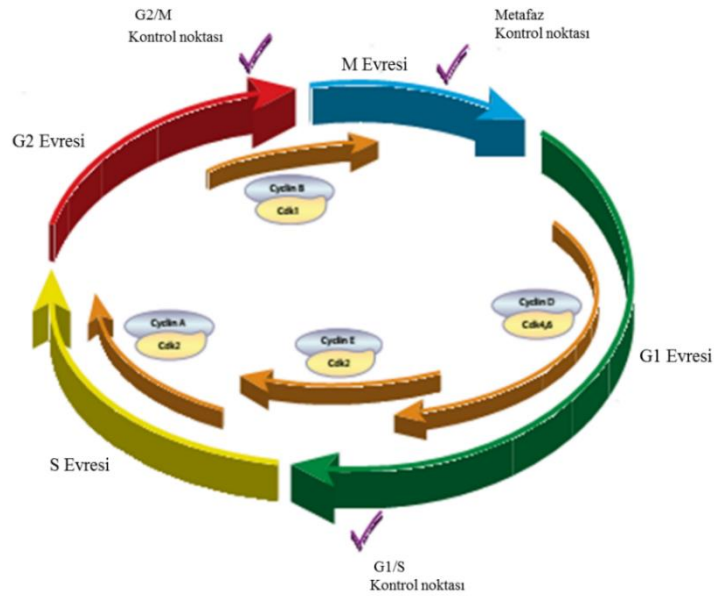
**Şekil 12.** Hücre döngüsü evreleri (Vermeulen'den, 108)

Hücre döngüsünde bir evre tamamlanmadan sonraki evreye geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir. Hücre döngüsünün G<sub>1</sub>/S, G<sub>2</sub>/M ve metafaz-anafaz geçişlerinde kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktalarında hücrenin döngüye devam edip etmeyeceği kararı verilir (56). Hücre döngüsünün ardışık evreler arasındaki sıralı ilerleyişi bir takım hücre içi moleküler mekanizmalar tarafından düzenlenir. Hücre döngüsünün doğru bir şekilde ilerlemesi ve bu ilerleyişin kusursuz kontrolü bir canlının hayatta kalması için gereklidir (106). Hücre döngüsünün düzenlenmesi; siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından gerçekleştirilir (19, 106). Siklinler, CDK ve CDI'lerin düzeyleri hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve kompleks bir düzen içinde döngünün ilerlemesini düzenlerler (19). Bu proteinlerin aktiviteleri ya da miktarları, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi dış faktörler tarafından etkilenir. Bu faktörler çeşitli sinyal yollarını inhibe ya da aktive ederek hücre döngüsünün ilerlemesini, hücre döngüsünü durdurulmasını, farklılaşmayı ya da apoptozu gerçekleştirmektedirler (106).

Memeli hücrelerinde bugüne kadar 9 siklin ve 7 CDK tanımlanmıştır. Her ne kadar siklin ve CDK'ların hücre döngüsündeki esas rolleri belirlenmiş olsa da mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca yapılan çalışmalar, bu

proteinlerin transkripsiyon, nöronal fonksiyon ve iyon transportu gibi olaylarla da iç içe olabileceğini belirtmektedir (19).

Siklinler, hücre döngüsünün belirli evrelerinde sentez edilir ve CDK'ların aktivasyonundan sorumludurlar. Hücre döngüsünde sırasıyla; siklin D, E, A ve B ortaya çıkıp, bir veya birden fazla CDK'a bağlanırlar. Siklin D; hücre döngüsünde düzeyi ilk artan siklindir, G1'in ortasında ortaya çıkar ve S evresinde yok olur. D1, D2 ve D3 olmak üzere 3 formu bulunur ve hücre döngüsünün G1 evresinde CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak onları aktive eder (105). Siklin E'nin iki izoformu bulunur ve S evresinde CDK2 ile aktif bir kompleks oluşturur. Siklin A'nın iki izoformu vardır, S fazı boyunca sentez edilir ve anafaz sırasında da yıkılır. Siklin A, CDK2 ile kompleks yapar. Siklin B1 ise S fazının geç döneminde sentez edilir ve G2 evresinden M evresine geçerken sentezi maksimal düzeye erişir, ardından anafazda yıkılır. Siklin B, CDK2 ile etkileşime girer ve bu kompleks MPF (M-phase/maturation promoting factor) olarak da bilinir. Siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozisden çıkar ve G1'e tekrar geri döner (105, 107). Hücre döngüsü evreleri ve evreler arası geçişi gerçekleştiren siklin-CDK kompleksleri Şekil 13'de gösterilmiştir.



**Şekil 13.** Hücre döngüsü evrelerinde siklin-CDK kompleksleri (Wong'dan, 107)

Hücre döngüsünün ilerleyişini sağlayan siklin-CDK kompleksleri ve etki ettikleri evreler Tablo 5'de verilmiştir.

**Tablo5.** Hücre döngüsünün ilerleyişini sağlayan siklin-CDK kompleksleri ve etki ettikleri evreler (108).

Cdk Tipi	Siklin Tipi	Etki Ettiği Evre
CDK4	Siklin D1, D2, D3	G <sub>1</sub> evresi
CDK6	Siklin D1, D2, D3	G <sub>1</sub> evresi
CDK2	Siklin E	G <sub>1</sub> /S geçişi
CDK2	Siklin A	S evresi
CDK1	Siklin A	G <sub>2</sub> /M geçişi
CDK1	Siklin B	Mitoz
CDK7	Siklin H	CAK

Siklin-bağımlı protein kinazlar siklinlerle kompleks oluşturma sonucu aktifleşirken, CDI'lerle kompleks yapmaları halinde ise inhibe olurlar. CDK'lar proteinleri fosforilleyerek onları aktif hale getirir ve aktivasyon durumuna göre hücre siklusu durur ya da bir sonraki aşamaya geçer (19).

Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri; CDK inhibitör (INK4) ailesi ve CDK ile etkileşebilen protein (CIP) ailesi olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. INK4 ailesi; siklin D'nin CDK 4 veya 6'ya bağlanmasını engelleyen p15INK4B, p16INK4A, p18INK4Cve p19INK4D olmak üzere dört üyeye sahiptir (19). Cip/Kip ailesi, siklin ve CDK arasında şekillenmiş olan komplekslere bağlanarak onları inaktive eden başlıca üç elamanı içerir; p21Cip1, p27Kip ve p57Kip2 (102). CDI protein miktarının kontrolü ubiquitin aracılıklı degradasyon ile kontrol edilmektedir. Tablo 6'da CDK inhibitör ailelerinin üyeleri ve işlevleri özetlenmiştir (108).

**Tablo 6.** CDK inhibitör ailelerinin üyeleri ve işlevleri (108)

CDI Ailesi	İşlevi	Üyeleri
<b>INK4 Ailesi</b>	G1 geçişinin kontrolü CDK4 ve CDK6 inaktivasyonu	p15 <sup>INK4b</sup>
		p16 <sup>INK4a</sup>
		p18 <sup>INK4c</sup>
		p19 <sup>INK4d</sup>
<b>Cip/Kip Ailesi</b>	G2/M Geçişinin kontrolü siklin CDK kompleksleri ve siklin BCDK1 inaktivasyonu	p21 <sup>Waf1/Cip1</sup>
		p27 <sup>Cip2</sup>
		p57 <sup>Kip2</sup>

#### 4.5.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü

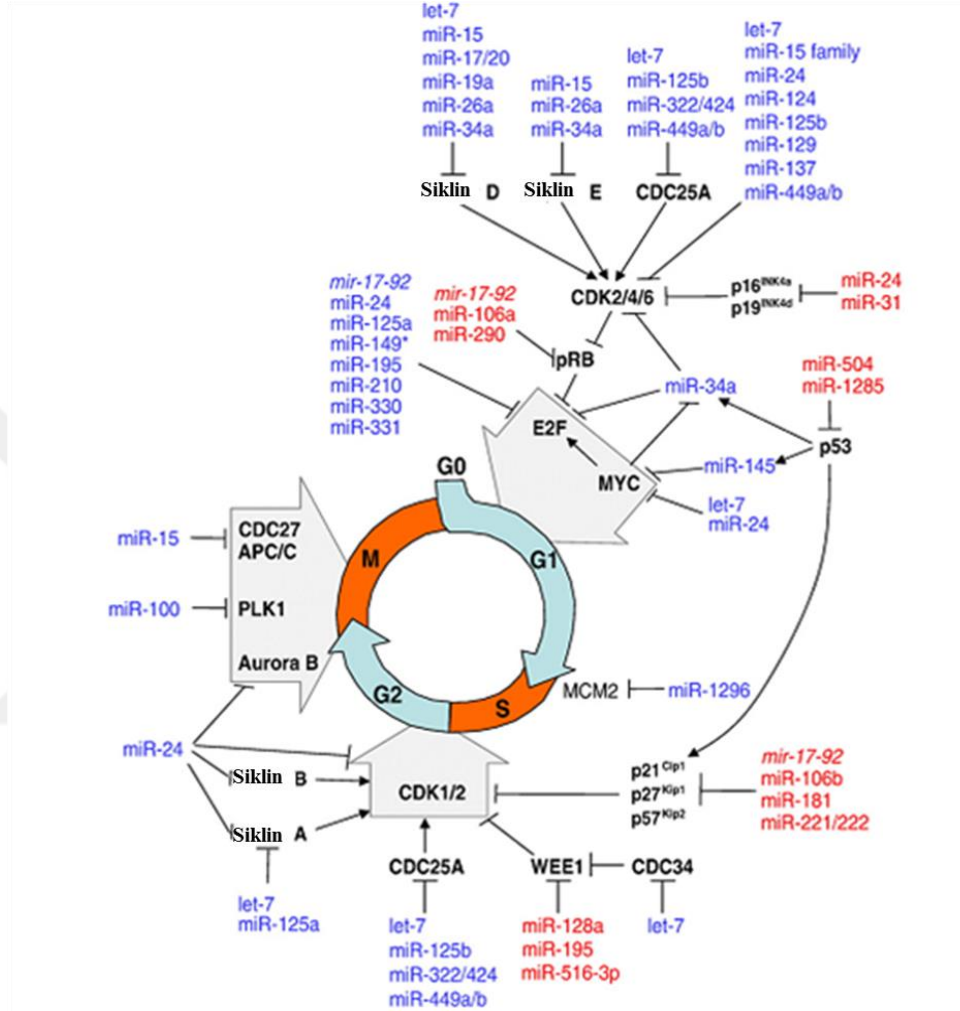
Hücre döngüsünün kusursuz bir şekilde ilerlemesi bir evreden diğerine geçiş sırasında "kontrol noktaları" (checkpoints control) adı verilen sensör mekanizmalar tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Böylece bir evre tamamlanmadan diğer evreye geçiş izni verilmemektedir (109). S evresinde hücre replikasyon yönünde son kararını vermeden önce, G1/S kontrol noktasında DNA hasarına bakılır ve hasar olması durumunda hücre döngüsü durur, DNA tamir mekanizması harekete geçer. DNA hasarı giderilemez ise hücre apoptoza veya yaşlanma sürecine yönlendirilir. Böylelikle DNA hasarı olan hücrenin replikasyonu önlenmiş olur. G2/M kontrol noktasında ise DNA replikasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı, hücrenin mitozu başlayıp başlayamayacağı kontrol edilir. Özellikle iyonize radyasyon gibi dış etkilere maruz kalmış olan hücreler için G2/M kontrol noktası önemlidir. Bu tür hücreler G2 evresinde duraksamaya neden olurlar. G2/M kontrol noktasındaki hatalar kromozomal anomalilere neden olurlar (105). Kontrol noktalarındaki amaç; olası genetik hasarın tamir edildiğinden emin olunması, kontrolsüz hücre bölünmesinin engellenmesi ve iki hücrenin birbirine benzer, eksiksiz şekilde genetik materyalin temin edilmesinin sağlanmasıdır (109).

#### 4.5.2. Hücre Döngüsü ve MikroRNA

Biyoinformatik tahminlere göre insan genomunun %60'dan fazlasının miRNA'lar tarafından düzenlenebileceği ileri sürülmektedir. miRNA'ların hedef transkriptinin ekspresyonunu modüle etmek suretiyle, hücre çoğalması, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrenel süreçleri de etkileyebileceği belirtilmektedir. miRNA'ların düzensizliği, kritik onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerin protein seviyelerini değiştirerek kanser gibi proliferatif hastalıklara neden olabilirler.

MikroRNA'ların ve hücre döngüsü regülasyonu arasındaki ilk bağlantılardan biri miR-15a/16'nın antiproliferatif potansiyelinin analizi ile kurulmuştur. KLL hastalarının yaklaşık %70'inde miR-15a/16 kümesi delesyona uğramıştır ve/veya down regülasyon söz konusudur. miR-15a/16 kümesi; siklin D1, E1, D3 ve CDK6 CDK1, CDK2 doğrultusunda hücre siklusunu G1 evresinde tutar. CDK4 ve CDK6 mRNA'ları miR-24, miR-34a, miR-124, miR-125b, miR-129, miR-137, miR-195, miR-449 ve let-7 ailesi tarafından düzenlenir. D-tipi siklin düzeyleri let-7, miR 15 aile, miR-17, miR-19a, miR-20a ve miR-34 tarafından down regüle edilmektedir. *In vitro* olarak insan karaciğer

kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada miR-26a direkt olarak siklin D2 ve E2 down regüle ettiği ve hücre döngüsünü G1 evresinde tuttuğu gösterilmiştir. Hücre döngüsü kontrolünde yer alan miRNA ve etki molekülleri Şekil 14’te gösterilmiştir.



Şekil 14. Hücre döngüsü kontrolünde yer alan miRNA ve etki molekülleri (Bueno'dan, 110)

CDK/siklin kompleksleri artması, pRB fosforilasyonu ile sonuçlanır ve aktif E2F faktörleri G1 evresinde ilerlemeyi ve S evresine girişi sağlar.

E2F faktörleri ve miRNA'lar arasındaki ilişkiyi ilk olarak O'Donnell ve ark. E2F1 proteininin, miR-17-92, miR-20a ve miR-17-5p tarafından negatif olarak düzenlendiğini belirterek ortaya koymuşlardır. Kolon kanseri hastalarından alınan tümör örneklerinde bu miRNA ve E2F1 seviyeleri arasında ters ilişki olduğu belirtilmiştir. miR17-92 dahil olmak üzere pek çok miRNA E2Fs seviyelerini down regüle ederek hücre döngüsünün



ilerlemesinde önemli rol oynar. Prostat ve mide kanseri hücrelerinde E2F1, miR-149, miR-330 ve miR-331-3p tarafından inhibe edilir ve hücre döngüsü tutuklama ile sonuçlanır.

INK4 veya Cip/Kip ailesine ait bazı hücre döngüsü inhibitörleri de miRNA'lar tarafından sıkı şekilde düzenlenir. CDK4/6'nın spesifik inhibitörü olan p16 Ink4a, miR-24 ve miR-31 tarafından kontrol edilir. p21 Cip1, miR-17-92 ve miR-106b tarafından kontrol edilirken, p27 kip1 ve p57 kip2 miR-221/222 ve miR-181 tarafından kontrol edilir. Ayrıca miR-125b, miR-24 ve let-7 miRNA'nın Siklin A veya Siklin B down regülasyonunu sağlar. G2/M geçişinde CDK1-siklin B kompleksi, bir negatif düzenleyicisi olarak işlev gören Wee1 ise, miR-195, miR-516-3p ve miR-128a tarafından down regüle edilir (110).

#### **4.5.3. Hücre Döngüsü ve Reaktif Oksijen Türleri**

Hücre döngüsünün düzenlenmesi endojen olarak üretilen siklinler ve CDK'lar ile kontrol edilir. Son zamanlarda, ROS'un hücre döngüsünde yer alan proteinlerin aktivasyonunu etkileyerek hücre döngüsü ilerleyişini kontrol ettiği öne sürülmektedir. Düşük seviyelerdeki ROS miktarının hücre döngüsünün normal seyrini değiştirmediği, fakat yüksek miktardaki ROS'un kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olabileceği belirtilmektedir. Hücre proliferasyonu, sağ kalım, migrasyon ve farklılaşmadan sorumlu olduğu düşünülen ve pek çok kanser türünde ekspresyonu artan EGFR inhibisyonu üzerinde çalışılmaktadır. Hücre çoğalmasının yanı sıra artan ROS miktarıyla beraber çeşitli hücrelerde EGFR yolağının da aktif hale getirildiği belirtilmiştir. Bir başka yaklaşım kanser hücrelerinde artmış ROS'dan dolayı aşırı eksprese olan ve hücre döngüsünün sürdürülmesi yönünde fonksiyon gösteren Cdc25'in baskılanmasıdır (19, 106).

#### **4.6. Hücre Ölümü**

Canlılığın biyolojik sisteminin geliştirilmesi ve sürdürülmesi için, hücrelerin çoğalması ve ölümü arasındaki homeostatik denge önemlidir. Doğal hücre ölümüyle ilgili ilk hipotezi 1842 yılında Carl Vogt kurmuş, 1858'de Rudolph Virchow, hücrelerde nekrozdan farklı bir ölüm şekli olduğunu göstermiş ve olayı "nekrobiosis olarak adlandırmıştır. 1885 yılında Walther Flemming doğal hücre ölümünü "kromatoliziz" olarak isimlendirmiş ve hücredeki morfolojik değişiklikleri anlatmıştır. Apoptozis

prosesi “Programlı hücre ölümü” olarak ilk kez 1964 yılında tanımlanmıştır. “Apoptoz” kelimesi literatüre ilk defa Kerr ve ark. tarafından 1972 yılında kazandırılmıştır. 1980’lerin sonlarında apoptozun gelişimi ve hastalıklardaki önemi üzerine yoğunlaşmıştır (111). 2000’li yılların başlarında hücre ölümü ile ilgili çalışmalar oldukça popüler hale gelmiştir. Hücre ölümü araştırmalarında ortak bir dil kullanmak amacıyla 2005 yılında "Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesi” (NCCD-Nomenclature Committee on Cell Death) kurulmuştur. NCCD’nin 2015 yılında yayınladığı son öneri derlemesinde; üç çeşit hücre ölümü sınıflama kriteri belirlenmiştir:

1. Morfolojik özelliklere göre (apoptotik, nekrotik, otofajik hücre ölümleri gibi),
2. Enzimolojik özelliklere göre (kaspaz, katepsin, kalpain, transglutaminaz gibi enzimlerin aktivitelere bağımlı ya da bağımsız hücre ölümleri gibi),
3. Fonksiyonel duruma göre (fizyolojik, patolojik, kazara, kontrollü, programlı hücre ölümleri) (19).

NCCD’nin önerisine göre bugüne kadarki çalışmalar ile belirlenen programlı hücre ölüm tipleri ise fonksiyonel olarak şöyle sınıflandırılmaktadır: 1) Apoptoz, 2) Otofaji, 3) Nekroptoz, 4) Mitototik Çöküş, 5) Kornifikasyon, 6) Partanatoz, 7) Netoz, 8) Anoikis, 9) Entozis, 10) Piroptoz (112).

#### **4.6.1. Apoptoz**

Apoptoz kelimesi yunanca kökenlidir ve “ağaçların yapraklarını dökmesi” anlamına gelmektedir (19). Son yıllarda yapılan birçok araştırma antikanser terapileri geliştirmek için apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü üzerine odaklanmıştır. Apoptoz; evrim boyunca korunmuş, oldukça kompleks, içsel bir ölüm programı olup gelişme evresinde ve yetişkinlikte doku homeostazisinin sağlanmasında olduğu kadar hasarlanmış ya da anormal hale gelmiş hücrelerin eliminasyonunda da oldukça önemli bir yere sahiptir (42).

Apoptozis, hücre ölümü ve hücre büyümesi arasındaki muhafaza edilmesi gereken fizyolojik denge için önemlidir (113). Apoptoz çeşitli durumlarda birçok dokuda görülmektedir: Tümörlerde hücre ölümü, bağırsak endoteli gibi dokularda, proliferasyon olan labil hücrelerden hücre kaybı, akut inflamasyon sonrası nötrofillerin ölümü, hepatitler veya diğer viral hastalıklarda (114), beyinde sinapsların oluşumu esnasında bazı nöronların ölümü, uterusda menstruasyon esnasında uterusun iç duvarındaki

hücrelerin ölümü (115). Isı, radyasyon, hipoksi ya da kimyasalların düşük dozları hücrelerde apoptoz yollarını aktiflerken aynı etkenlerin yüksek dozları ise hücrelerde nekroza neden olmaktadır (116).

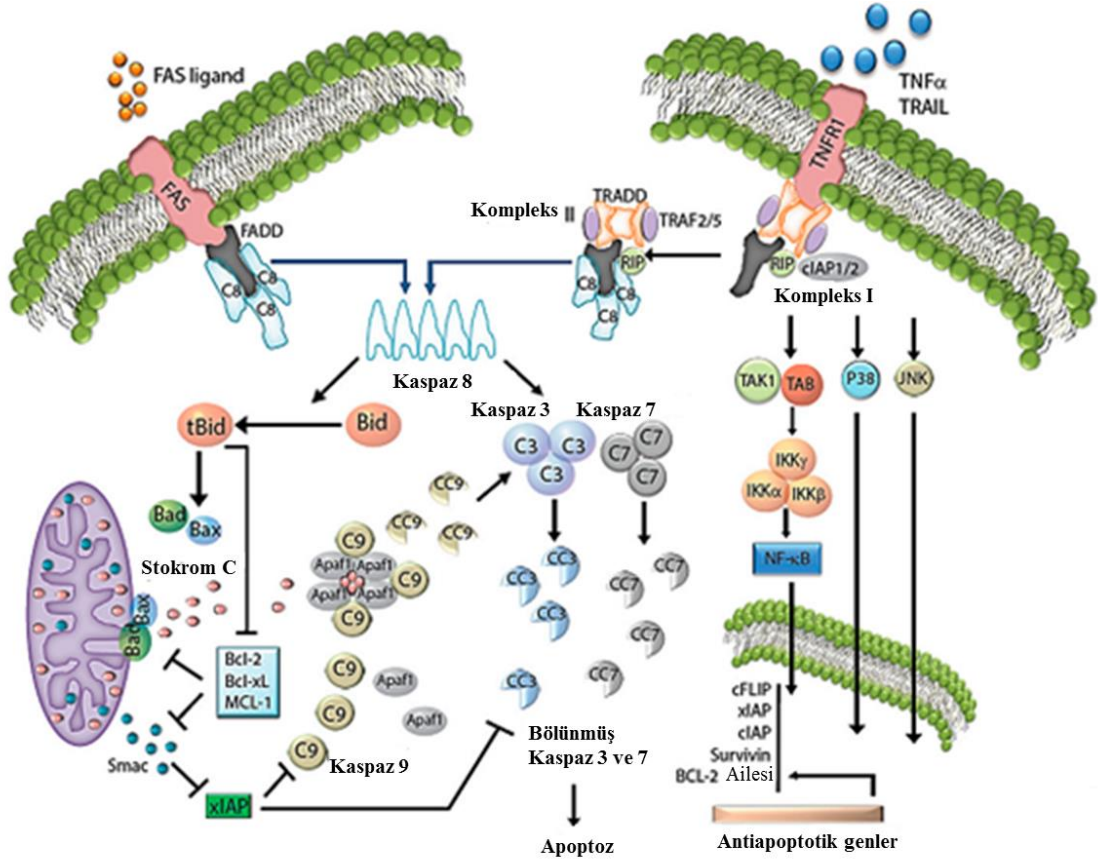
Apoptoz fizyolojik bir ölüm türü iken nekroz patolojik bir ölüm türü olarak kabul edilmektedir (19). Apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri arasında temel farklar vardır. Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Süreçteki başlıca bulgular; apoptoz da  $\text{Na}^+$  kaybına bağlı hücre büzülmesi görülürken, nekrozda hücre içi  $\text{Na}^+$  artışı ve suya bağlı olarak hücre şişmesi görülür (114). Apoptotik hücrelerde çekirdekte kromatin yoğunlaşması gözlenir (113) ve endonükleazlar tarafından nükleusun parçalanması apoptoz için tipiktir (114). Nekrotik hücre membranının seçici geçirgenliğini kaybetmesi sonucu hücre içeriğinin ortama salınımı gerçekleşirken, apoptotik hücrede küçük cepçikler (membrane blebs) oluşur. Apoptotik hücreler apoptotik cisimciklere ayrılırken, nekrotik hücre lizise uğrar. Nekrozda hücre içeriği dış ortama salındığından inflamasyon uyarılırken, apoptozisde apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından fagosit edildiklerinden inflamatuvar yanıt oluşmaz (19, 114).

Programlı hücre ölüm türü olan apoptoz iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada çeşitli biyokimyasal mediatörler hücreye hasarını tamir edebilme fırsatını vermektedirler. İkinci aşama ise “infaz evresi” dir. Eğer hücreler hasarı onarmada başarısız olurlarsa ikinci aşamaya geçilmekte ve hücreyi kontrollü bir şekilde ölüme götürecek yapısal değişiklikler (nükleer, membransal ve organel sel) meydana gelmektedir (19).

#### **4.6.1.1. Apoptoz Yolakları**

Kaspazları aktifleyerek apoptozu gerçekleştiren üç ana yolak olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar; intrinsik yolak (mitokondriyal), ekstrinsik yolak (ölüm reseptörlerine bağlı) ve tam olarak aydınlatılmamış ER stresi bağımlı yolaklardır (111). Ekstrinsik apoptoz yolağında, tümör nekrozis faktör (TNF) ailesine mensup TNF reseptör, FAS reseptör ve TRAIL reseptörlerin hücre dışı sinyalleri algılayarak aktiflenmesi sonucu kaspaz 8 aktiflenir. Bunun sonucunda kaspaz 3 aktiflenir (117) ve alternatif olarak Bid (BH3 interacting domain death agonist) proteinini tBid (Truncated Bid) haline çevirmektedir. Bid; Bcl-2 ailesinden bir protein olup, tBid formu mitokondriye geçerek membran geçirgenliğini azaltan mekanizmaları

düzenleyebilmektedir. Bundan dolayı Bid proteininin mitokondri ile reseptöre bağlı dış apoptoz yolağı arasında bağlantı kurduğı düşünölmektedir (113).



**Şekil 15.** İntrensik ve ekstrinsik apoptoz yolakları (Koff'dan, 113)

Mitokondri hücre ölümü düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (19). Bu yolak ölüm reseptörü yolağından farklı olarak hem hücre dışı sinyallerle (büyüme faktörü azlığı, hücrede oluşan oksidatif stres, UV ışını, DNA hasarı) hem de sitozolik kalsiyum iyonları gibi hücre içi sinyaller ile indüklenmektedir (111). Mitokondri aracılıklı intrinsik yolağın aktiflendikten sonra geri dönüşünün olmadığı gösterilmiştir. Mitokondri membranlar arası bölge proteinlerinden sitokrom c, Smac (Second mitochondria-derived activator of caspases), Diablo (Direct IAP-Binding protein with Low PI) gibi proteinlerin sitozole çıkışı efektör kaspazların aktiflenmesi ile sonuçlanmaktadır (19). Öncelikle mitokondri membran bütünlüğünün ortadan kalkması sitokrom c'nin sitozole çıkışının ve bunu takiben apoptotik proteaz aktifleyici faktör 1 (Apaf1) aktivasyonu ve kaspaz 9'ile oluşturduğu apoptozom kompleksi kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozun gerçekleşmesini sağlar (117). Smac ve Diablo proteinleri ise

apoptoz inhibitör proteinlerine (IAP) bağlanarak onları inhibe etmekte ve onların kaspazlara bağlanmasını engelleyerek kaspaz 9, 7 ve 3'ün aktivasyonunu sağlamaktadır (118). İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolları Şekil 15'de da şematize edilmiştir (113).

Ayrıca mitokondrideki antiapoptotik proteinler olan Bcl-2 ailesinin azalması proapoptotik olan Bax proteinlerinin artışı yine intrinsik yolu aktiflemektedir (117). Bcl-2 ailesi proapoptotik (Bax, Bid Bax, Bak, Bik, Bim gibi) ve antiapoptotik (Bcl-2 ve Bcl-XL Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W Bfl-1 ve Mcl-1 gibi) üyelerden oluşan ve apoptozun düzenlenmesinde önemli görevi olan onkogen protein grubudur. Proapoptotik protein mitokondriden sitokrom-c çıkışını indüklerken, antiapoptotik proteinler sitokrom-c salınımını engeller. Hücrenin apoptotik uyarılara karşı hassaslığı proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye bağlıdır (111, 119).

Tümör protein 53 hücre döngüsünü düzenleyen ve genomun gardiyanı olarak tabir edilen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA zarar gördüğünde DNA tamir sistemlerini aktifleyerek hasarın giderilmesini sağlar. Eğer hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse, hücrenin kanserleşmesinin önüne geçmek için apoptoz yolağını aktifleştirmektedir (120). p53 eksikliğinin ya da mutasyonunun doğrudan kansere yatkınlığının ortaya çıkarılması p53'ün tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilmesine neden olmuştur (19). p53'ün apoptozu indüklemesi Bax ekspresyonunu artırması ve böylece Bcl-2/Bax oranının değişmesi sonucu gerçekleşir. Ayrıca DNA hasarı ya da diğer stres durumlarında aktif hale geçen p53'ün Bax, Noxa (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis), Bid, Apaf-1 ve PIDD1 (p53-induced death domain protein 1) gibi proapoptotik proteinlerin ekspresyonlarını arttırarak hücrelerin apoptoza yönlendirildiği ortaya konulmuştur (120).

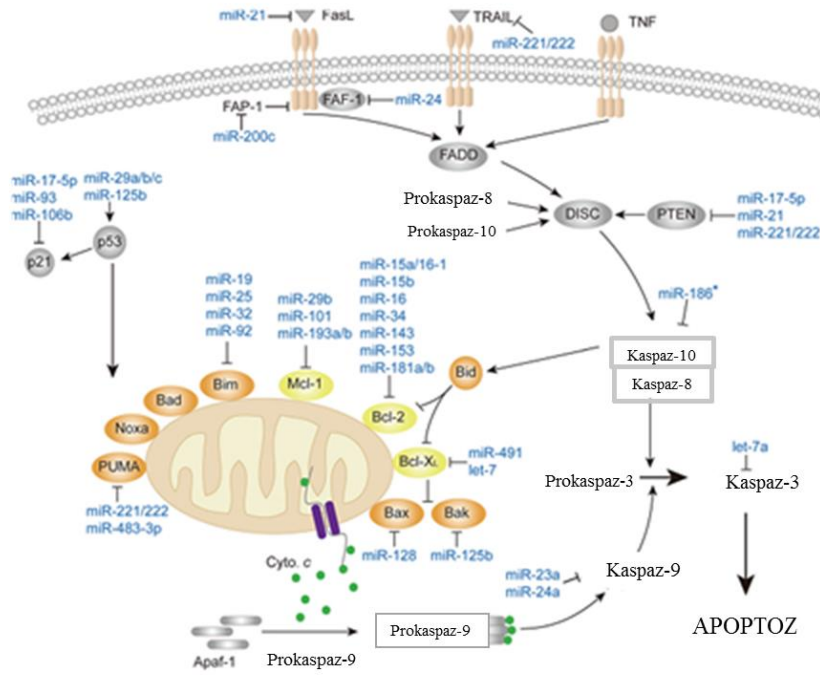
Endoplazmik retikulum (ER), özellikle hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeyinin dengede tutulması başta olmak üzere sentez, katlanma, translasyon sonrası modifikasyon, salgılanma gibi fonksiyonel protein oluşumu, lipit sentezi, kas kasılma ve gevşemesinde, ayrıca hücre döngüsü ve apoptoz gibi olaylarda da yer alan hücre organelidir. ER fonksiyonun bozulması sonucu ER lümeninde protein birikmesi gerçekleşir. Bu durum ER stresine yol açar. Uzamış ER stresi durumunda hücreler apoptoza yönlendirilmektedir. Normal koşullarda oldukça düşük seviyelerde C/EBP homolog proteini (CHOP), ER stresiyile

beraber hızla artmaktadır. Aşırı CHOP ekspresyonu, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoz gibi sinyal yollarını aktifleyebildiği; CHOP eksikliğinin ise hücreleri bu yollardan mahrum bıraktığı belirtilmiştir. CHOP proteininin özellikle antiapoptotik Bcl-2 proteinini azaltarak, Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinleri artırarak mitokondri bağımlı apoptoza yatkınlık yarattığı bildirilmektedir (19).

#### 4.6.2. MikroRNA ve Apoptoz

Günümüzde yapılan birçok araştırma antikanser terapileri geliştirmek için apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü üzerine odaklanmıştır. Apoptoz; evrim boyunca korunmuş, oldukça kompleks, içsel bir ölüm programı olup gelişme evresinde ve yetişkinlikte doku homeostazisinin sağlanmasında olduğu kadar hasarlanmış ya da anormal hale gelmiş hücrelerin eliminasyonunda da oldukça önemli bir yere sahiptir (42, 58).

Birçok miRNA'nın apoptoz, otofaji ve nekroz dahil olmak üzere, programlanmış hücre ölümünü düzenlediği belirtilmektedir. miRNA'ların intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollarının düzenlenmesinde yer aldığı ve tümör gelişimini inhibe ettiği öne sürülmektedir (121).

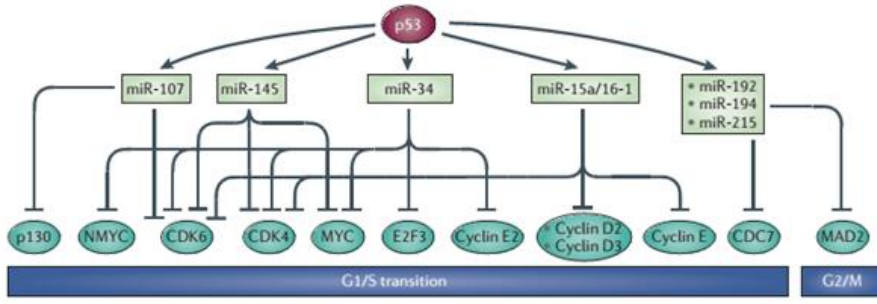


Şekil 16. Apoptotik süreçte yer alan miRNA'lar (Chen'den, 122)

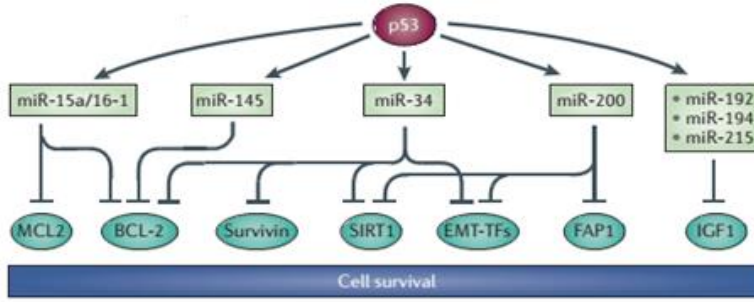
miR-17-5p, miR-21, miR-2, miR-186, miR-200C ve miR-221/222'de dahil olmak üzere bu miRNA'lar, kaspaz-10, PTEN ya da TNF, TRAIL ya da FasL gibi spesifik ligandları hedef alır ve böylece apoptotik süreci olumsuz etkiler (Şekil 16) (122).

miR-133a ve miR-24a, kaspaz-9 ekspresyonunu inhibe ederek apoptozu inhibe eder (94). İntrinsik yolda, çeşitli miRNA'ların Bcl-2 ailesi proteinleri hedef alır. miR-19 miR-25, miR-32 ve miR-92 doğrudan proapoptotik fonksiyonunu Bim proteinini, miR-221/222 ve miR-483-3p PUMA'yı, miR-125b Bak proteinini, miR-128 Bax proteinini hedef alarak apoptozun inhibisyonuna katkı sağlamaktadırlar. Bunların yanı sıra miR-29b, miR-193a ve miR-101 Mcl-1'i, miR-15a/b, miR-16-1, miR-34, miR-143, miR-153, miR-181a/b Bcl-2'yi ve let-7, miR-491 ise Bcl-XL gibi antiapoptotik proteinlerin down regülasyonunu sağlayarak apoptozun oluşumunu desteklerler (122). Başka bir antiapoptotik Bcl-2 aile üyesi, Bcl-W ise miR-133b, miR-15B ve miR-122 tarafından down regüle edilmektedir. PTEN sık sık kanserlerde mutasyona uğramış bir tümör baskılayıcı genidir. miR-17-5p ve miR-19, miR-21 ve miR-221 ve miR-222 gibi miRNA'lar doğrudan PTEN ekspresyonunu down regüle ettiği gösterilmiştir (94). miR-211 ER stres ile indüklenen CHOP ekspresyonunun baskılanmasını sağlayarak apoptoz sürecini olumsuz etkilemektedir (123).

Tümör protein 53, hücre döngüsünü düzenleyen ve genomun gardiyanı olarak tabir edilen bir transkripsiyon faktörüdür (120). p53 tarafından düzenlenen miRNA'lar hücre döngüsü, metabolizma, hücrenin sağ kalımı, anjiyojenez dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde yer alan ve merkezi bileşenlerin ekspresyonunu kontrol ederek, tümör oluşumunun önlenmesine katkıda bulunmaktadır. p53-miRNA ağında tanımlanan genetik ve epigenetik değişikliklerin, tümör oluşumunun başlangıcı ve ilerlemesi için önemli olduğu belirtilmektedir. p53'ün hücre döngüsünde etki ettiği miRNA ve hedef molekülleri Şekil 17 ve hücre canlılığının düzenlenmesine dair etkisi ise Şekil 18'de gösterilmiştir (93).



**Şekil 17.** p53'ün hücre döngüsünde etki ettiği miRNA ve hedef molekülleri (Hermeking'den, 93)



**Şekil 18.** p53'ün hücre canlılığının düzenlenmesine dair etki ettiği miRNA ve hedef molekülleri (Hermeking'den, 93)

MikroRNA'ların mRNA'ları hedef aldığı, antiapoptotik yanında proapoptotik olarak rol oynadığı gösterilmektedir. Antikanser araştırmalarında miRNA'ların hücre çoğalması ve apoptozisdeki rolleri dikkat çekse de biyolojik mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmış değildir (124).

#### 4.7. Sitotoksiste Testleri

Hücre canlılığının, proliferasyonunun ve sitotoksistenin belirlenebilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Sitotoksiste testleri genellikle kolorimetrik ya da lüminometrik ölçüm esasına dayanan yöntemlerdir. Günümüzde çok sayıda örneğin aynı anda hızlı şekilde analizi için bu yöntemler 96 kuyucuklu hücre kültür pleytlerine adapte edilmişlerdir (125).

Canlı hücre sayısını belirlemede en çok tercih edilen klasik yöntem, mikroskop altında sayım için hazırlanmış bir lam (hematositometre) ile ölü-canlı hücre ayırımı sağlayacak olan bir boyanın (tripan blue) kombine kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Hücre solüsyonu tripan blue boyasıyla karıştırılınca canlı hücreler küçük ve yuvarlak halde kalırken, ölü hücreler  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ 'ın işlevsizliği nedeniyle hücre içinde biriken



K<sup>+</sup>'dan dolayı şişkin, büyümüş ve koyu mavi olarak görülürler. Günümüzde elektronik sayıcı ünitelere sahip, özellikle kümeleşmeyen hücreler için tasarlanmış otomatik cihazlar kullanılmaktadır (19).

*In vitro* sitotoksosite testlerinde; hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, hücre zarı bütünlüğü ve hücre metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen dört temel sınıflandırma yöntemi kullanılmaktadır (126). Hücrenin ölümü ve proliferasyonu ile ilgili farklı parametreler kullanan sitotoksosite analizleri geliştirildi. Hücre ölümü için önemli bir parametre hücre zarı bütünlüğüdür ve hasarlı hücreler tarafından salınan sitoplazmik enzim aktivitesi ile ölçülebilir. Laktat dehidrogenaz (LDH), tüm hücrelerde bulunan dengeli bir sitoplazmik enzimdir. LDH yönteminin esası pirüvatın laktata indirgenmesini sağlayan laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Böylece NADH'nin NAD<sup>+</sup>'ya oksidasyonu spektrofotometrik olarak izlenmektedir (125).

Kolorimetrik analizlerin temeli olarak kullanılan bir başka parametre, canlı hücrelerin metabolik aktivitesidir (125). Bunların arasında en yaygın olarak kullanılan MTT yöntemidir. MTT yöntemi ilk kez Mosmann tarafından 1983 yılında tanımlanmış olup hücre canlılığı, proliferasyonu hakkında fikir veren, farklı hücre tiplerine uygulanabilen, hassas ve güvenilir bir kolorimetrik metottur (127). Yöntemin esası canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin kapasitelerine göre sarı renkli suda çözünebilen 3-(4,5-dimetil hidrazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür boyasını suda çözünmeyen koyu mavi formazan kristallerine dönüştürebilmesine dayanmaktadır. Üretilen formazan kristallerinin miktarı, çalışılan hücre serisinin canlılığı ile doğrudan orantılı olmaktadır (128).

Hücrenin metabolik olarak aktif olabilmesinin ön koşulunun ATP olduğu bilinmektedir. Son yıllarda biyoluminesans temelli ATP yöntemi de sitotoksosite çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde ATP ve lusiferin'den gelen ışığın oluşumunu katalize eden bir enzim olan lusiferaz kullanır. Yayılan ışık yoğunluğu doğrudan ATP konsantrasyonuyla ilişkili olup canlı hücre sayısı ile orantılıdır (125). Bu yöntemlerin yanı sıra hücre canlılığı, hücre proliferasyonunun belirlenmesinde flow sitometri tekniği kullanılmaktadır (128).

#### **4.8. Flow Sitometri**

Flow sitometri; akan bir sıvı içerisindeki hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal özelliklerinin ölçüldüğü yöntemdir (129). Flow sitometrinin esasını hücrelerin veya biyolojik partiküllerin boyut, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granüleritesi açısından değerlendirmek oluşturur (130). Flow sitometreler; akış (sıvı) sistemi, lazer optikler, elektronik dedektörler, bilgisayar ve yazılım programları ile ayırma mekanizması (cell sorting) bileşenlerini içerir (129, 131).

Flow sitometri tekniğinde her bir hücre veya partikül sıvının içerisinde bir lazer demetinin önünden geçirilmektedir. Bu sırada saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayınlanan fluoresan ışığı bir araya getirilip, optik filtreler tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülür. Hücreler hakkında elde edilen veriler grafik haline getirilmekte, istatistiksel analiz uygulanmakta ve yorumlanmaktadır (131). Flow sitometrede çeşitli moleküller, hücreler ve parçacıklar, düşük ve 90 derece açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil bakımından ayrılabilir. Hücreler lazer ışını önünden geçerken muhtemel iki olay meydana gelmektedir. İlk olarak ışığın yayılımı meydana gelmektedir. Işık kaynağın paralel olarak yayılan ışınlar hücrenin çapı, lazer ışınına 90 derece açı ile yayılan ışınlar hücrenin granüleritesi ve iç yapısı hakkında fikir vermektedir. İkinci olay örnek önceden florokromlarla boyandığında oluşmaktadır. Florokromlar lazer ışığından enerji absorbe ederler. Böylece onu daha düşük bir enerji ve daha uzun bir dalga boyunda yeniden dışarı verirler. Dışarı verilen ışının miktarı hücrelerde tutulan florokrom miktarıyla orantılıdır (132). Flow sitometri hızlı, yüksek duyarlılıkla analiz yapma imkânı vermektedir (130).

Son yıllarda flow sitometri yöntemi özellikle biyokimya, immünoloji, hematoloji, onkoloji, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, parazitoloji, enfeksiyon, yardımcı üreme teknikleri, patoloji, radyasyon onkolojisi, enfeksiyon hastalıkları, bitki biyolojisi ve deniz biyolojisi alanlarında klinik ve araştırma laboratuvarlarında sıklıkla tercih edilmektedir (129).

##### **4.8.1. Flow Sitometri ile DNA Analizi**

Flow Sitometri ile hücrelerin hangi bölünme fazında ne miktarda hücre bulunduğunu tespit etmek mümkündür. G0/G1 fazında diploit hücreler yer alırken, S

fazındaki hücrelerin DNA içeriği diploit ile tetraploid hücreler arasında olacaktır. M evresi en kısa evre olup bu evredeki DNA miktarı G2 evresi ile aynıdır. G2 ve mitozdaki hücreler ise  $4n$  miktarında DNA taşıdıklarından tetraploid olacaktır. Böylece hücrelerin DNA içeriği hakkında bilgi edinilmektedir. Hücrelerin DNA içeriğinin flow sitometrik analizinde çoğunlukla floresans boyalar kullanılmakta ve bu boya hücrelerin DNA'sına bağlanmaktadır. DNA'ya bağlanan boyanın miktarı her bir hücredeki toplam DNA miktarı ile orantılıdır. Propidyum iyodür, etidyum bromür ve akridin oranj en sık kullanılan DNA boya boyalarıdır (132).

#### **4.9. Apoptoz Tayininde Kullanılan Yöntemler**

Apoptoz, sadece gelişim, hücre popülasyonunun korunması ve yaşlanması gibi hemostatik dengenin korunmasını sağlayan bir mekanizma olmayıp; hasarlı, enfekte veya aşırı strese maruz kalmış hücrelerin eliminasyonu için de oldukça önemli bir süreçtir. Apoptoz birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte önemli rol oynar (133).

Apoptozun nitel ve nicel olarak incelenmesinde: Morfolojik görüntüleme (Işık, floresan, faz kontrast veya elektron mikroskopisi), İmmünohistokimyasal (Anneksin V-FITC, TUNEL, M30 antijen veya kaspaz 3deteksiyonu), Biyokimyasal (DNA-protein bazlı elektroforez veya akım sitometrisi bazlı metotlar), İmmünolojik (ELISA) moleküler biyoloji (Array-bazlı teknikler) gibi tekniklerin ön plana çıktığı görülmektedir. Kullanılacak yöntemlerin seçiminde örnek türü ve deney kurgusunun önem taşıdığı belirtilmektedir (134).

Apoptozun varlığının gösterilmesi amacıyla mikroskopik tekniklere başvurulmasına rağmen, apoptotik cisimcikler makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından ortadan kaldırıldığı için apoptozun sayısal olarak ifade edilmesinde bu yöntemler yetersiz kalmaktadır (135).

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick endlabeling) yöntemi DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler ve hücre kültürü çalışmalarında apoptozisin varlığı bu yöntemle belirlenebilir (136).

Anneksin V, fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilir (133). Analizlerde Annexin V-FITC ve canlılığın tespiti için propidyum iyodür (PI) kombine boya boyaları

kullanılmaktadır. Apoptotik hücreler aneksin V ile boyanıp PI ile boyanmazlarken apoptoz süreci uzadıkça bu hücrelerde de PI alınımı gözlenebilmektedir (137). Apoptozun en önemli aktörlerinden kaspazların aktivitelerinin ortaya konulması da başka bir yaklaşımdır (135).

Western blot metoduyla apoptozise özgü proteinlerin (örn; Bcl-2) eksprese olup olmadıklarının ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn; kaspaz-3) saptanması mümkündür. Moleküllerin mitokondriden çıkıp çıkmadığının (sitokrom c) tespiti de bu metotla belirlenebilir (136).

#### **4.10. Western Blot Yöntemi**

Western blot, kompleks biyolojik karışım içerisinde bulunan proteinin spesifik olarak tespit ve analizi için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (136). Yöntem, bir membran üzerinde hareketsiz kılınmış proteinlere antikorların spesifik bağlanması ve bağlanan antikorun çeşitli tespit yöntemlerinden biriyle antikor: protein kompleksinin oluşturulmasına dayanır (138, 139).

Temelde western blot dört aşamadan oluşur;

1. Protein karışımlarının elektroforezle ayrılması,
2. Proteinlerin membrana (pvdf, nitroselüloz, naylon gibi) transferi,
3. Membranın bloklanması ve ilgilenilen proteine özgü antikorla muamele edilmesi,
4. İlgili proteinin kemilüminesans, floresans veya kolorimetrik yöntemlerle belirlenmesi (139).

Farklı numunelerde protein miktarlarının güvenilir şekilde karşılaştırılmasını sağlamak için kontrol edilmesi gereken iki faktör, elektroforetik ayırmada her kuyucuğa yüklenen toplam protein miktarı ve blotlama prosedüründe aktarımın verimliliğidir (138).

#### **4.11. Real Time-PCR**

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans temelli sinyalin ölçülmesiyle kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir (140). Gerçek zamanlı PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süresi boyunca oluşan ürünün

miktarını gözlenebilmektedir. Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi real-time PCR'yi özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon hedef DNA veya RNA konsantrasyonu ile orantılıdır (141). Amplifikasyon eğrileri üzerinde tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkân reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü floresans işaretli probalar ile sağlanmaktadır. Real time-PCR ile elde edilen veriler mutlak kantitasyon (absolute quantification) veya göreceli kantitasyon (relative quantification) analiz teknikleri ile değerlendirilmektedir (3). Son yıllarda real-time PCR yöntemi moleküler tıp, adli tıp, viroloji, mikrobiyoloji ve biyoteknoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (142).

MikroRNA'ların tespiti için en çok kullanılan yöntemlerden biri realtime qPCR analizidir (143). RT-qPCR'ın çok küçük miktarlarda miRNA'ların tespit edilmesine imkân veren, yüksek duyarlılıkta, doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından en güvenilir yöntem olduğu belirtilmiştir (144).

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7.** Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler

<b>Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler</b>	<b>Marka / Model</b>
Derin dondurucu, -80°	Thermo Electron Corporation
Derin dondurucu, -20°	Altus
Dalga boyu ayarlanabilir mikropleyt okuyucu	VERSA max Molecular Devices
Etüv	Heraeus
Çalkalayıcı	ShelLab/Sheldon S14-2
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
Mikro santrifüj	Thermo IEC Micromax
Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1601
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Membran filtreleri	Sartorius Stedim Minisart
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
İnvert mikroskop	Nikon Eclipse TS100
CO <sub>2</sub> inkübatör	Thermo Forma 381
Standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları	Greiner Cellstar
Santrifüj	Eppendorf 5804
Real-Time PCR Cihazı	Roche Light cycler 480 II
Mikro hacimli spektrofotometre	Thermo Nanodrop 2000
Elektroforez ve Görüntüleme Sistemi	Biorad
Neubauer lamı ve lameli	Marienfeld
Cam malzemeler (beher, erlen, balon joje)	Isolab
Flow sitometri	BD FACSCalibur
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Vorteks	IKA vortex genius 3

**Tablo 7.** (devamı) Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler

<b>Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler</b>	<b>Marka / Model</b>
Steril 96 kuyucuklu hücre kültür pleytleri	Corning ve Nunclon
Çeşitli hacimlerde steril Pipet uçları	Axygen
Termocycler	Techne Genius
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV
Buz makinesi	Scotmann

## 5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları, ürün kodları ve varsa özel saflık dereceleri Tablo 8’de verilmiştir.

**Tablo 8.** Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri ve üretici firmalar

<b>Kullanılan maddeler</b>	<b>Üretici firmalar</b>
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Sigma, 34870
Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Lancaster, 13098
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma, F9252
Gallik asit	Sigma, G7384
Kuersetin dihidrat	Fluka, 83370
Alüminyum nitrat nonahidrat (Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O)	Fluka, 06274
Potasyum asetat (KCH <sub>3</sub> COO)	Merck, K32043020
DMEM besi yeri	Sigma, D6046
EMEM besi yeri	Lonza,12-611Q
Penisilin/Streptomisin	Gibco, 15140-122
PBS tablet	Medicano, 09-2051-100
Tripsin/EDTA çözeltisi	BI, 03-053-1A
Fetal bovine serum (FBS)	Biochrom, S 0115
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, D2650 (steril)
Tripan blue çözeltisi	Sigma, T8154
Hücre siklusu (DNA content) analiz kiti	BD, 340242
FITC-Anneksin V apoptoz kiti	BD Pharmingen, 556547

**Tablo 8.** (devamı) Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri ve üretici firmalar

<b>Kullanılan maddeler</b>	<b>Üretici firmalar</b>
High Pure miRNA Isolation Kit	Roche, 050880576001
RT-PCR reaksiyon ortamı kiti	Roche, 04707494001
cDNA sentez kiti	Roche, 04379012001
[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromür	Sigma, M2128
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum florür (NaF)	Sigma, S7920
Glisin	Sigma, G8898
Sodyum pirofosfat (Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O)	Sigma, 446061347236111
Tris-HCl (C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>3</sub> )	Merck, 648317
Triton X 100	Sigma, 9002-93-1
Tween20	JTBaker, 73-74
p53 Antibody	Cell Signaling, 9282
Bax Antibody	Cell Signaling, 2772
p21 Waf1/Cip1(12D1) Rabbit mAb	Cell Signaling, 2947
Goat anti mouse-HRP	Immun-star, 170-5047
ECL	Bio Rad, 170-5061
miR-34	Tib Molbiol
miR-15a	Tib Molbiol
miR-145	Microsynth
miR-16-5p	Tib Molbiol
miR-21	Tib Molbiol
RNU6	Oligomer

### **5.3. Etanollü Propolis Ekstraktının Hazırlanması**

Trabzon ve çevresinden toplanarak temin edilen (Fanus Gıda tarafından) ve buzdolabında -20 °C’de dondurulmuş olan doğal propolis rendelendi. Propolis örneğinden 0.5 g tartılarak steril falkon tüpe alındı ve son hacim saf etanol ile 20 mL’ye tamamlandı. Karışım iyice vortekslendikten sonra 60 °C’de 150 rpm’de sürekli



çalkalanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında karışım 3000 g'de 10 dakika santrifüjlendi ve sonrasında süpernatant süzgeç kağıdından süzüldü. Süpernatant 0.2 µm'lik steril filtrelerden geçirildi. Hazırlanan etanollü propolis ekstraktı daha sonra kullanılmak üzere alikotlanıp -20°C'de saklandı (5).

#### **5.4. Propolis Ekstraktının Antioksidan İçeriğinin Belirlenmesi**

Propolis ekstraktının antioksidan özellikleri; toplam polifenolik içerik, toplam flavonoid içerik analizleri yapılarak belirlendi.

##### **5.4.1. Toplam Polifenolik İçeriğinin Belirlenmesi**

Propolis ekstraktının toplam polifenol içeriği, modifiye edilmiş Folin Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Metot; fosfotungstik asidin ( $H_3P[W_3O_{10}]_4$ ) bazik çözeltide fosfotungstik mavisine indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Ölçülen absorbansın miktarı, fenolik grupların sayısı ile orantılıdır. Standart olarak gallik asit kullanılmaktadır (145, 146).

##### **Kullanılan Çözeltiler:**

**%20'lik  $Na_2CO_3$  çözeltisi:** 10 g  $Na_2CO_3$  tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

**1:10 Folin-Ciocalteu reaktifi:** 1 ml 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi, 9 ml saf su eklenerek 1:10 oranında seyreltildi. Tayin öncesi hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.

**Standartlar:** 10 mg gallik asit 1 ml saf su ile çözülerek 10000 µg/mL'lik gallik asit standardı oluşturuldu. Ardından 1000 µg/mL'lik ara stok standart hazırlanarak seri dilüsyon ile 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ve 1.5625 µg/mL'lik gallik asit standartları oluşturuldu.

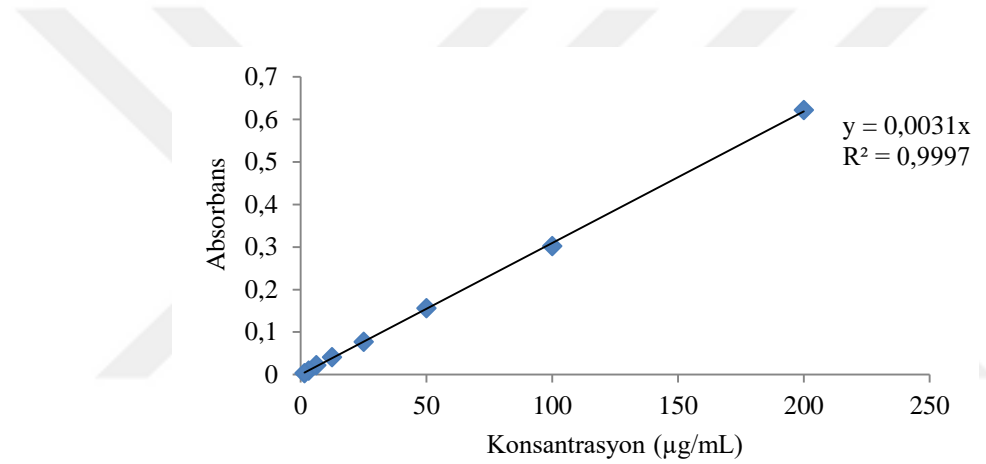
##### **Deneyin Yapılışı:**

Propolis ekstraktı 1:50 oranında seyreltilip, Tablo 9'daki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikroplyette yapıldı. Sonuçlar gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak µg/mL olarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler üç kez tekrarlandı (n=3).

**Tablo 9.** Propolis ekstraktının toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi

	Kör (µL)	Örnek (µL)	Standart (µL)
<b>Etanol</b>	12.5	-	-
<b>Ekstrakt</b>	-	12.5	-
<b>Standart</b>	-	-	12.5
<b>1:10 Folin reaktifi</b>	62.5	62.5	62.5
<b>%20'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	125	125	125

Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dk. inkübasyon  
700 nm' de mikropleyt okuyucuda absorbans ölçümü.



**Şekil 19.** Toplam polifenol içerik tayini için kullanılan gallik asit standart grafiği

#### 5.4.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Ekstraktın toplam flavonoid içeriği, alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlendi. Metodun prensibi, AlCl<sub>3</sub>'ün flavon ve flavonollerin C-4 keto grubu, C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile asitte kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanmaktadır. Flavonoid miktarı ölçülen absorbansın miktarıyla orantılıdır. Standart olarak kuersetin kullanılmaktadır (146, 147).

#### Kullanılan Çözeltiler:

**%80'lik Etanol çözeltisi:** 80 mL'lik saf etanolün hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**%10'luk Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> çözeltisi:** 2.5 g Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlandı.

**1 M KCH<sub>3</sub>COO çözeltisi:** 2.454 g KCH<sub>3</sub>COO tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlandı.

**Standartlar:** 10 mg kuersetin 800 µL saf etanol ile çözülerek hacmi saf su ile 1000 µL'ye tamamlandı ve 10000 µg/mL'lik kuersetin standardı oluşturuldu. Bu ana stoktan 1000 µg/mL'lik ara stok standart hazırlanıp, %80'lik etanol ile seri dilüsyonla 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ve 1.5625 µg/mL'lik kuersetin standartları elde edildi.

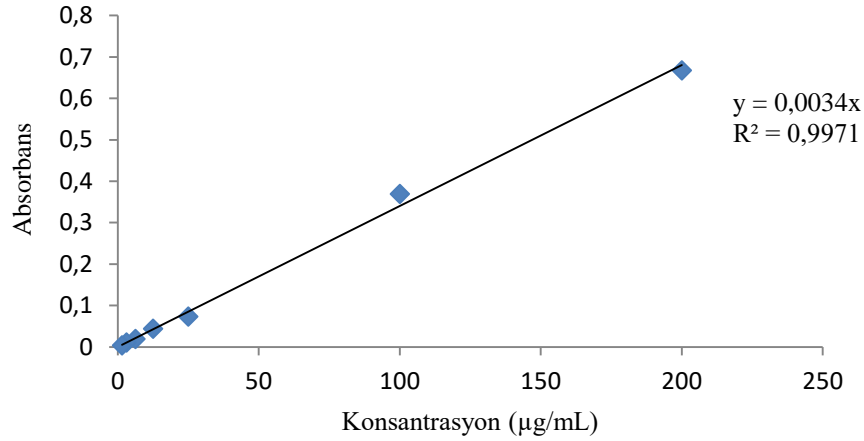
### **Deneyin Yapılışı:**

Propolis ekstraktı 1:20 oranında seyreltildi ve Tablo 10'daki pipetlemeler 96 kuyucuklu mikroplyette yapıldı. Sonuçlar kuersetin standart grafiğinden yararlanılarak µg/ml olarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler üç kez tekrarlandı (n=3).

**Tablo 10.** Propolis ekstraktının toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

	<b>Kör (µL)</b>	<b>Örnek (µL)</b>	<b>Standart (µL)</b>
<b>Etanol</b>	20	-	-
<b>Ekstrakt</b>	-	20	-
<b>Standart</b>	-	-	20
<b>%80'lik Etanol</b>	172	172	172
<b>%10'luk</b>	4	4	4
<b>Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>			
<b>1 M KCH<sub>3</sub>COO</b>	4	4	4

Oda sıcaklığında, karanlıkta 40 dk. inkübasyon  
415 nm' de mikroplyet okuyucuda absorbans ölçümü.



**Şekil 20.** Toplam flavonoid içerik tayini için kuersetin standart grafiği

## 5.5. Hücre Kültürü

Bütün hücre kültürü çalışmaları KTÜ Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında, steril ortamda gerçekleştirildi. Çalışma öncesi kabin ve kullanılacak malzemeler, çalışma sonrasında ise kabin %70'lik etanol ile silindi. Çalışmalar sonunda kabin ve hücre kültürü odası UV ışık ile tekrar kullanıma hazır halde steril edildi.

### 5.5.1. Meme Kanseri ve Fibroblast Hücre Serilerinin Eldesi ve Kültürü

Çalışmada; ATCC (American Type Culture Colection) firmasından temin edilen MCF-7 (ATCC, HTB-22) ve sünnet derisi kökenli fibroblast (ATCC, CRL-2522) hücreleri kullanıldı.

**MCF-7 hücre serisi için besiyeri çözeltisi:** 442.5 mL DMEM üzerine 50 ml FBS ve 7.5 mL penisilin-streptomisin eklendi. 50 ml'lik falkon tüplere bölünerek +4 °C'de saklandı.

**Fibroblast hücreleri için besiyeri çözeltisi:** 442.5 mL EMEM besiyeri üzerine 50 mL FBS ve 7.5 mL penisilin-streptomisin eklendi. 50 mL'lik falkon tüplere bölünerek +4 °C'de saklandı.

**0.01M PBS (pH 7.4):** 10 adet PBS tableti içerisinde yaklaşık 900 mL saf su bulunan beherde çözüldü. Çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlanıp, son hacmi 1 L'ye tamamlanarak hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere otoklavlandı.

### **Hücre Serilerinin Eldesi ve Kültür Aşamaları;**

1. Üretici firmadan temin edilen hücreler belirtilen şekilde işleme tabi tutuldu: Kriyovial içinde donmuş halde bulunan hücreler kuru buzdan çıkarıldıktan sonra 37°C su banyosunda 5 dakika bekletilerek tamamen çözünmesi sağlandı.
2. Fibroblast hücreleri (1 mL) 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve son hacim L-Glutaminli, %10 FBS ve %1 penisilin+streptomisin içeren EMEM besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı. MCF-7 hücreleri (1 mL) 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve son hacim L-Glutaminli, %10 FBS ve %1 penisilin+streptomisin içeren DMEM besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı.
3. Hücre süspansiyonları 130 g'de 6 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrasında süpernatant kısımları uzaklaştırıldı, tüplere 1'er mL taze besiyeri ilave edildi ve hafif pipetaj yapılarak hücre çökeleklerinin çözülmesi sağlandı. Çözülen hücreler T-75'lik flaslara ekildi ve üzerine fibroblast için 15 mL EMEM, MCF-7 için ise 15 mL DMEM besiyeri ilave edildi. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> ortamında, 37 °C' de, inkübatörde çoğaltıldı.

### **5.5.2. Hücrelerin Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması**

Hücreler flask yüzeyinin %70-80'lik kısmını kapladıktan sonra hücre pasajlaması yapıldı.

1. İlk olarak flaslardaki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. Flasklar 8'er mL PBS ile yıkandıktan sonra her bir flaska 4 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 3 dakika inkübatörde bekletildi.
3. İnkübasyon sonrası 9 mL %10 FBS içeren hücre için uygun olan DMEM veya EMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı. Hücre süspansiyonu 130 g'de 6 dakika santrifüjlendi.
4. Süpernatant kısımları 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücre süspansiyonlarından 10 µL'si 0.5 mL hacimli kapaklı tüpe alınarak 10 µL tripan blue ile karıştırıldı ve karışım 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
5. Pipetaj yapılarak karışımdan 10 µL alındı ve Neubauer hematositometre lamına aktarıldı. İnvirt mikroskop ile incelenen hematositometre lamı üzerinde 16'ya bölünmüş dört ayrı kare olduğu görülmektedir. Çapraz iki kare içerisinde

bulunan canlı hücreler sayıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı; "sayılan hücre sayısı x seyreltme oranı x 10<sup>4</sup>" formülü kullanılarak hesaplandı (19, 148).

6. Hücre sayımı yapıldıktan sonra, içerisinde 15 mL besiyeri bulunan 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara 2000-10000 hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde tekrar hücre ekimi yapıldı. Böylece kültürlenme sürecine devam edildi.

### **5.6. Hücrelerin Canlılık Testi, MTT Analizi**

Propolis ekstraktının içeriğinde var olduğu daha önceden gösterilen kuersetinin (146) ve meme kanseri tedavisinde kullanılan ticari bir antikanser ilaç olan paklitakselin (149) MCF-7 ve fibroblast hücre serilerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde MTT yöntemi (127) modifiye edilerek kullanıldı. Propolis ekstraktının MCF-7 kanser hücre serisi üzerindeki muhtemel sitotoksik etkisinin seçici olduğunun belirlenebilmesi için, sitotoksikite çalışmaları paralel olarak sağlıklı insan fibroblast hücreleri üzerinde de gerçekleştirildi.

#### **Kullanılan Çözeltiler:**

**MTT çözeltisi (5 mg/mL):** 1 g MTT boyası 6 mL DMSO ile çözüldükten sonra steril PBS ile hacmi 200 ml' ye tamamlandı. MTT boyası tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi. Çözelti 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek 1'er mL (5 mg/mL) halinde alikotlanıp, deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

**Paklitaksel çözeltisi:** 50 mg paklitaksel tartıldı ve 1 mL etanol ilavesiyle iyice vortekslenip çözülerek 50000 µg/mL'lik çalışma stoğu hazırlandı. Paklitaksel çözeltisi deney günü hazırlandı ve taze halde kullanıldı.

**Kuersetin çözeltisi:** 10 mg kuersetin tartıldı ve 1 mL DMSO ilavesiyle iyice vortekslenip çözülerek 10000 µg/mL'lik çalışma stoğu hazırlandı. Kuersetin çözeltisi deney günü hazırlandı ve taze halde kullanıldı.

#### **Analiz aşamaları sırasıyla;**

1. Hücre kültür pleytlerinin her kuyucuğuna 5000 hücre olacak şekilde 200 µL besiyeri içinde MCF-7 ve fibroblast hücreleri ekildi (150, 151).
2. Başlangıç anından 24 saat sonra; pleytler inkübatörden alındı, besiyeri içerikleri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 200'er µL taze besiyeri eklendi.

3. MCF-7 hücre serisi için taze besiyerleri üzerine propolis ekstraktı için son konsantrasyonları 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL, kuersetin için 0.5, 1, 2.5, 10, 25, 50, 100 µg/mL ve paklitaksel için 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 25, 50 µg/mL olacak şekilde uygun hacimlerde ilave edilip, hücrelerin bu maddeler ile 37 °C'de 72 saat inkübasyonu sağlandı.
4. Fibroblast serisi için taze besiyerleri üzerine propolis ekstraktı için son konsantrasyonları 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL, kuersetin için 0.5, 1, 2.5, 10, 25, 50, 100 µg/mL ve paklitaksel için 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 25, 50 µg/mL olacak şekilde uygun hacimlerde ilave edilip, hücrelerin bu maddeler ile 37 °C'de 72 saat inkübasyonu sağlandı. Her bir hücre serisi için kullanılan maddelerin tüm konsantrasyonları 3'er kuyucuk olacak şekilde planlandı (n=3).
5. İnkübasyon sonunda pleyt içerikleri uzaklaştırıldı ve bütün kuyucuklara 190'ar µL taze besiyeri eklendi. Her bir kuyucuğa son konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak 10'ar µL MTT boyası ilave edildi. Pleytler 37 °C'de 3 saat inkübe edildi.
6. Süre sonunda pleyt içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 200'er µL DMSO eklendi ve pleytler formazan kristallerin çözünmesi için 90 dakika çalkalayıcıda bekletildi.
7. Kuyucuklardaki kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği invert mikroskop altında kontrol edildi. Her bir kuyucukta oluşan mor rengin absorbansı mikropleyt okuyucuda 570 nm dalga boyunda okundu. Her örneğin konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin, herhangi bir muamele görmeyen kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak her bir maddenin her bir konsantrasyonu için % hücre canlılığı hesaplandı.

### **5.7. Hücre Döngüsü ve Apoptozun Flow Sitometrik Olarak Belirlenmesi**

Flow sitometri, çeşitli hücrelerin bir süspansiyon halinde akış kanalı boyunca tek tek geçmesi ve bu sırada hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre sınıflandırılması esasına dayanan bir tekniktir (19). MCF-7 hücre serisinde seçici toksisite gösterdiği belirlenen propolis ekstraktının bu etkisinin hangi ana yollar üzerinden gerçekleştiğini ortaya koyabilmek adına flow sitometrik anneksin-V (apoptoz), DNA içerik (hücre döngüsü) analizleri ticari kitler kullanılarak KTÜ Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan flow sitometri cihazı kullanılarak yapıldı.

### 5.7.1. Hücre Döngüsü Analizi

#### Reaktiflerin Hazırlanması

Üretici firmadan gerekli koşullar altında temin edilen ve -20 °C’de saklanan tüm kit bileşenlerinin çalışma öncesi oda sıcaklığında bekletilerek çözünmeleri sağlandı. Tüm reaktifler üretici firma tarafından kullanıma hazır şekilde tasarlanmıştı.

#### Hücre döngüsü analiz aşamaları sırasıyla;

1. MCF-7 hücreleri 750 000 hücre/flask olacak şekilde T-25 flasklara ekildi ve son hacim zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile 4’er mL’ ye tamamlandı.
2. Hücrelerin flasklara yapışması için 24 saat beklendi. 24 saat sonrasında flask içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir flaska 4’er mL taze DMEM besi yeri ilave edildi.
3. Deney grupları sitotoksite verileri de göz önüne alınarak flasklardaki son konsantrasyonlar 25, 50, 75, 100 µg/mL olacak şekilde propolis ekstraktı ilave edilip flasklar 72 saat inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası flask içerikleri uzaklaştırıldı ve flasklar 5’er mL PBS ile yıkandı. Flasklara 1’er mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 5 dakika inkübatörde bekletildi.
5. Süre sonunda 4’er mL zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile hücreler falkon tüpler içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonları 300 g’de 5 dakika santrifüjlendi.
6. Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1’er mL yıkama tamponu (DMSO içinde çözülmüş sükroz-sodyum sitrat) ile pipetajlanarak süspanse hale getirildi.
7. Karışım 300 g’de 5 dakika santrifüjlendi ve bu yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı.
8. Üçüncü yıkama sonrası pelletler 1’er mL yıkama tamponu ile çözüldü.
9. Hücre süspansiyonlarından 10’ar µL alınarak 10’ar µL tripan blue ile karıştırılıp Neubauer lamında hücre sayımları yapıldı. Her tüpteki hücre sayısı 10<sup>6</sup> olacak şekilde ayarlandı. Hücre sayıları eşitlenen tüpler 400 g’de 5 dakika santrifüj edildi.



10. Tüm süpernatantlar dikkatlice uzaklaştırıldı. Her tüpe 250'şer  $\mu\text{L}$  A (spermin tetrahidroklorür içinde tripsin içerendeterjan tamponu) solüsyonundan ilave edilerek tüpler hafifçe alt üst edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
11. Süre sonunda her tüpe 200'er  $\mu\text{L}$  B (ribonükleaz A and tripsin inhibitörü içeren spermin tamponu) solüsyonundan ilave edilerek tüpler hafifçe alt üst edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
12. İnkübasyon sonrası tüpler buz üzerine alındı. Her tüpe 200'er  $\mu\text{L}$  C (propidyum iyodür içeren spermin tamponu) solüsyonundan ilave edilerek tüpler hafifçe alt üst edildi ve 10 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin hücre döngüsü analizleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan flow sitometri cihazında gerçekleştirildi, her tüp için 10000 hücre saydırıldı ve her deneme 3 kez tekrarlandı (n=3). Sonuçlar % hücre olarak verildi.

### **5.7.2. Anneksin V Analizi**

#### **Reaktiflerin Hazırlanması**

Anneksin V Analiz kit bileşenlerinin deney öncesi oda sıcaklığında bekletilerek çözünmeleri sağlandı. 10X Anneksin V bağlama tamponu [0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>] distile su ile 1:9 oranında seyreltilerek 1X Anneksin V çalışma taponu hazırlandı. Diğer reaktifler üretici firma tarafından kullanıma hazır şekilde tasarlanmıştır.

#### **Anneksin V analiz aşamaları sırasıyla;**

1. MCF-7 hücreleri 750 000 hücre/flask olacak şekilde T-25 flasklara ekildi ve son hacim zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile 4'er mL' ye tamamlandı.
2. Hücrelerin flasklara yapışması için 24 saat beklendi. 24 saat sonrasında flask içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir flaska 4'er mL taze DMEM besi yeri ilave edildi.
3. Deney grupları sitotoksite verileri de göz önüne alınarak flasklardaki son konsantrasyonlar 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olacak şekilde propolis ekstraktı ilave edilip flasklar 72 saat inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyon sonrası flask içerikleri uzaklaştırıldı ve flasklar 5'er mL PBS ile yıkandı. Flasklara 2'er mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 3 dakika inkübatörde bekletildi.
5. Süre sonunda 4'er mL zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile hücreler falkon tüpler içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonları 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
6. Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1'er mL soğuk PBS ile pipetajlanarak süspansiyon hale getirildi ve tüpler içindeki hücre süspansiyonları 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
7. Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1'er mL 1X Anneksin V çalışma taponu ile pipetajlanarak süspansiyon hale getirildi.
8. Hücre süspansiyonlarından 10'ar µL alınarak 10'ar µL tripan blue ile karıştırılıp Neubauer lamında hücre sayımları yapıldı.
9. Her tüpteki hücre sayısı 100 µL de  $10^5$  olacak şekilde ayarlandı. 100'er µL hücre süspansiyonları üzerine 5'er µL FITC ve 5'er µL PI ilave edilerek elde edilen karışımlar yavaşça vortekslendi, oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonunda her bir tüpe 400'er µL 1X Anneksin bağlama tamponu ilave edildi. Hücrelerin Anneksin V analizleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan flow sitometri cihazında gerçekleştirildi, her tüp için 5000 hücre saydırıldı ve her deneme 3 kez tekrarlandı (n=3).

### 5.8. Western Blot Analizi

Gen ekspresyon çalışmalarında gen ifadesinin protein düzeylerinin belirlenmesi için western blot analizi tercih edilmektedir (137, 152).

#### Kullanılan Çözeltiler:

**Liziz çözeltisi:** Son konsantrasyonları, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, %0.5 Triton X-100, 1 mM EDTA, 1x mM NaPPi, 1x PI, 1x NaVan, 1x NaF, 1x PMSF, dH<sub>2</sub>O olacak şekilde solüsyonlar bir araya getirildi.

**100X Sodyum orthovanadat (200 mM) (NaVan) çözeltisi:** 3.68 g  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  tartıldı ve 90 mL steril çift distile su içinde çözüldü. Sarı renge dönüşen solüsyon renksiz olana kadar kaynatıldı ve oda sıcaklığına gelene kadar soğutulduktan sonra pH 10.0'a ayarlandı. Hacim 100 ml'ye tamamlandı.

**50X Sodyum florür (1 M) (NaF) çözeltisi:** 4.2 g NaF tartıldı ve steril çift distile su içinde çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

**20X Sodyum pirofosfat (100 mM) (NaPPi) çözeltisi:** 4.44 g NaPPi tartılıp steril çift distile su içinde çözüldü ve hacmi 100 mL'ye tamamlanıp 4 °C'de saklandı.

**100X Fenilmetansülfonil fluorür (PMSF) proteaz inhibitör (100 mM) çözeltisi:** 0.174 g PMSF tartılıp saf etanol içinde çözümlenerek hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

**%10 Sodyum dodesil sulfat (SDS) çözeltisi:** 10 g SDS tartılıp, 100 mL deiyonize distile suda çözümlenerek oda sıcaklığında saklandı.

**%10 Amonyum persülfat (APS) çözeltisi:** 100 mg APS tartılıp, 1 mL deiyonize suda çözüldü. Çözelti 4 °C'de saklandı.

**%40 Akrilamid\Bisakrilamid:** Biorad tarafından temin edilen solüsyon kullanıldı ve 4°C 'de saklandı.

**1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (Ayırma jel tamponu):** 36.33 g Tris tartılıp, 180 mL deiyonize suda çözüldü, HCl ile pH 8.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 200 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

**0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (Yükleme jel tamponu):** 6.057 g Tris tartılıp, 90 mL deiyonize distile suda çözüldü, HCl ile pH 6.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

**10X Tris-Glisin tamponu:** 30.3 g Tris baz ve 144 g glisin tartılıp deiyonize suda çözümlenerek hacmi 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

**SDS-PAGE Yürütme tamponu (1X):** 10X Tris-Glisin tamponu 1X olacak şekilde seyreltildi. İçerisine 10 mL %10'luk SDS eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlandı.

**SDS-PAGE Transfer tamponu (10X) :** 10X Tris-Glisin tamponu 1X olacak şekilde hazırlandı. İçerisine 200 mL metanol eklenerek son hacim 1 L'ye tamamlandı.

**TBS (10X):** 31.52 g Tris HCl ve 80 g NaCl tartılıp, deiyonize su ile çözülerek pH 7.6'ya ayarlandı ve son hacim 1L'ye tamamlandı.

**TBST:** 100 mL 10X TBS ve 1 mL Tween-20, 1 L deiyonize suda seyreltildi.

**Bloklama çözeltisi (%5 BSA-TBST/Süt Tozu-TBST):** 5 g BSA veya süt tozu 100 mL 1X TBST içerisinde çözülerek 4 °C'de saklandı.

**10X PBS stok çözeltisi:** 1.37 M NaCl, 26.8 mM KCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 800 mL distile su içerisinde çözüldü ve 1M HCl ile pH: 7.4'e ayarlanarak son hacim 1L'ye tamamlandı.

**%0.05 Tween 20 (PBS) çözeltisi:** 10 mL 10 x PBS'ten ve 25 µL %20'lik Tween 20 solüsyonundan alınarak toplam hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

**5X SDS-PAGE Yükleme tamponu:** Toplam hacim 10 mL'de final konsantrasyonları 0.25 M Tris-CI pH: 6.8, %10 SDS %50 gliserol, %0.01 bromofenolblue olacak şekilde hazırlandı. -20 °C'de saklandı. Kullanmadan önce final konsantrasyonu 0.5 M olacak şekilde DTT eklendi.

**Primer Antikor:** Bloklama tamponu ile primer antikor için üretici firmanın tavsiye ettiği oranda seyreltilerek hazırlandı.

**Sekonder Antikor:** Bloklama tamponu ile sekonder antikor için tavsiye edilen oranlarda seyreltilerek hazırlandı.

### 5.8.1. Hücrelerden Protein lizat Eldesi

1. MCF-7 hücreleri 750 000 hücre/flask olacak şekilde T-25 flasklara ekildi ve son hacim zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile 4'er mL'ye tamamlandı.
2. Hücrelerin flasklara yapışması için 24 saat beklendi. 24 saat sonrasında flask içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir flaska 4'er mL taze DMEM besi yeri ilave edildi.
3. Deney grupları sitotoksite verileri de göz önüne alınarak belirlendi. Deney gruplarına ait flasklara son konsantrasyonlar 25, 50, 75 ve 100 µg/mL olacak şekilde propolis ekstraktı ilave edilip flasklar 72 saat inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası flask içerikleri uzaklaştırıldı ve flasklar 5'er mL PBS ile yıkandı. Flasklara 1'er mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 5 dakika

inkübatörde bekletildi. Süre sonunda 4'er mL zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile hücreler falkon tüpler içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonları 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.

5. Santrifüj edilerek hücrelerin pellet halini alan hücreler 4°C'de bekletilen soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve hücre sayımı yapılarak her konsantrasyon için 250 000 hücre kullanıldı.
6. Ependorfa alınan hücreler için 200 µL lizis solüsyonu eklendi Pelletin pipetajlanarak homojen hale gelmesi sağlandı ve buz üzerinde 30 dk. çalkalayıcıda inkübe edildi.
7. Hücre pelletleri daha sonra sonike (5 sn sonike (amplitude %45, 20kHz), 20 sn ara, 4 tur) edildi.
8. Sonikasyon sonrası hücreler 4°C'de 13.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant temiz ependorf tüpe aktarıldıktan sonra analiz edilmek üzere -20 °C' ye kaldırıldı. Tüm solüsyonlar ve prosedür buz üzerinde gerçekleştirildi.

## **5.8.2. SDS-PAGE Jellerinin Hazırlanması**

### **5.8.2.1. SDS-PAGE Jel Elektroforez Camlarının Hazırlanması**

Camlar distile su ile yıkandı ve %70'lik etil alkol ile temizlendi. Temizlenen camlar jel standına yerleştirildi.

### **5.8.2.2. Ayırma Jelinin Hazırlanması**

p53 (53 kDa), p21 (21 kDa) ve Bax (20 kDa) moleküler ağırlığında olduklarından, her dört proteinin aynı jelde görüntülenebilmesi için ayırma jeli %12 olarak belirlendi.

Uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama standına yerleştirildi. SDS-PAGE jeli için gereken çözeltiler Tablo 11'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Ayırma jeli kısa camın yaklaşık 1 cm altına kadar döküldükten sonra ayırma jelinin hava ile temasının engellenmesi için 1 mL izopropanol eklendi.

**Tablo 11.** Ayrırma jeli içeriği

<b>Malzemeler</b>	<b>%12</b>
ddH <sub>2</sub> O	2.17 mL
40% Akrilamid karışımı	1.5 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 mL
10% SDS	50 µL
10% APS	50 µL
TEMED	5 µL
<b>Toplam</b>	<b>5 mL</b>

Taze hazırlanmalıdır.

### 5.8.2.3.Yükleme Jelinin Hazırlanması

Ayrırma jeli polimerleştikten sonra (45 dk), jelin üzerindeki izopropanol dökülerek uzaklaştırıldı ve saf suyla yıkandı. Tablo 12’de belirtildiği şekilde hazırlanan yükleme jeli camlar arasında kalan 1 cm’lik boşluğa aktarıldı ve 15 kuyucuklu tarak camlar arasına yerleştirildi. Polimerizasyon için 45 dakika beklenildi. Hazırlanan jeller kullanılmak üzere +4 °C’de saklandı.

**Tablo 12.** Yükleme jeli içeriği

<b>Malzemeler</b>	<b>%5</b>
ddH <sub>2</sub> O	3.08 mL
Acrylamid (40% acrylamid mix)	0.56 mL
1.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 mL
10% SDS	50 µL
10% APS	50 µL
TEMED	3µL
<b>Toplam</b>	<b>5 mL</b>

Taze hazırlanmalıdır.

### 5.8.3. Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi

1. Her bir konsantrasyondaki protein lizatı üzerine (4:1) yükleme boyası (5x) eklenip, yükleme solüsyonunun son konsantrasyonunun 1X olması sağlandı.

2. Örnek-yükleme solüsyonu karışımı 99°C'de 5 dakika kaynatıldı (Denatürasyon). Örnekler 1000 rpm 1dk santrifüj edildi.
3. İlk kuyucuğa 1 µL protein markırı ve sonrasında 20 µL örnek olacak şekilde yükleme yapıldı (BioRad 15 kuyu için).
4. Jel ilk olarak 70 V'da 15 dk, sonra 100 V'da 100 dk yürütüldü.

#### **5.8.4. Western Blotlama (Islak Blotlama)**

1. SDS-PAGE jelinin membrana transferi için spatula yardımı ile camlar birbirinden yavaş ve dikkatlice ayrıldı ve jelin artık kısımları (yükleme jeli, jelin kenar kısımları gibi) spatula ile kesilip atıldı.
2. Jel blotlama öncesinde dengelenmesi için transfer tamponuna alındı. Bu esnada, jelle aynı büyüklükte PVDF membranı kesilerek soğutulmuş metanolde aktive edildi (aktivasyon süresi 3-5 saniye) ve sonrasında transfer tamponuna alınarak dengelendi.
3. Blotlama kasetinin siyah (anot) yüzüne önceden transfer tamponunda ıslatılmış bir adet sünger yatak ve iki adet ince 3 MM Whatman kâğıdı yerleştirildi.
4. Jel hava kabarcığı kalmayacak kâğıdın üzerine şekilde yerleştirildi. Jelin üzerine dengelenmiş PVDF membranı yerleştirildi.
5. Membranın üstüne 2 adet ince 3MM Whatman kâğıdı ve transfer tamponunda ıslatılmış sünger yerleştirilerek sandviç kaseti oluşturuldu.
6. Kaset transfer tamponu içeren tanka anot (siyah) ve katot (kırmızı) tarafta olacak şekilde yerleştirildi. Transfer işlemi 100 Voltta 1saat (500 mA, 150W) akım verilerek gerçekleştirildi. Transfer esnasında tank magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı.
7. Transfer sonrasında membran kasetten çıkarıldı, transferin olduğu taraf işaretlendi, bloklama tamponu eklenerek 1saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı.
8. Bloklama solüsyonu primer antikör dilüsyonları ve inkübasyon zamanları antikörün ürün kataloğunda yer alan öneriler doğrultusunda hazırlandı.
9. Primer antikora konulan membran orbital karıştırıcıda üzerinde 4°C'de gece boyu orbital karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı.

10. Birincil antikör inkübasyonundan sonra membran 6 defa 5'ar dakika TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkandı.
11. Daha sonra membran, birincil antikora uygun blok solüsyonu ile uygun dilüsyonda hazırlanmış ikincil antikörle (1:8000) çalkalayıcı üzerinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
12. Bu inkübasyondan sonra membran tekrar 6 defa 5'ar dakika 1X TBST içerisinde çalkalanarak yıkandı. BioRad Chemidoc Görüntüleme Cihazı son yıkama esnasında açılarak soğuması sağlandı.
13. Son yıkamadan sonra membran pens ile kenarından tutularak bir kurulama kâğıdı üzerinde kenarından değdirilerek kuruması sağlandı ve temiz bir kaba aktarıldı. Işımayı saptamak için 0.5 mL ECL solüsyonu (BioRad ECL bileşenleri 1:1 oranında karıştırıldı) ile muamele edildi (3 dk).
14. BioRad Chemidoc Görüntüleme Cihazı yardımı ile membran görüntülendi ve analiz edildi.

### **5.9. miRNA Ekspresyon Seviyelerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi**

MikroRNA ekspresyon analizi gerçek zamanlı kantitatif (RT-qPCR) yöntemi, gerçekleştirildi (153).

1. T-25 flasklara 300 000 hücre/flask olacak şekilde MCF-7 hücreleri ekildi, son hacim zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile 4'er mL' ye tamamlandı.
2. Hücrelerin flasklara yapışması için 24 saat beklendi. 24 saat sonrasında flask içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir flaska 4'er mL taze DMEM besi yeri ilave edildi.
3. Deney grupları sitotoksite verileri de göz önüne alınarak belirlendi. Deney gruplarına ait flasklara son konsantrasyonlar 25, 50, 75 ve 100 µg/mL olacak şekilde etanollü propolis ekstraktı ilave edilip flasklar 72 saat inkübasyona bırakıldı.
4. Süre sonunda hücreler flasklardan tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı. 130 g'de 6 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısımlar dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp pellet kısımları PBS yıkandı ve miRNA izolasyon işlemleri başlatıldı.



### 5.9.1. miRNA İzolasyonu

Etanollü propolis ekstratıyla muamele edilen hücrelerden miRNA izolasyonu kullanılan ticari kitin yönlendirmeleri doğrultusunda aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

1. 150'er  $\mu\text{L}$  %20 binding tamponu ile çözülen hücre pelletleri pipet yardımıyla iyice homojenize edildi.
2. Homojenize edilen örnekler 15000g'de 2dk santrifüj edildi ve süpernatant kısımları yeni steril bir tüpe aktarıldı.
3. Her bir hücre lizatından 150'er  $\mu\text{L}$  alındı ve üzerlerine 312'şer  $\mu\text{L}$  binding tamponu ilave edildi.
4. Toplama tüplerine filtreler yerleştirildi ve 462'şer  $\mu\text{L}$  hacimdeki karışımlar filtrelere transfer edilerek 13 000 g'de 45 saniye santrifüjlendi.
5. Toplama tüplerindeki sıvı kısımlar yeni steril bir tüpe alındı ve üzerine 200'er  $\mu\text{L}$  binding enhancer tamponu ilave edildi.
6. Toplama tüplerine yeni filtreler yerleştirildi karışımlar filtrelere transfer edilerek 13 000 g'de 30 saniye santrifüjlendi.
7. Toplama tüplerindeki sıvılar uzaklaştırılarak filtreler tekrar tüplere yerleştirildi. Filtrelere 500'er  $\mu\text{L}$  yıkama tamponu ilave edildi ve tüpler 13 000 g'de 30 saniye santrifüjlendi.
8. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırılarak filtreler tekrar tüplere yerleştirildi. Filtrelere 300'er  $\mu\text{L}$  yıkama tamponu ilave edildi ve tüpler 13 000 g'de 30 saniye santrifüjlendi.
9. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırılarak filtreler tekrar tüplere yerleştirildi ve 13 000 g'de 60 saniye santrifüjlendi.
10. Toplama tüplerindeki sıvı uzaklaştırıldı. Filtreler dikkatli bir şekilde toplama tüplerinden çıkarılarak yeni steril tüplere aktarıldı. Her bir filtre üzerine 75'er  $\mu\text{L}$  elüsyon tamponu ilave edildi ve tüpler 13 000 g'de 60 saniye santrifüjlendi.
11. Filtrelerden tüplere geçen miRNA örneklerinin miktarları ve saflık dereceleri spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra cDNA dönüşümü yapılabildi kadar  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 5.10.2. miRNA Örneklerinden cDNA Sentezi

İzole edilen miRNA örneklerinden cDNA eldesi ticari kitin yönlendirmeleri doğrultusunda gerçekleştirildi (153).

**Tablo 13.** cDNA sentezi için kullanılan primer dizileri

Gen	Primer	Primer Dizisi
miR-34	RT primeri	5'-CGACTCAGCAAGGTTCCGAAGTAACAGGCATGCTGAGTCGTCTACAACCAGCTA-3'
miR-15a	RT primeri	5'-CGACTCAGCAAGGTTCCGAAGTAACAGGCATGCTGAGTCGTCTACAAAACCATT-3'
miR-16-5p	RT primeri	5'-CGACTCAGCAAGGTTCCGAAGTAACAGGCATGCTGAGTCGTCTCGCCAATATTTA-3'
miR-145	RT primeri	5'-CGACTCAGCAAGGTTCCGAAGTAACAGGCATGCTGAGTCGTCTAGGGATTCT-3'
miR-21	RT primeri	5'-CGCCTCTCATGCTCACGAATTCCGAGAGGCGTCAACATCAGT-3'
RNAU6	RT primeri	5'-TAAAAATATGGAACGCTTCACGAATTTGCGTGTCAB-3'

1. -80 °C'de saklanan miRNA örnekleri oda sıcaklığında erimeleri için bekletildi.
2. Her mikroRNA için 1.5 mL hacimli steril tüp içerisinde gerekli reaksiyon ortamı Tablo 14'de verilen hacimler kullanılarak hazırlandı. Her bir miRNA'nın cDNA sentezi için RT primerleri kullanıldı. Kullanılan primer dizileri Tablo 13'de verildi.
3. Hazırlanan karışım cDNA elde edilecek her bir örnek için önceden hazırlanmış 250 µL hacimli tüplere her birinde 10'ar µL olacak şekilde dağıtıldı (Tablo 14). Dağıtılan karışımlar üzerine de her bir deney grubu için 10'ar µL miRNA örneklerinden ilave edildi.

**Tablo 14.** miRNA örneklerinden cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri

Reaktifler	Bir örnek için (µL)
RT primer (20µM)	0.5
Transkriptör reaksiyon tamponu	4
RNase inhibitörü	0.5
dNTP karışımı	2
Reverse Transkriptaz	0.5
ddH <sub>2</sub> O	2.5

PCR cihazı;10 dakika 25 °C 60 dakika 50 °C 5 dakika 85 °C olacak şekilde ayarlandı ve cDNA sentezi işlemi başlatıldı. Süre sonunda sentezlenen cDNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü ve RT-PCR aşamasında kullanılmak üzere -80 °C’de saklandı.

### 5.10.3. Real Time - PCR Protokolü

Gen ekspresyon çalışmaları için ölçülmek istenen miRNA’lar için spesifik olarak üretilen primer dizileri ve probalar (Tablo 15) kullanılarak üretici firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda Roche Light Cycler 480 II cihazı kullanılarak gerçekleştirildi (153). RT - PCR analizi için;

**Tablo 15.** RT - PCR’da kullanılan primer dizileri

Gen	Primer	Primer Dizisi
<b>miR-34</b>	İleri primer	5'-CCAAGCGATTGGCAGTG-3'
	Geri Primer	5'-TCAGCAAGGTTCCGAAGTAAC-3'
	Prob	5'-CATGCTGAGTCGTCTACAACCAGCT-3
<b>miR-15a</b>	İleri primer	5'-GCTACGCATTAGCAGCACAT-3'
	Geri Primer	5'-TCAGCAAGGTTCCGAAGTAAC-3'
	Prob	5'-CATGCTGAGTCGTCTCACAACCATT-3'
<b>miR-16-5p</b>	İleri primer	5'-GCCACGGTTTAGCAGCA-3'
	Geri Primer	5'-TCAGCAAGGTTCCGAAGTAAC-3'
	Prob	5'-CTGAGTCGTCTCGCCAATATTTACGTG-3'
<b>miR-145</b>	İleri primer	5'-GCGACGCATGTCCAGTT-3'
	Geri Primer	5'-TCAGCAAGGTTCCGAAGTAAC-3'
	Prob	5'-CTGAGTCGTCTAGGGATTCTGGGAA-3'
<b>miR-21</b>	İleri primer	5'-TGGCACCTGACGTAGCTTATC-3'
	Geri Primer	5'-CGCCTCTCATGCTCACG-3'
	Prob	5'-TTCCGAGAGGCGTCAACATCAGTCT-3'
<b>RNU6</b>	İleri primer	5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATAT-3'
	Geri Primer	5'-CGCTTACGAATTTGCGTGTCAT-3'
	Prob	5'-TTGCGCAGGGGCCATGCTAATCTT-3'

1. 5 mL hacimli tüp içerisinde hedef gen ve referans gen için ayrı ayrı olmak üzere gerekli reaksiyon ortamı Tablo 16’de verilen hacimler kullanılarak hazırlandı.
2. Hazırlanan karışım her bir örnek için üç kuyucuk olacak şekilde RT-PCR için özel olarak üretilmiş beyaz 96 kuyucuklu pleyte her bir kuyucukta 15’er  $\mu\text{L}$  olacak şekilde dağıtıldı.
3. Dağıtılan karışımlar üzerine de her bir deney grubu için 5’er  $\mu\text{L}$  cDNA örneği ilave edildi.
4. Cihaz; ön inkübasyon  $95^{\circ}\text{C}$  10 sn., amplifikasyon  $95^{\circ}\text{C}$  10 sn.,  $60^{\circ}\text{C}$  1 dk.,  $72^{\circ}\text{C}$  1 sn. ve soğutma  $40^{\circ}\text{C}$  30 sn. olacak şekilde düzenlendi ve RT-PCR analizi gerçekleştirildi (Tablo 17).
5. Sonuçların analizi Roche Light Cycler 480-II cihazında bulunan Advance Relative Quantification programı ile yapıldı. Göreceli kantitasyon modunda; ilgilenilen hedef genin deney gruplarının ekspresyon seviyeleri muamelesiz grup (negatif kontrol) ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak rölatif olarak ifade edildi.

**Tablo 16.** Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon bileşenleri

<b>Reaktif</b>	<b>Bir örnek için (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
miRNA F (20 $\mu\text{M}$ )	0.7
miRNA R (20 $\mu\text{M}$ )	0.7
miRNA TM (20 $\mu\text{M}$ )	0.2
Prob master mix	10
ddH <sub>2</sub> O	3.4

**Tablo 17.** RT-PCR protokolü

<b>Program</b>	<b>Döngü</b>	<b>Analiz Modu</b>	
Ön İnkübasyon	1	-	
Amplifikasyon	65	Kantifikasyon	
Soğuma	1	-	
<b>Hedef Sıcaklık (°C)</b>	<b>Elde Etme Modu</b>	<b>Süre (saat: dk: s)</b>	<b>Sıcaklık Artış Hızı (°C/s)</b>
<b>Ön İnkübasyon</b>			
95	-	10 dk	4.4
<b>Amplifikasyon</b>			
95	-	10 sn	4.4
60	-	1 dk	2.2
72	Tek	1 sn	4.4
<b>Soğuma</b>			
40	-	30 sn	2.2

RT-qPCR ile elde edilen sonuçların kantite edilmesinde karşılaştırmalı Cp metodu (2- $\Delta\Delta C_p$  metodu) rölatif kantitasyonu analiz etmede kullanılan normalize edilmiş gen ekspresyonunun matematiksel modelidir (154). Bu eşitliğe göre  $\Delta C_p$  hedef: Cp hedef gen-Cp referans gen (RNAU6),  $\Delta C_p$  kontrol: Cp Hedef gen-Cp Referans gen.

### 5.11. İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar üç bağımsız deneyin ortalaması  $\pm$  standart sapma (mean $\pm$ SD) alınarak hesaplandı. Deney sonuçları, SPSS 13.0.1 (Statistics Program for Social and Science) istatistik programına yüklenerek normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov Testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uygun oldukları görüldükten sonra ANOVA testi, gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi için ise post-hoc Tukey analizleri kullanıldı.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Etanollü Propolis Ekstraktının Antioksidan İçeriğinin Belirlenmesi

Etanollü propolis ekstraktının antioksidan gücü; toplam polifenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve demir indirgeme gücü testleri kullanılarak belirlendi ve sonuçlar Tablo 18’de verildi.

**Tablo 18.** Etanollü propolis ekstraktının antioksidan içeriği (n=3)

	Toplam Polifenolik İçerik (mg gallik asit/g propolis)	Toplam Flavonoid İçerik (mg kuersetin/g propolis)
Propolis Ekstraktı	122.25±0.01	50.94±0.02

### 6.2. Sitotoksisite Analizi ile İlgili Bulgular

#### 6.2.1. MCF-7 ve Fibroblast Hücre Serilerinde Sitotoksisite Çalışmaları

##### 6.2.1.1. Etanollü Propolis Ekstraktının Sitotoksik Etkisi

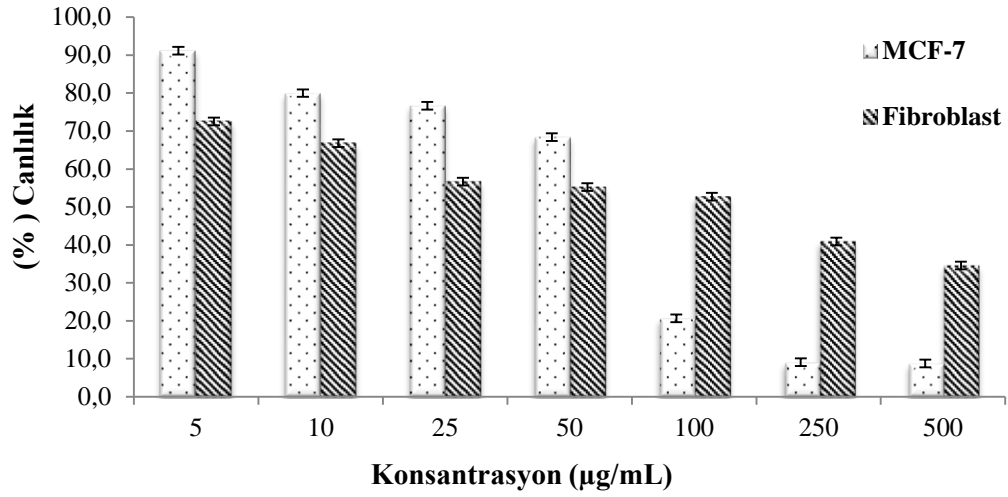
Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 ve Fibroblast hücre serilerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile değerlendirildi, veriler negatif kontrol grubuna oranlanarak elde edilen % hücre canlılıkları Tablo 19-20’de ve yüzde grafikleri Şekil 21’de verildi.

**Tablo 19.** Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Ekstrakt (µg/mL)	5	10	25	50	100	250
%Canlılık	91.2±0.51	80.0±0.35	76.7±0.87	68.4±1.29	20.6±0.23	9.1±0.09

**Tablo 20.** Etanollü propolis ekstraktının fibroblast hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Ekstrakt (µg/mL)	5	10	25	50	100	250	500
%Canlılık	72.6±0.45	66.8±2.35	56.7±0.33	55.2±1.1	52.7±0.4	40.8±1.4	34.5±2.38



**Şekil 21.** EEP'nin MCF-7 ve Fibroblast hücre serilerindeki sitotoksik etkisi yüzde canlılık grafiği (n=3)

#### 6.2.1.2. Paklitakselin Sitotoksik Etkisi

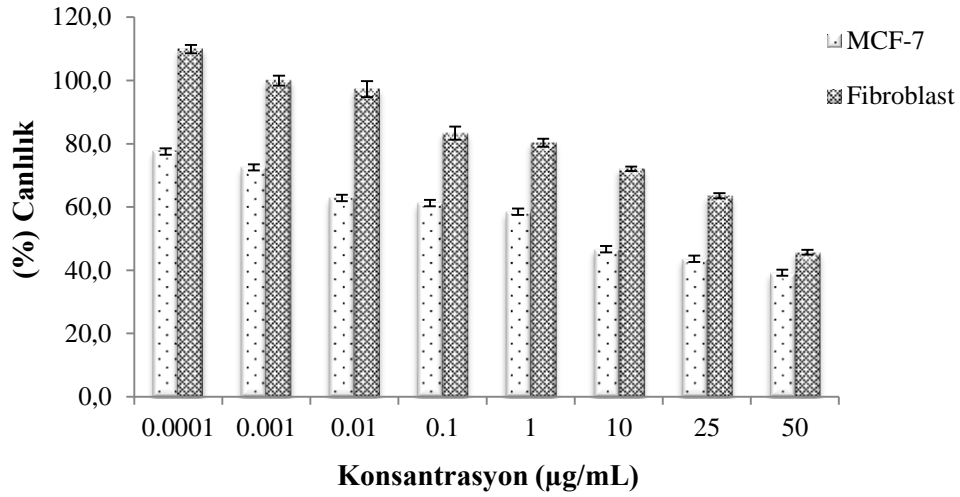
Paklitakselin, MCF-7 ve Fibroblast hücre serilerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile değerlendirildi, veriler negatif kontrol grubuna oranlanarak elde edilen % hücre canlılıkları Tablo 21-22'de ve yüzde grafikleri Şekil 22'de verildi.

**Tablo 21.** Paklitakselin MCF-7 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Paklitaksel (µg/mL)	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10	25	50
%Canlılık	77.5±0.3	72.5±0.3	62.8±0.1	61.2±0.6	58.5±0.4	46.6±0.2	43.6±1.1	39.2±1.1

**Tablo 22.** Paklitakselin Fibroblast hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Paklitaksel (µg/mL)	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10	25	50
%Canlılık	100.0±1.3	99.9±1.5	97.3±2.5	83.3±2	80.3±1	72±0.7	63.5±0.8	45.7±0.7



**Şekil 22.** Paclitakselin MCF-7 ve Fibroblast hücre serilerindeki sitotoksik etkisi yüzde canlılık grafiği (n=3)

### 6.2.1.3. Kuersetinin Sitotoksik Etkisi

Kuersetinin, MCF-7 ve Fibroblast hücre serilerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile değerlendirildi, veriler negatif kontrol grubuna oranlanarak elde edilen % hücre canlılıkları Tablo 23-24’de ve yüzde grafikleri Şekil 23’de verildi

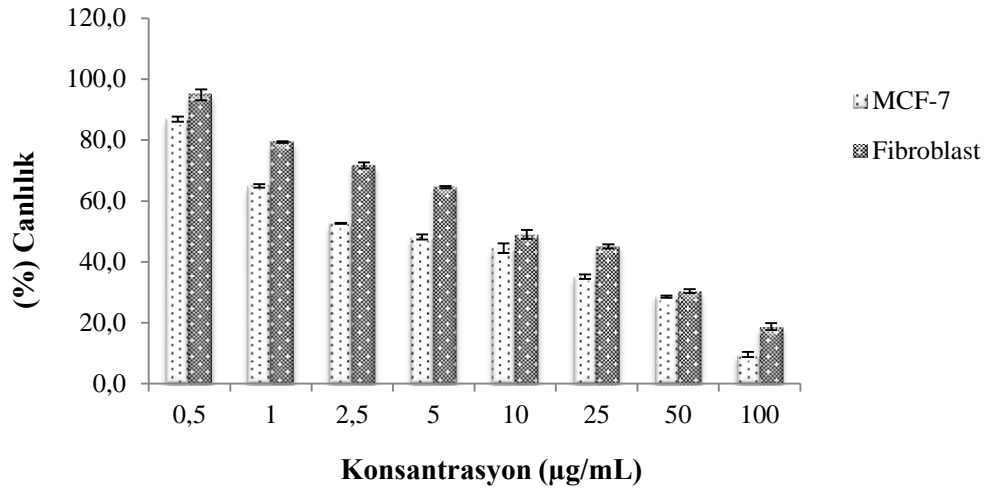
**Tablo 23.** Kuersetinin MCF-7 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Kuersetin (µg/mL)	0.5	1	2.5	5	10	25	50	100
%Canlılık	86.9±0.8	65±0.5	52.6±0.1	48.1±0.9	44.5±1.6	35.2±0.7	28.6±0.3	9.6±0.8

**Tablo 24.** Kuersetinin Fibroblast hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi (n=3)

Kuersetin (µg/mL)	0.5	1	2.5	5	10	25	50	100
%Canlılık	94.9±1.7	79.4±0.2	71.7±0.9	64.5±0.3	49±1.4	45.1±0.6	30.4±0.5	18.7±1.1





**Şekil 23.** Kuersetinin MCF-7 ve Fibroblast hücre serilerindeki sitotoksik etkisi yüzde canlılık grafiği (n=3)

### 6.3. Flow Sitometrik Analiz Bulguları

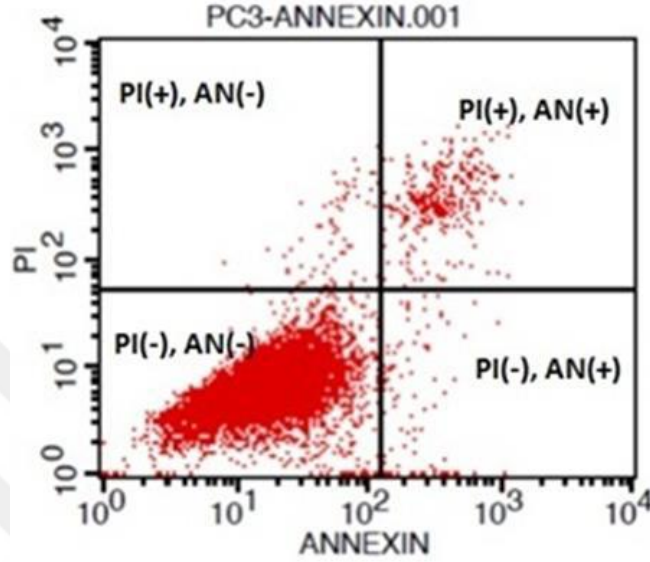
Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisindeki apoptotik etkinliği Anneksin V kiti kullanılarak flow sitometrisiyle belirlendi. Negatif kontrol grubu (muamelesiz grup), etanollü propolis ekstraktının 25-100 µg/mL konsantrasyonlarıyla 72 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerine ait sonuçlar sırasıyla Resim 2’de verildi. Tablo 25’de ise MCF-7 hücre serisindeki tüm gruplara ait Anneksin V analiz sonuçları % hücre miktarı şeklinde görülmektedir.

**Tablo 25.** MCF-7 hücre serisinde Anneksin V analizi % hücre oranları (n=3)

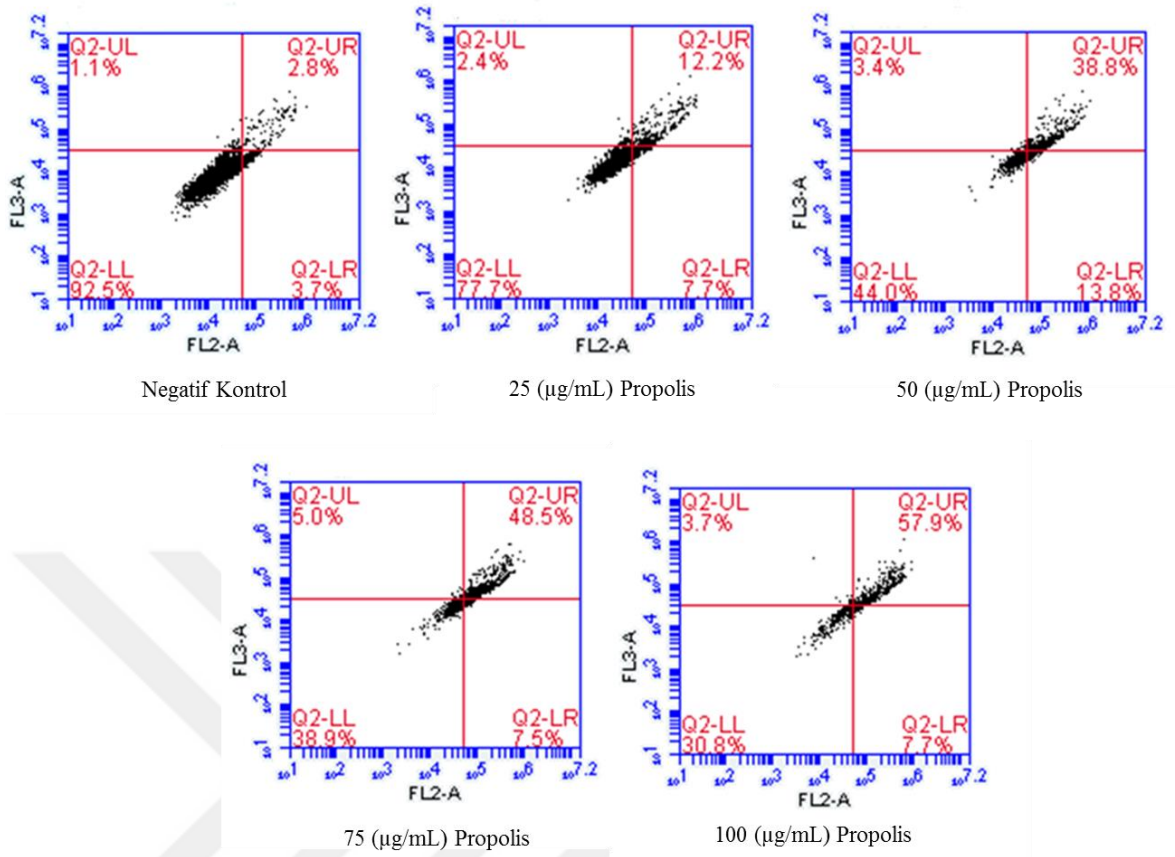
	Normal Hücre	Nekrotik Hücre	Apoptotik Hücreler
<b>Negatif Kontrol</b>	93.9±2.80	1.4±0.001	4.8±2.82
<b>25 µg/mL</b>	77.9±1.67 * p (0.004)	3.5±0.56 p (0.228)	18.4±2.13 * p (0.032)
<b>50 µg/mL</b>	46±6.37 * p (0.0001)	5±1.24 * p (0.023)	49±7.3 * p (0.0001)
<b>75 µg/mL</b>	35.5±3.56 * p (0.0001)	7.5±1.66 * p (0.001)	57±4.95 * p (0.0001)
<b>100 µg/mL</b>	27±3.63 * p (0.0001)	4.1±1.45 p (0.095)	68.7±4.44 * p (0.0001)

[\*Negatif kontrol grubuna göre anlamlı değişim göstermiştir (p<0.05)]

Elde edilen anneksin V analizi sonucunda Resim 1’de de olduğu gibi 4 ayrı bölge görülecektir:



**Resim 1.** Annexin V analizinde hücrelerin yaptığı floresans ışımlar sonucu elde edilen bölgeler. 1. Bölge PI (-), Anneksin (-): Canlı hücre; 2. Bölge PI (+), Anneksin (-): Nekrotik hücreler; 3. Bölge PI (+), Anneksin (+): Geç apoptoz evresindeki ya da henüz ölmüş hücreleri; 4. Bölge PI (-), Anneksin (+): Erken apoptoz evresindeki hücreleri göstermektedir.



**Resim 2.** MCF-7 hücre serisinde Anneksin V analizi sonucu elde edilen grafikler

Anneksin V analiz sonuçlarına göre; etanollü propolis ekstraktlarının doza bağlı bir şekilde sağlam MCF-7 kanser hücresi miktarını anlamlı olarak azaltıp, apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı saptandı (Tablo 21).

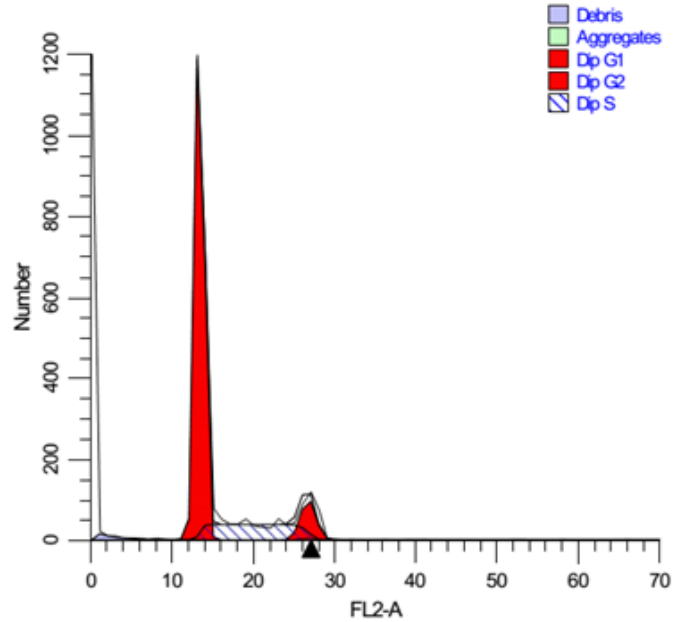
### 6.3.1. Hücre Döngüsü Analiz Bulguları

Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinin hücre döngüsü üzerindeki etkisi DNA içerik kiti kullanılarak flow sitometriyle belirlendi. Negatif kontrol grubu(muamelesiz grup), etanollü propolis ekstraktının (25, 50, 75 ve 100 µg/mL) konsantrasyonları ile 72 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerine ait sonuçlar sırasıyla Resim 3-7’de verildi. Tablo 26’de ise tüm gruplara ait hücre döngüsü analiz verileri % hücre olarak yer almaktadır.

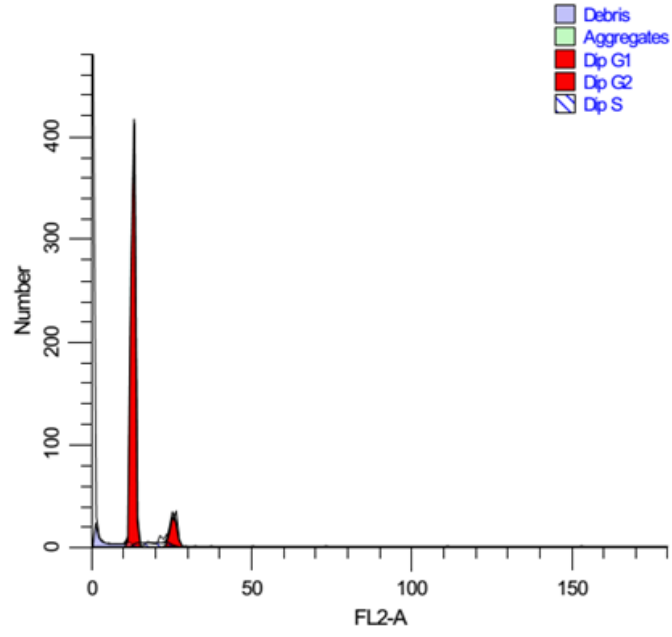
**Tablo 26.** MCF-7 hücre serisindeki tüm gruplara ait hücre döngüsü analizi % hücre oranları (n=3)

	<b>G1 Evresi</b>	<b>G2/M Evresi</b>	<b>S evresi</b>	<b>sub-G1</b>
<b>Negatif Kontrol</b>	71.8±0.80	9.6±0.89	18.5±1.06	3.4±1.06
<b>25 µg/mL</b>	84.8±1.56 *	7.1±1.61	8±1.58 *	7.7±1.58 *
	p (0.0001)	p (0.228)	p (0.0001)	p (0.0001)
<b>50 µg/mL</b>	87.0±2.34 *	2.5±1.88 *	10.3±3.96 *	8.0±3.96 *
	p (0.0001)	p (0.0001)	p (0.0001)	p (0.0001)
<b>75 µg/mL</b>	91.3±2.02 *	2.2±1.89 *	6.3±1.25 *	12.1±1.25 *
	p (0.0001)	p (0.0001)	p (0.0001)	p (0.0001)
<b>100 µg/mL</b>	90.8±1.89 *	2.7±1.50 *	6.3±0.93 *	22.9±0.93 *
	p (0.0001)	p (0.0001)	p (0.0001)	p (0.0001)

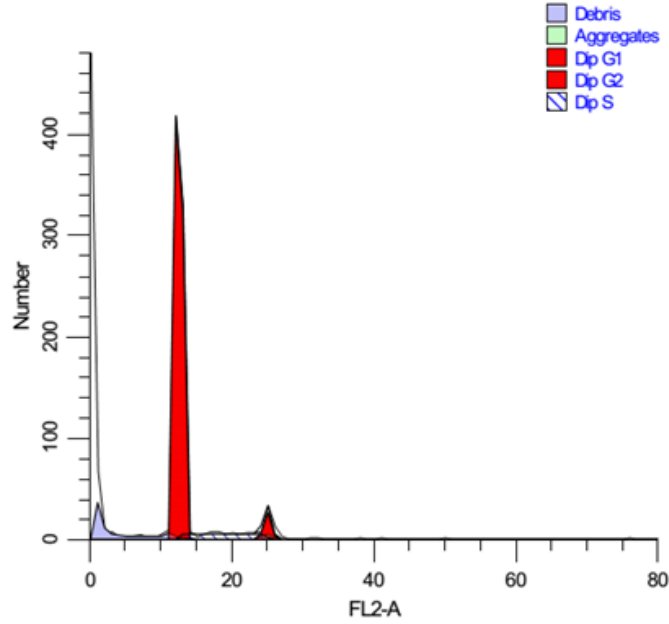
[\*Negatif kontrol grubuna göre anlamlı değişim göstermiştir (p<0.05)]



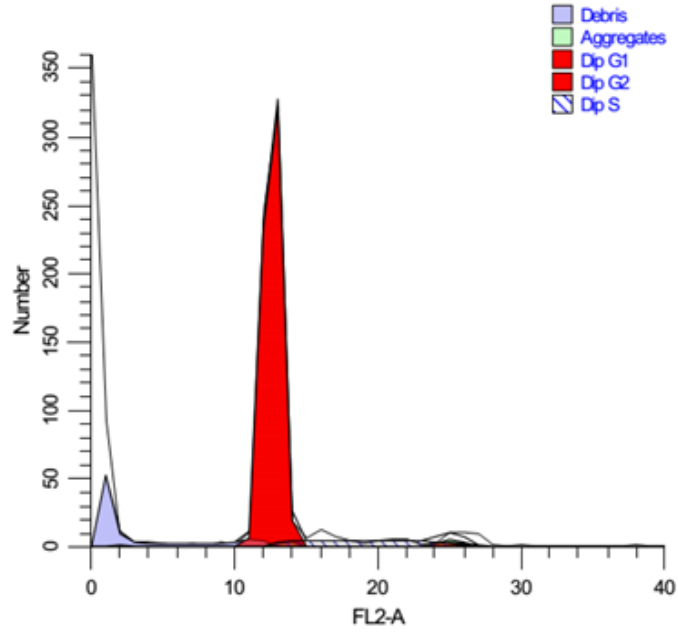
**Resim 3.** Negatif kontrol grubunu oluşturan hücrelere ait hücre döngüsü analiz sonucu



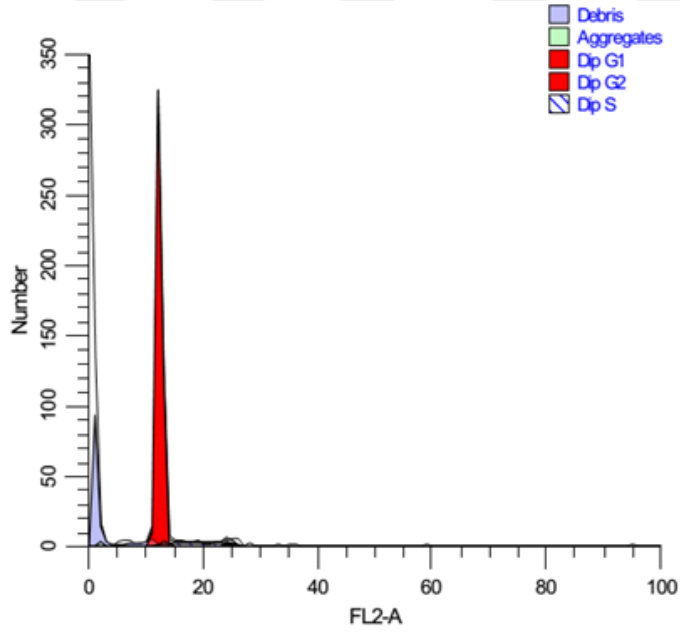
**Resim 4.** Etanollü propolis ekstratının 25 µg/mL konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu



**Resim 5.** Etanollü propolis ekstratının 50 µg/mL konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu



**Resim 6.** Etanollü propolis ekstratının 75 µg/mL konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu



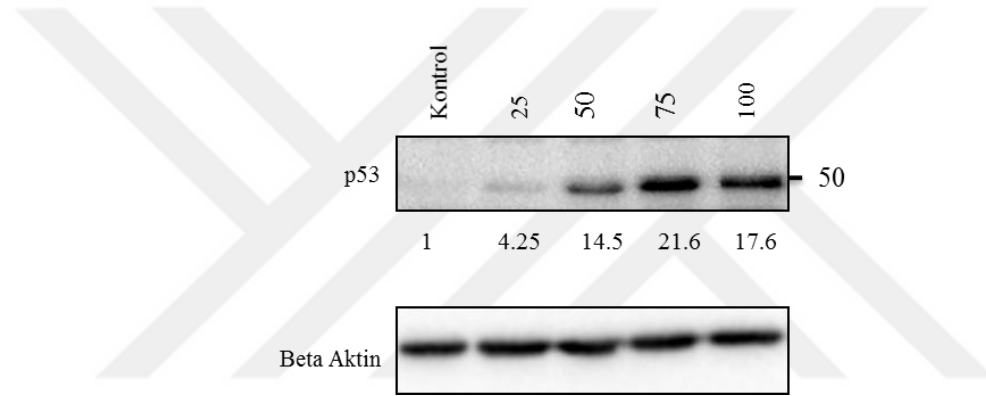
**Resim 7.** Etanollü propolis ekstratının 100 µg/mL konsantrasyonu ile 72 saat muamele edilen hücelere ait hücre döngüsü analiz sonucu

Elde edilen hücre döngüsü analiz sonuçlarına göre; etanollü propolis ekstraktlarının doza bağlı bir şekilde (25, 50, 75 ve 100 µg/mL) MCF-7 hücrelerinin

döngüsünü G1 evresinde durdurduğu ve bulunan değerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. G2/M ve S evrelerindeki hücre topluluğunu da anlamlı şekilde azalttığı gözlemlendi. Ayrıca sub-G1 evresinde ise hücre miktarını anlamlı şekilde arttırdığı gözlemlendi.

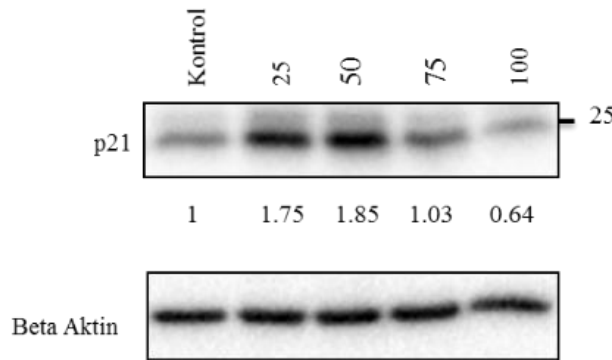
#### 6.4. Western Blot Analiz Bulguları

Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde bozulmuş apoptoz mekanizması üzerinde etkili proteinlerin ekspresyon seviyeleri western blot yöntemi gerçekleştirildi. Image Lab programı kullanılarak görüntülenen ve normalize edilen Bax, p53, p21 protein ekspresyonlarındaki değişimler incelendi.



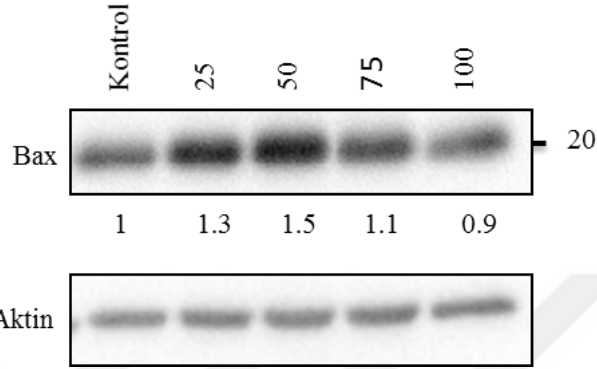
**Şekil 24.** Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde p53 protein ekspresyonu üzerine etkisi

Elde edilen analiz sonuçlarına göre; etanollü propolis ekstraktlarının doza bağlı bir şekilde (25, 50, 75 ve 100 µg/mL) MCF-7 hücrelerinde p53 protein seviyesinde artış görülmüştür (Şekil 24).



**Şekil 25.** Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde p21 protein ekspresyonu üzerine etkisi

MCF-7 hücrelerinde p21 protein seviyesi incelendiğinde kontrole kıyasla düşük dozlarda p21 protein seviyesinin arttığı, 75 µg/mL da değişmediği ve 100 µg/mL de ise azaldığı görülmüştür (Şekil 25).



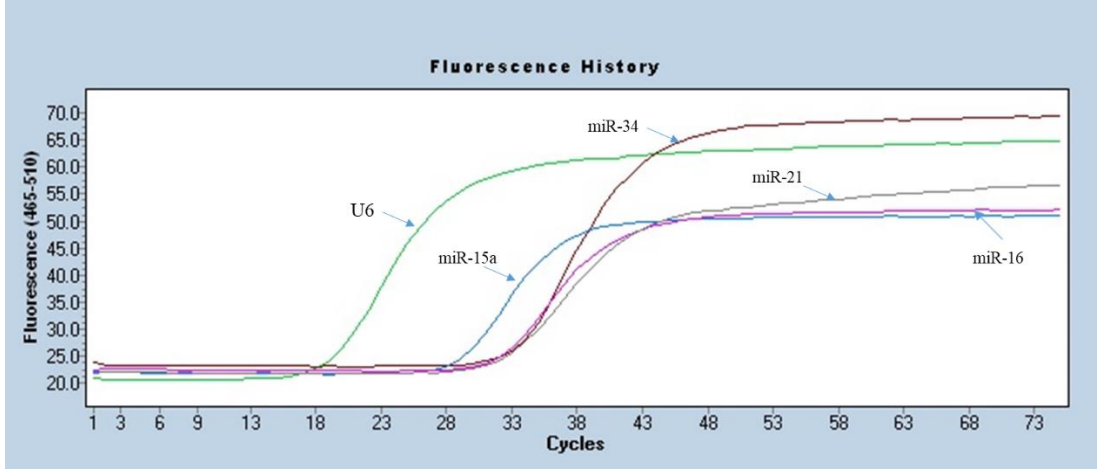
**Şekil 26.** Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde Bax protein ekspresyonu üzerine etkisi

Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde Bax protein ekspresyonu üzerine etkisi incelendiğinde; kontrole kıyasla düşük dozlarda Bax protein seviyesinin arttığı, 75 µg/mL ve 100 µg/mL ise değişmediği görülmüştür (Şekil 26).

### 6.5. MikroRNA Ekspresyonu Analiz Bulguları

Quantative real time-PCR ile miRNA ekspresyonuna ait amplifikasyon eğrileri Resim 8'de verildi. Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde miRNA (miR-34, miR-15a, miR-16-5p, miR-145, miR-21) ekspresyonu üzerine etkisi konsantrasyona bağlı olarak muamele görmeyen negatif kontrole göre kat olarak Şekil 27-30'da sütun grafiği olarak verildi. miRNA'ların ekspresyon düzeyleri RNAU6 ile normalize edilmiştir.

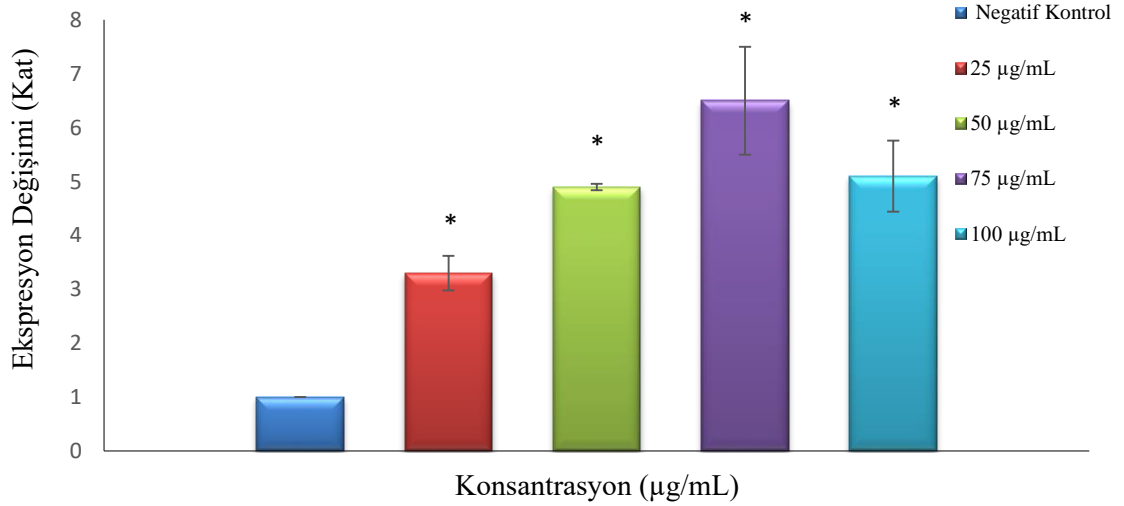




**Resim 8.** miRNA ekspresyon analizinde elde edilen amplifikasyon eğrileri

### 6.5.1. miR-34 Ekspresyon Seviyeleri

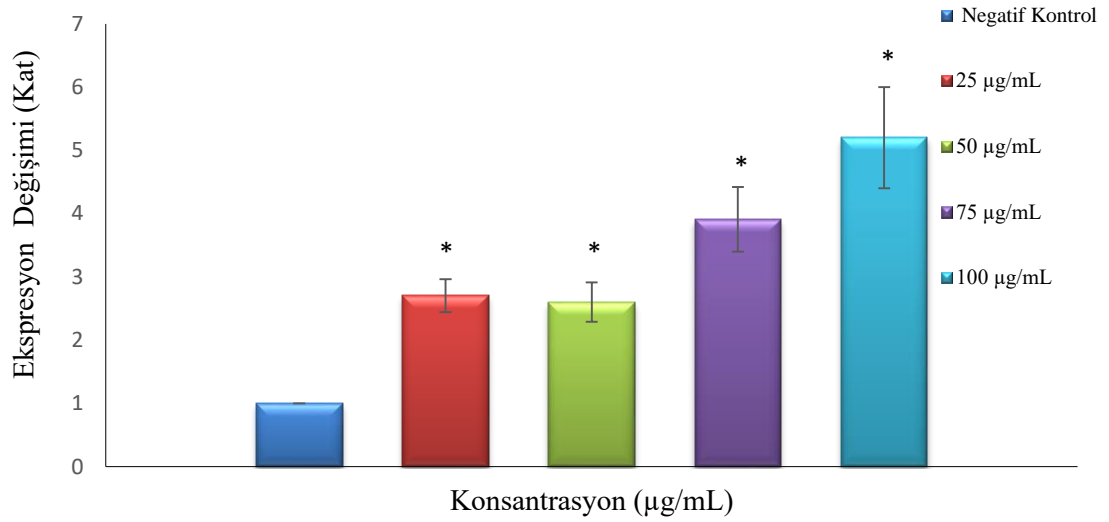
Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde miR-34 ekspresyonu üzerine etkisine bakıldığında kontrol grubuna göre kıyasla doz bağımlı olarak anlamlı artış ( $p=0.004$ ,  $p=0.0001$ ,  $p=0.0001$ ,  $p=0.001$ ) görülmüştür.



**Şekil 27.** Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde miR-34 ekspresyon üzerine etkisi ( $n=3$ ) [\*Negatif kontrole göre anlamlı artış görüldü ( $p<0.05$ )]

### 6.5.2. miR-15a Ekspresyon Seviyeleri

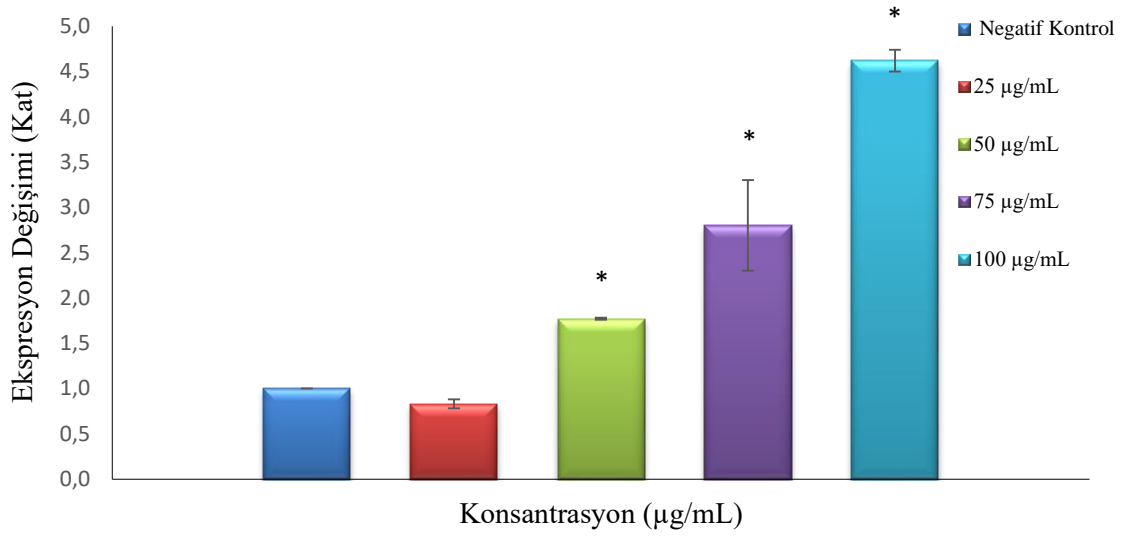
Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde miR-15a ekspresyonu üzerine etkisine bakıldığında kontrol grubuna göre kıyasla doz bağımlı olarak anlamlı artış ( $p=0.007$ ,  $p=0.012$ ,  $p=0.0001$ ,  $p=0.0001$ ) görülmüştür.



**Şekil 28.** Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde miR-15a ekspresyon üzerine etkisi (n=3) [\*Negatif kontrole göre anlamlı artış görüldü ( $p<0.05$ )]

### 6.5.3. miR-16-5p Ekspresyon Seviyeleri

Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde miR-16-5p ekspresyonu üzerine etkisine bakıldığında kontrol grubuna göre kıyasla doz bağımlı olarak anlamlı artış ( $p=0.892$ ,  $p=0.017$ ,  $p=0.0001$ ,  $p=0.0001$ ) görülmüştür.



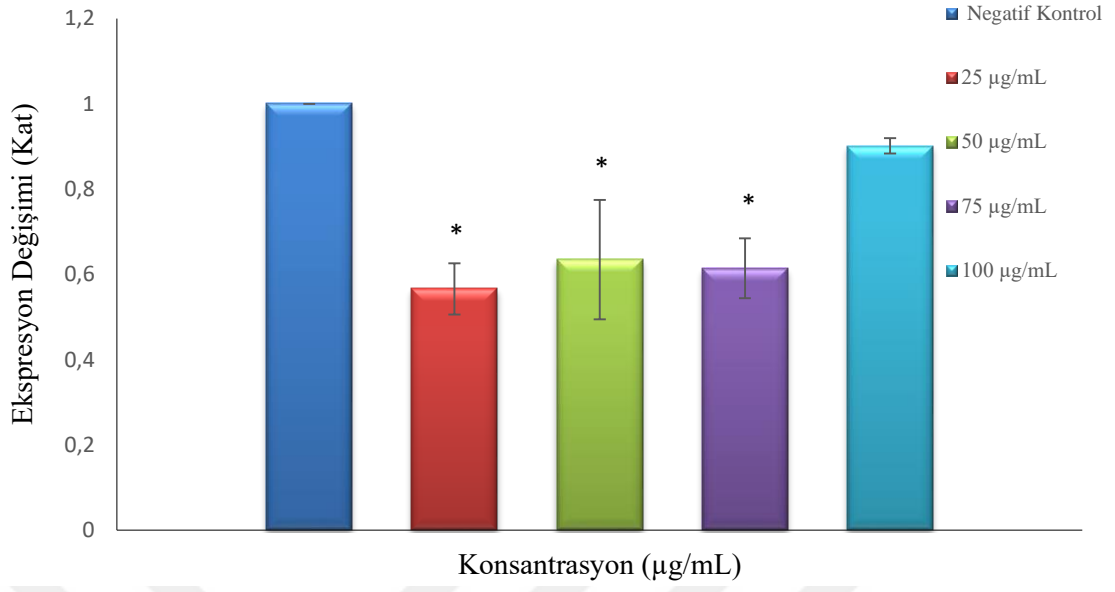
**Şekil 29.** Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde miR-16-5p ekspresyon üzerine etkisi (n=3) [\*Negatif kontrole göre anlamlı artış görüldü (p<0.05)]

#### 6.5.4. miR-145 Ekspresyon Seviyeleri

Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde miR-145 ekspresyonu üzerine etkisi gözlenememiştir.

#### 6.5.5. miR-21 Ekspresyon Seviyeleri

Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde miR-21 ekspresyonu üzerine etkisine bakıldığında kontrol grubuna göre kıyasla doz bağımlı olarak anlamlı azalış (p=0.0001, p=0.001, p=0.001, p=0.559) gözlenmiştir.



**Şekil 30.** Etanollü propolis ekstratının MCF-7 hücre serisinde miR-21 ekspresyon üzerine etkisi (n=3) [\*Negatif kontrole göre anlamlı azalış görüldü (p<0.05)]

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri küresel bir sağlık sorunudur ve tüm dünyada akciğer kanserinden sonra, kansere bağlı ölümlerin en sık ikinci nedenidir (155, 156). Günümüzde meme kanseri tedavisinde kullanılan temel yaklaşımlar; cerrahi müdahale, hormonal terapi, immünoterapi, kemoterapi ve radyoterapidir. Kemoterapi tedavi planının en önemli parçasıdır. Mevcut kemoterapötikler tümörleri inhibe edip öldürse de, toksisite ve ciddi yan etkiler söz konusudur. Bu durum ilaçların klinik uygulamalarını kısıtlamaktadır (157). Bu nedenle hastalıkta beklenen iyileşme arzu edilen düzeyde olmamaktadır (4). Bu bilgiler ışığında, yeni antitümör kemoterapötiklerin keşfi ve geliştirilmesi, entegre tedavi planının iyileştirilmesi için önemlidir (157).

Son yıllarda diyetle alınan doğal ürünlerin sentetik ilaçlara kıyasla/daha az yan etki ve düşük toksisiteye sahip olması insanları yeniden doğal ilaç olarak bilinen ürünlerin tüketimine yöneltmiştir (42, 155). Antikanser bileşiklerinin %70'inden fazlası doğal ürünler veya doğal ürünlerden türetilmiş maddelerdir (35). Bu sebeple doğal ürünlere yeni ilaç keşifleri için potansiyel hammadde gözüyle bakılmakta ve doğal ürünlere bulunan polifenollerin yapıları ve aktiviteleri ön plana çıkmaktadır (42). Özellikle doğal arı ürünlerinin (propolis, polen, arı sütü) içeriğinde yer alan polifenolik bileşiklerle yapılan çalışmalarda antikanser etkinliklerinin ortaya koyulmuş olması arı ürünlerine olan ilgiyi arttırmıştır (30, 43, 53).

Geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan propolis; antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, antifungal, antitümoral ve pekçok önemli biyolojik aktivilere sahip bir arı ürünüdür. (17, 18, 38, 53). Propolis, polifenolik ve flavonoid bileşikler açısından zengin, toplandığı bölgenin coğrafyasına ve iklimine göre içeriği değişebilmektedir (35). Günümüzde bilim insanlarının propolisin ayrıntılı kimyasal kompozisyonunu açıklamak, sitotoksik, antiproliferatif ve proapoptotik özelliklerini belirlemek için çok sayıda çalışma yaptıklarını görmekteyiz (31, 39, 100). Propolis; reçinemsi yapısından dolayı ham halde kullanılamamakta, çeşitli çözücülerle ekstrakt haline getirilmektedir. Bu işlem sırasında inert bileşenlerin uzaklaştırılması ve polifenolik fraksiyonların muhafaza edilmesi gerekmektedir (158). Propolis ekstraksiyonu için maserasyon, soksilet çıkarma, ultrasonik (sonikasyon) ve mikrodalga ekstraksiyonu gibi farklı yöntemler ve çözücüler kullanılmaktadır. Kullanılan

ekstraksiyon yöntemine ve çözücüye göre de propolis ekstraktlarının biyolojik aktiviteleri değişebilmektedir. Propolis ekstraksiyonu için etanol, metanol, su, hekzan, DMSO ve aseton gibi çözücüler kullanılmaktadır. Etanolle hazırlanan propolis ekstraktlarının mumsu bileşik içermediği ve polifenolik bileşenlerce zengin olduğu belirtilmektedir (159).

Propolisin günlük hayat içerisindeki kullanımının artması, hazırlanan propolis ekstraktının temel içeriğinin hızlı ve ucuz yöntemlerle belirlenmesi gerekliliğini de doğurmuştur. Bu amaçla toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin belirlenmesi en sık başvurulan rutin kontrol testleri haline gelmiştir (158). Propolisin biyolojik aktivitesi içeriğindeki flavonoid ve fenolik bileşiklere atfedilmektedir (160). Tüm bu bilgiler doğrultusunda hazırlanan etanollü propolis ekstraktının içeriği ve antioksidan karakteri toplam polifenol ve flavonoid testleri ile gerçekleştirildi.

Çalışmamızda Türk propolisinin etanolik ekstraktlarının toplam polifenolik içeriği 122 mg gallik asit /g propolis olarak bulundu. Literatürde Dünya'nın farklı yerlerinden toplanan propolis ekstraktlarındaki toplam polifenolik içeriğinin; 31-299 mg gallik asit/g propolis değerleri arasında değiştiği (161), Transilvanya propolisi için 24-62 g gallik asit / 100 g propolis aralığı (162), Çin propolisi için 174 mg gallik asit/g propolis (163), Polonya propolisi için 150-190 mg gallik asit /g propolis arasında (164) olduğu belirtilmiştir.

Etanollü propolis ekstraktının toplam flavonoid içeriği 50.94 mg kuersetin/g propolis olarak bulundu. Dünya'nın farklı bölgelerinden toplanan propolis ekstraktlarındaki toplam flavonoid içeriğinin 2.5-176 mg kuersetin/g propolis arasında değiştiği (161), Çin propolisi için 45 mg kuersetin/g propolis (163), Polonya propolisi için 49-53 mg kuersetin/g propolis aralığı (164) ve Türk propolisi için ise 48 mg kuersetin/g propolis (146) olduğu belirtilmiştir. Çalışmada elde edilen toplam polifenol ve flavonoid içerik değerlerinin literatür verileriyle uyumlu olduğu görüldü. Gözlemlenen farklılıklar, propolis toplandığı bölgeden, çözücü türünden, ekstraksiyon yönteminden veya propolis toplayan arı ırkından kaynaklanıyor olabilir.

Sforcin ve Bankova doğal bir ürünün olası yararlı biyolojik etkilerinin ön araştırması için *in vitro* yöntemlerin önemli olduğunu ve elde edilen analiz sonuçlarına göre *in vivo* veya klinik çalışmaların olabileceğini belirtmişlerdir (17).

Geçmiş yıllarda hücre kültüründe hücre canlılığını ve proliferasyonunu incelemek için çeşitli yöntemler geliştirildi. Hücre canlılığının, proliferasyon hızının ve sitotoksitenin belirlenmesi için tripan blue, MTT, LDH, ATP gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (165). MTT testi farklı hücre tiplerine uygulanabilen, ucuz, radyoaktif olmayan, hızlı, hassas ve güvenilir bir kolorimetrik metottur. Çalışmamızda sitotoksitenin analizi MCF-7 kanser serileri ile paralel olarak normal fibroblast hücrelerinde MTT testi ile gerçekleştirildi (128, 166).

Yapılan literatür taramasında propolis ekstraktlarının farklı hücre serilerinde sitotoksik etki gösterdiği ortaya konmuştur. Yeşil Brezilya propolisinin A549 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak (167), Polonya propolisinin etanolik ekstraktının prostat kanseri hücrelerinde (168), Tunus propolisinin kolon ve larinks kanseri hücrelerinde (169), Tayland propolisinin metanollü ekstraktlarının karaciğer, mide ve kolon kanseri hücre serilerinde (148) sitotoksik etki gösterdikleri belirtilmiştir. Propolis ekstraktlarının MCF-7 hücre serilerindeki sitotoksik etkisinin incelendiği çalışmalar gözününe alındığında; Tetsuro ve ark. (170) kırmızı Brezilya propolisinin doza bağlı olarak (0.1-20 µg/mL) hücre canlılığını azalttığı belirtmişlerdir. Xuan ve ark. (171) Çin propolisinin etanollü ekstraktının MCF-7 ve MDA-MB-231 (human breast cancer ER(-)) hücre serilerinde doza (25-200 µg/mL) ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Vatansever ve ark. (172) Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen propolis etanolik ekstraktlarının doza ve zaman bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve en etkili dozun 125 µg/mL olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda Türk propolisinin etanollü ekstraktının doza bağlı (25-100 µg/mL) olarak hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. IC<sub>50</sub> değerinin 61 µg/mL bulunduğu ve diğer bölge propolislerinden elde edilen sonuçlarla da benzer olduğu gözlemlendi.

Etanollü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde sergilediği sitotoksik etkinin hücre proliferasyonunu durdurma ya da apoptozu indüklenme yollarından hangisi üzerinden gerçekleştiği konusunda fikir sahibi olabilmek adına ekstraktın hücre döngüsüne ve apoptoza olan etkileri araştırıldı.

Apoptozun belirlenmesinde TUNEL yöntemi, western blotting, M30 yöntemi, ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) ve flow sitometri gibi yöntemler kullanılmaktadır (173, 174). Flow sitometri; hücre döngüsü, hücre proliferasyonu,

membran potansiyelinin ve apoptozun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem oldukça hızlı ve kısa sürede binlerce hücreyi analiz ederek güvenilir sonuçlar verebilmektedir (130). Propolis ekstraktının apoptoz ve hücre döngüsüne etkisi flow sitometri yöntemiyle belirlendi.

Hücre döngüsü, çoğalmak üzere uyarılmış hücrede bir dizi geçici biyokimyasal aktivitenin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü süreçtir (175). Hücre döngüsü boyunca ilerleme, DNA sentezi ve kromozom ayırımında olası hataları algılayan kontrol noktaları tarafından düzenlenir (176). Kanser tedavisinde hücre döngüsünün durdurulabilmesi hedef mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir (109). Bu bakış açısıyla gerçekleştirilen hücre döngüsü analizinde, etanolik propolis ekstraktının doz bağımlı olarak MCF-7 hücre serisinde hücre döngüsünü G1 evresinde durdurduğu ve sentez evresine giren hücre sayısını azalttığı görüldü. Ayrıca sub G1 fazında hücre sayısının arttığı belirlendi. sub G1 fazındaki bu artışın hücre ölüm indüksiyonunu yansıttığı düşünülmektedir. Genel olarak sub G1 DNA içeriğine sahip hücre artışının, apoptotik hücre ölümünün bir belirteci olduğu kabul edilmiştir (177).

Literatürde propolis ve propolisten izole edilen bileşenlerin MCF-7 hücre serisinde hücre döngüsü üzerine etkisini ortaya koyan çalışmalarda; kahverengi Küba propolisinin doz ve zamana bağlı olarak döngüyü G1 evresinde (178), kurkumin, EGCG ve arctigenin üçlü kombinasyonun uygulandığı hücrelerde G0/G1 evresinde (179), CAPE ve kuersetin ile muamele edilen hücreler de S evresinde durdurduğu (180, 181), ve ayrıca kuersetinin sub-G1 evresindeki hücre sayısında belirgin bir artışa neden olduğu belirtilmiştir (181). Çalışma ekibimiz tarafından yapılan bir başka çalışmada; Türk propolisinin etanolik ekstraktının A549 hücre serisinde G1 evresindeki hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi (53). Propolis ve bileşenlerinden krisin, kuersetin, CAPE, galangin, kaempferol, kardanolun uygulandığı farklı kanser hücre serilerinde (C6 glioma, servikal kanser, kolon kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri (BT-474), lösemide (HL-60) gibi) gösterdikleri antiproliferatif etkinin hücre döngüsünü G1 ya da G2/M evresinde durdurduğu ve muhtemel mekanizmalarının ise siklin ve CDK'ların ekspresyonlarında bir azalma ya da CDKI olan p21 ve p27'nin ekspresyonundaki bir artış kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (182-187).



Etanolü propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde hücre döngüsünü G1 evresinde durdurabilmesinin muhtemel sebepleri arasında p21 ekspresyonunun artırılması olabileceğini düşünerek p21'in ekspresyonundaki değişimler incelendi. Olabilecek diğer olasılıklar ise CDK2, CDK6, CDK4, siklin E, siklin D ekspresyonlarında azalma ya da CDK2/siklin E, CDK4, 6/siklin D kompleksinin inhibe edilmesi olabilir. Çalışmanın bu yönüyle de araştırılması gerektiğini önermekteyiz.

Proteinlerin tespiti ve analizi için western blot, PCR, ELISA gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (188-190). Düşük miktarda bulunan proteinlerin tespiti, yüksek özgüllük ve uygulama kolaylığı gibi avantajlar western blot kullanımını yaygın hale getirmiştir (138, 191). Çalışmamızda protein ekspresyon düzeyleri western blot analizi ile gerçekleştirildi.

Siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, Cip/Kip ailesine ait bir proteindir. p21, DNA hasarından sonra p53'e bağlı hücre döngüsü durdurulmasından sorumludur, ancak p53'ten bağımsız mekanizmalarla da düzenlendiği (Sp1, Sp3, Ap2, STAT'ler ve C/EBP gibi birçok transkripsiyon faktörü) belirtilmiştir (192). CDI'ler genellikle siklin/CDK komplekslerinin aktivitesini inhibe eder ve hücre döngüsü ilerleyişini olumsuz şekilde düzenlerler (193). p21; CDK-bağlama aktivitesinin yanı sıra transkripsiyon, büyüme ve DNA sentezinin düzenlenmesinde yer alan bir dizi proteinle de etkileşime girer (194). Hücredeki p21 seviyesi; transkripsiyonel regülasyon, epigenetik susturma, mRNA stabilitesi ve ubiquitin bağımlı/bağımsız yıkımı gibi çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenir (195).

Propolis ve izole bileşenleriyle yapılan çalışmalar incelendiğinde; Brezilya yeşil propolisiyle muamele edilen A549 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla p53'ten bağımsız şekilde p21'in ekspresyonunun arttığı ve hücre döngüsünün durdurulduğu belirtilmiştir (167). Bir başka çalışmada, propolisin U937 hücre serisinde p21 ve p27 proteinlerinin ekspresyonunu arttırdığı ve siklin B1, siklin A, CDK2 protein seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (196). Kuersetinle muamele edilen meme kanseri hücre serilerinde (ER-positif ve Her2-negatif) apoptozun arttığı, ayrıca hücre döngüsü ilerleyişinin de inhibe edildiği belirtilmiştir. Kuersetinin p51, p21 aktivitelerini arttırdığı, p21'in CDK2'nin aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir (197, 198). Aminoflavon (AF) uygulanan MCF-7 hücrelerinde, AF'nin tüm konsantrasyonlarında

p53 düzeyi artarken, p21'in AF'nin düşük konsantrasyonlarında arttığı ve yüksek konsantrasyonlarında ise azaldığı belirtilmiştir. Yüksek AF konsantrasyonlarında p21'in proteazomal olarak yıkımının arttığı bildirilmiştir (199). Prostat kanser hücre serisinde doksorubisinle yapılan çalışmada, doksorobisinin p53 ekspresyonunu güçlü bir şekilde indüklerken, düşük dozlarında p21 düzeyini arttırdığı ve yüksek dozların da ise p21 protein seviyesinde azalma olduğu belirtilmiştir (194).

Çalışmamızda propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisindeki p21 protein seviyesi üzerine etkisine bakıldığında, negatif kontrol grubuna kıyasla düşük konsantrasyonlarında p21 protein seviyesinin arttığı, yüksek konsantrasyonlarında ise p21 protein seviyesinin azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlar hücrelerin, DNA hasarı varlığında hücre döngüsünün durdurulması veya apoptozu nasıl aktive ettiğini belirleyen mekanizmalar için bir paradigma sağlamaktadır. p21'in post translasyonel mekanizmalarla düzenlendiği bilinmektedir (Örneğin p38  $\alpha$  ve c-Jun fosforilasyonu, Akt'nin treonin 145 den fosforile edilmesi, glikojen sentaz kinaz-3'un p21 fosforile etmesi p21'i stabilize etmektedir.). Özellikle Akt sinyal yolağının p21 düzenlenmesinde önemli rol oynadığı vurgulanmaktadır. Akt'in DNA hasarına tepki olarak nasıl aktive edildiği hala net olmamakla birlikte, literatürde Akt sinyal yolu inhibisyonunun p21'in azalmasına neden olabileceği ileri sürülmektedir (199). Etanolik propolis ekstraktının yüksek konsantrasyonlarında p21'in proteazomal olarak yıkımının artabileceğini ve buna neden olabilecek Akt sinyal yolağının araştırılmasını önermekteyiz.

Hem ekstrinsik hem de intrinsik yolları içeren apoptoz, çok hücreli organizmalardaki en önemli hücre ölüm şeklidir (200). Etanolü propolis ekstraktının doza bağlı bir şekilde MCF-7 hücre serisinde hücre miktarını azaltıp, apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak arttırdığı görüldü. Apoptozun hangi yolak üzerinden gerçekleştiğini ortaya koymak için p53 ve Bax protein ekspresyon seviyeleri değerlendirildi.

Bir tümör supresör gen ürünü olan p53 proteini, kompleks bir moleküler düzenleyici ağın merkezinde olup, hücre döngüsünün kontrolü (p21), DNA tamiri, transformasyon, apoptoz regülasyonunu (Bax, Puma) ve miRNA'lar da dahil olmak üzere çeşitli genlerin transaktivasyonu yoluyla hücrel streslere yanıtta önemli rol oynamaktadır (201, 202).

Bax; Bcl-2 proteinini antagonize eden ve apoptotik hücre ölümünü hızlandıran proapoptotik protein olarak tanımlanır (196). Elde edilen analiz sonuçlarına göre; etanollü propolis ekstraktının doza bağlı bir şekilde MCF-7 hücre serisinde p53 ve Bax protein seviyelerini arttırdığı gözlemlendi. Kontrol grubuna göre kararlı hale gelen p53'ün, hedef genlerinden biri olan Bax ekspresyonunu arttırarak hücreyi apoptoza yönlendirdiği, diğer yandan ekstraktın yüksek konsantrasyonunda görülen azalmanın ise artık bu dozun hücre için toksik olduğunu düşündürmektedir.

Ekstraktın MCF-7 hücre serisinde apoptoz ve mitokondriyal membran proteinleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda; kırmızı Brezilya propolisinin proapoptotik Bax proteinin artışına ve antiapoptotik Bcl-2 proteinin azalmasına neden olarak apoptotik prosesleri harekete geçirdiği, ayrıca kaspaz aktivitesini arttırdığı (170), Chou ve ark. (181) propolisin ana bileşenlerinden olan kuersetinle yaptıkları çalışmada ise, kuersetinin hem ekstrinsik hemde intrinsik apoptoz yollarını aktifleyerek apoptozu indüklendiği bildirilmiştir. Propolis ve bileşenleriyle farklı hücre serilerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde; Mısır propolisinin prostat kanseri hücre serisinde apoptozu aktive ettiği, p53 ve Bax proteinlerinin ekspresyon seviyelerini arttırdığı (203), Brezilya propolisinin ve ondan izole edilen baccharin, drupanin ve artepilin C bileşiklerinin kolon (SW-480) ve HL-60 hücre serilerinde apoptotik etki gösterdiği (204), galanginle baş-boyun skuamöz kanser (HNSCC) hücrelerinde yapılan çalışmada Bcl-2 protein seviyesinin azaldığı ve Bax protein seviyesinin arttığı belirtilmiştir (183).

Polifenollerce zengin ekstraktların antikanser özellik göstermelerinin sebeplerinden biride onların prooksidan özellikte olabilmelerinden kaynaklanmaktadır (205). Literatürde propolis ekstraktlarının ve propolis içeriğinde yer alan bileşenlerin hücre içi ROS miktarını arttırdığına ve sitotoksik etki mekanizmalarını harekete geçirebildiğine dair çalışmalar mevcuttur (1, 166, 171). Ekibimiz tarafından yapılan bir başka çalışmada A549 hücrelerinde hücre içi ROS miktarının arttırıldığı gösterilmiştir (19).

Çalışmamızda görülen proapoptotik etkinin intrinsik apoptoz yolağı üzerinden gerçekleşmiş olduğu düşünmekteyiz. Ayrıca literatür ışığında ekstrinsik yolak üzerinde etki ettiği düşünülen moleküllerin propolis ekstraktı içerisinde yer alması sebebiyle, bu apoptotik yolağında araştırılması gerektiği kanaatindeyiz.

Tümör dokularında görülen anormal miRNA ekspresyonlarındaki değişikliklerin altında yatan mekanizmaları anlayabilmek amacıyla miRNA'ları içeren çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (206-208). Son yıllarda literatürde polifenol bileşiklerin bilinen özelliklerinin yanısıra, çeşitli onkojenik veya tümör supresör miRNA'ları hedefleyerek gen ifadelerini düzenleyebileceği öne sürülmektedir (8, 14, 15). Bu bilgiler ışığında polifenol ve flavonoid içeriği açısından zengin olan Türk propolisinin MCF-7 hücre serisindeki miRNA (miR-34, miR-15a miR-16-5p, miR-145, miR-21) ekspresyon seviyelerine etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

miRNA ekspresyon analizi; RT-qPCR yöntemi, northern blotting ve mikroarray gibi yarı niceliksel yöntemlerle gerçekleştirilebilir (209, 210). RT-qPCR, nükleik asit tespiti ve nicelleştirilmesi için altın standart olarak kabul edilmektedir (206). Chen ve ark. (153) tarafından tasarlanan stem-loop RT-qPCR, oldukça basit, hassas, tekrarlanabilir ve spesifik miRNA'ların niceliksel tespiti için en çok tercih edilen yöntemdir. Propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisindeki miRNA seviyelerine etkisi stem-loop RT-qPCR yöntemiyle incelendi ve miRNA'nın ekspresyon seviyesinin nicelleştirilmesi için  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  yöntemi kullanıldı (154).

Propolisten izole edilen bileşenlerin miRNA seviyelerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda; kuersetinin over kanserinde miR-145'i düzenlediği (207), A549 hücre serisinde miR-16 ekspresyonunu (211) ve let-7 ailesini, miR-125a, miR-183, miR-146a, miR-98, miR-19b, miR-106a, miR-381 gibi tümör supresör miRNA'ların ekspresyonunu arttığı belirtilmiştir. Luteolinle muamele edilen mide kanseri hücrelerinde miR-34a ekspresyonunun arttığı ve apoptozun uyarıldığı belirtilmiştir (212). Genistein tedavisinin lenfositik lösemi hücrelerinde miR-16'yı, prostat kanserinde ise miR-145'in ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (213). Kurkuminin MCF-7 hücre serisinde; miR-21'in ekspresyonunu doza bağlı olarak azalttığı ve miR-21/PTEN/Akt sinyal yolunun antikanser etkisi için önemli bir mekanizma olduğu (214), doz bağımlı olarak miR-15a ve miR-16 ekspresyonunu arttırdığı ve Bcl-2'nin ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiştir (12). Yapılan çalışmalar doğal bileşenlerin veya fitokimyasalların kansere bağlı birçok miRNA'nın ekspresyonunu kontrol edebileceğini göstermektedir (212, 213, 215, 216). Bu bileşenlerin epigenetik değişimler (histon asetilasyonu, DNA metilasyonu), transkripsiyonel (p53, c-myc) ve miRNA biyogenez aşamasındaki çeşitli

mekanizmalarla (Drosha ve Dicer fonksiyonunu regüle ederek miRNA'ların olgunlaşması) ekspresyonunu düzenlediği öne sürülmektedir (13, 213, 217).

Çalışmamızda p53'ün hücre döngüsünde ve hücre canlılığının düzenlenmesinde görev alan miRNA'lar ve hedef molekülleri MCF-7 hücre serisi göz önüne alınarak belirlendi (93). miRNA'lar p53 yolağında büyük etkisi olan küçük yardımcı moleküller olarak görülmektedir (218). p53'ün transkripsiyonel olarak miR-34 ailesinin tüm üyelerinin ekspresyonunu indüklediği ve miR-34'ün hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre döngüsü durdurulmasını kontrol eden Bcl-2, SIRT1, p21, siklin D1, siklin E2, E2F3/5 ve CDK4/6 gibi çeşitli moleküller üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (202, 219). Etanolik propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisindeki miR-34 üzerine etkisine bakıldığında doza bağlı olarak miR-34 ekspresyonunda anlamlı artış olduğu gözlenmiştir. Bu artışın p53 düzeyleriyle de ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

miR-15/16 kümesi tarafından kodlanan miRNA'ların tümör süpresör olarak davrandıkları bilinmektedir (220, 221). p53 bağımlı miR-15/16 ailesinin; siklin D, siklin E, CDK6/4, Bcl-2 gibi hücre döngüsü ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu modüle ettiği belirtilmiştir (222, 223). Propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde doza bağlı olarak miR-15a ve miR-16-5p'nin ekspresyonlarını anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir.

Literatürde miR-145'in p53 tarafından düzenlendiği (97), fitokimyasallarla yapılan çalışmalarda miR-145'in ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir (207, 213). Çalışmamızda miR-145 ekspresyonunun gözlenememesinin sebepleri arasında, RNA' da gözlenen kırılmalar, prob veya primer degradasyonu olabileceğini düşünmekteyiz.

miR-34, miR-15a, miR-16-5p'nin ekspresyonu sonucu elde edilen verilerin literatürle benzer olması, hücre döngüsünün G1 evresinde durdurulması, apoptozda görülen artış, bu miRNA'ların p53 aktivasyonu üzerinden apoptoz ve hücre döngüsünün durdurulmasına katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. p53'ün, miRNA'ları ağırlıklı olarak transkripsiyonel aşamada aktive ya da inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu düzenlenmenin daha net ortaya konması için p53 geninin susturularak deneysel çalışmaların desteklenmesi, p53'ün transkripsiyon sonrası aşamada Drosha ve Dicer fonksiyonunu regüle ederek miRNA'ların olgunlaşmasına ve mRNA erişilebilirliğine

katkısının da belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca polifenolik bileşiklerin neden olduğu epigenetik değişikliklerin incelenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Onkojenik karaktere sahip olan miR-21'in pek çok kanser türünde aşırı eksprese olduğu belirtilmiştir (224). Meme kanserinde miR-21'in hedefleri arasında PTEN, TPM1, PDCD4, Bcl-2, APAF1, p21 ve maspin yer almaktadır (214, 225, 226). İnsanlarda veya farelerde p53'ün miR-21 bağlanma bölgesi yoktur, ancak miR-21'in p53 ağı içinde birden fazla genin baskıladığını gösteren çalışma mevcuttur (226).

Çalışmamızda propolis ekstraktının MCF-7 hücre serisinde miR-21 üzerine etkisine baktığımızda negatif kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüştür. Literatürle karşılaştırıldığında elde edilen verilerin benzer olduğu ve olası etki mekanizmalarının miR-21/PTEN/Akt sinyal yolu üzerinden gerçekleşebileceği veya artan PDCD4 ekspresyonunun aktivatör protein (AP)-1 baskılaması sonucu olabileceği düşünülmektedir (214, 227, 228).

Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan propolis örneklerinde kuersetin, benzoik asit, kafeik asit, ferulik asit, krisin gibi bileşikler açısından zengin olduğu bildirilmektedir (229-231). Uzel ve ark. yaptıkları çalışmada ise Trabzon yöresinden toplanan propolis örneklerinde başta pinocembrin olmak üzere isalpinin, pinostropin, naringenin, krisin, 3,4,7-trimetoksi flavanon, pinobanksin, kuersetin, galangin, apigenin, benzoik asit ve kafeik asit gibi bileşenlerce zengin olduğunu gösterilmiştir (232). Çeşitli doğal ürünlerden hazırlanan ekstraktların sitotoksik özelliklerinin incelendiği çalışmalarda sonuçların sinerjik etkiye atfedildiği görülmektedir (233). Bu çalışma, Türk propolisinin etanollü ekstraktının MCF-7 hücre serisindeki sitotoksik etkisini; hücre döngüsünü durdurarak, apoptozu, prooksidan olarak davranan bileşenlerin p53 stabilizasyonunu sağlayıp supresör miRNA'ların seviyelerini arttırarak ortaya koyan ilk çalışma olmuştur. Ancak polifenol, miRNA ve kanser arasındaki ilişkinin ortaya konmasında daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu açıktır. Gerek propolis gerekse propolisten izole edilen bileşenlerle çalışmaların farklı kanser hücre serilerinde ve deneysel yaklaşımlarla devam ettirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmalardan da elde edilecek bilimsel veriler ışığında; ilaç direncinin aşılması veya önlenmesi, yan etkilerin azaltılması, yeni tedavi rejimleri oluşturulması ve kanser hastalarının yaşam kalitesinin

artırılması için önemli bilgiler sağlanacaktır. Ayrıca Türk propolisinin gıda katkısı ve sağlık alanında etkin kullanımını daha da artabileceği öngörülmektedir.



## 8. KAYNAKLAR

1. Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T (2012). Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *JBPC* 3: 156-173.
2. Monteiro LS, Bastos KX, Barbosa-Filho JM, Athayde-Filho PF, Diniz MFFM, Sobral MV (2014). Medicinal plants and other living organisms with antitumor potential against lung cancer. *Evid Based Complement Alternat Med* ID 604152, 15 pages.
3. Olfat S, Moataz M, Yasser N, George M, Ziad G (2015). Role of microRNAs-29b-2,-155,-197 and-205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females. *Gene* 560: 77-82.
4. Tan W, Lu J, Huang M, Li Y, Chen M, Wu G, Gong J, Zhong Z, Xu Z, Dang Y, Guo J, Chen X, Wang Y (2011). Anticancer natural products isolated from Chinese medicinal herbs. *Chin Med* 6: 27.
5. Mısır S (2013). Türk propolisinin farklı çözücülerdeki ekstraktlarının radikal yakalama ve demir şelatlama aktivitesinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
6. Szliszka E, Krol W (2013). Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL induced apoptosis in cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* ID 731940, 10 pages.
7. Gao K, Henning SM, Niu Y, Youssefian AA, Seram NP, Xu A, Heber D (2006). The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* 17: 89-95.
8. Link A, Balaguer F, Goel A (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol* 80: 1771-1792.
9. Kim SJ, Oh JS, Shin JY, Lee KD, Sung KW, Nam SJ, Chun KH (2011). Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer. *J Control Release* 155: 427-434.
10. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2007). MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302: 1-12.
11. Fix LN, Shah M, Efferth T, Farwell MA, Zhang B (2010). MicroRNA expression profile of MCF-7 human breast cancer cells and the effect of green tea polyphenon-60. *Cancer Genom Proteom* 7: 261-277.



12. Yang J, Cao Y, Sun J, Zhang Y (2010). Curcumin reduces the expression of Bcl-2 by upregulating miR-15a and miR-16 in MCF-7 cells. *Med Oncol.* 27: 1114-1118.
13. Izzotti A, Cartiglia C, Steele VE, De Flora S (2012). MicroRNAs as targets for dietary and pharmacological inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 751: 287-303.
14. Blade C, Baselga-Escudero L, Arola-Arnal A (2014). microRNAs as new targets of dietary polyphenols. *Curr Pharm Biotechnol* 15: 343-351.
15. Milenkovic D, Jude B, Morand C (2013). miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. *Free Radic Biol Med* 64: 40-51.
16. Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C (2015). Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evid Based Complement Alternat Med* ID 206439, 29 pages.
17. Sforcin JM, Bankova V (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 133: 253-260.
18. Sforcin JM (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother Res* 30: 894-905.
19. Demir S (2015). Türk propolisinin akciğer kanseri (A549) hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
20. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evid Based Complement Alternat Med* ID 964149, 11 pages.
21. Bankova V, Milena P, Trusheva B (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem Cent J* 8: 28.
22. De Groot AC (2013). Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis* 24:263-282.
23. Król W, Bankova V, Sforcin JM, Szliszka E, Czuba Z, Kuropatnicki AK (2013). Propolis: properties, applications, and its potential. *Evid Based Complement Altern Med* ID 807578, 2 pages.
24. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19: 19610-19632.

25. Daleprane JB, Abdalla DS (2013). Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evid Based Complement Altern Med* ID 175135, 8 pages.
26. Wagh VD (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Sci* ID 308249, 11 pages.
27. Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, Świerczek-Zięba G (2013). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 19: 78-101.
28. Abubakar MB, Abdullah WZ, Sulaiman SA, Ang BS (2014). Polyphenols as key players for the antileukaemic effects of propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* ID 371730, 11 pages.
29. Sawicka D, Car H, Borawska MH, Nikliński J (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia Histochem Cyto* 50: 25-37.
30. Ivona Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, Smolic-Bubalo A, Medic-Saric M, Mayer L, Romic Z, Bucan K, Balog T, Sobocanec S, Sverko V (2007). In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J Ethnopharmacol* 110: 548-554.
31. Kolankaya D, Selmanoğlu G, Sorkun K, Salih B (2002). Protective effects of Turkish propolis on alcohol induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chem* 78: 213-217.
32. Turan İ (2011). Türk propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde genotoksisite üzerinde etkisinin DNA tamir enzimleri vasıtasıyla incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
33. Chirinos R, Betalleluz-Pallardel I, Huaman A, Arbizu C, Pedreschi R, Campos D (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa*Mol) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chem* 113: 1243-1251.
34. Rajoo M, Parolia A, Pau A, Amalraj FD (2014). The role of propolis in inflammation and orofacial pain: A review. *Annu Res Rev Biol* 4: 651-664.
35. Watanabe MAE, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol* 63: 1378-1386.

36. Bencovic V, Orsollic N, Knezevic A, Ramic S, Dikic D, Basic I, Kopjar N (2008). Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gammairradiated mice: The alkaline comet assay study. *Biol Pharm Bull* 31: 167-172.
37. Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan İ, Cakiroglu TN, Akalin I, Deger O, Bedir A (2011). Preventive and protective effects of Turkish propolis on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biol Hung* 62: 388-396.
38. Turan I, Demir S, Misir S, Kilinc K, Mentese A, Aliyazicioglu Y, Deger O (2015). Cytotoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines. *Trop J Pharm Res* 14: 777-782.
39. Zizic JB, Vukovic NL, Jadranin MB, Andelkovic BD, Tesevic VV, Kacaniova MM, Sukdolak SB, Markovic SD (2013). Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *J Sci Food Agric* 93: 3001-3009.
40. Turan I, Değer O, Aliyazicioğlu Y, Demir S, Kiliñç K, Sümer A (2015). Effects of turkish propolis on expression of Hogg-1 And Neil-1. *Turk J Med Sci* 45: 804-811.
41. Demir S (2010). Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
42. Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK (2001). Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Curr Sci* 80: 1387-1396.
43. Premratanachai P, Chanchao C (2014). Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pac J Trop Biomed* 4: 337-344.
44. Khan AA, Rahmani AH, Aldebasi YH, Aly SM (2014). Biochemical and pathological studies on peroxidases-an updated review. *Glob J Health Sci* 6: 87-98.
45. Takım K (2010). Kiraz yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin ve oksidatif DNA hasarı üzerine etkisinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.

46. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.
47. Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU (2012). Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Bioeng* 3: 997-1019.
48. Vera-Ramirez L, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC, Ramirez-Tortosa CL, Granados-Principal S, Lorente JA, Quiles JL (2011). Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 347-368.
49. Nourazarian AR, Kangari P, Salmaninejad A (2014). Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 4745-4751.
50. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Age Res Rev* 12: 376-390.
51. Breinholt VM, Molck AM, Svendsen GW, Daneshvar B, Vinggaard AM, Poulsen M, Dragst ed LO (2003). Effects of dietary antioxidants and 2-amino-3-methylimidazole(4,5-f)-quinoline (IQ) on preneoplastic lesions and on oxidative damage, hormonal status, and detoxification capacity in the rat. *Food Chem Toxicol* 41: 1315-1323.
52. Shi M, Guo N (2009). MicroRNA expression and its implications for the diagnosis and therapeutic strategies of breast cancer. *Cancer Treat Rev* 35: 328-334.
53. Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Yaman Ozer S, Akbulut K, Kilinc K, Deger O (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutr Cancer* 68:165-172.
54. Özdemir SY (2013). Meme kanserinde PIWIL-1 PIWIL-2, DICER-1, VE DDX-4 gen düzeylerinin araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kayseri.
55. Nema R, Khare S, Jain P, Pradhan A, Gupta A, Singh D (2013). Natural products potential and scope for modern cancer research. *Am J Plant Sci* 4: 1270-1277.
56. Cabadak H (2008). Hücre Siklusu ve Kanser. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 9: 51-61.

57. Raghu R, Lu K-H, Sheen L-Y (2012). Recent research progress on garlic as a potential anticarcinogenic agent against major digestive cancers. *J Tradit Complement Med* 2: 192-201.
58. Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
59. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 4: 646-674.
60. Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G, Hortobagyi GN (2004). Breast carcinoma in men: a population-based study. *Cancer* 101: 51-57.
61. Andrew M, James ALB, Michael JK (2015). Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring. *Cancer Metastasis Rev* 34: 145-155.
62. Atmaca H (2013). Meme Kanseri Hücre Kültürlerinde Trabectedin (ET-743) Molekülünün Etkileştiği Moleküler Sistemlerin Araştırılması. Doktora Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
63. Parham JK, Asmah R, Patimah I, King-H L (2015). MicroRNA-based therapy and breast cancer: a comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment. *Pharmacol Res* 97:104-121.
64. Zaleska K (2015). miRNA-Therapeutic tool in breast cancer? Where are we now? *Rep Pract Oncol Radiother* 20: 79-86.
65. De Laurentiis M, Cianniello D, Caputo R, Stanzione B, Arpino G, Cinieri S, Lorusso V, De Placido S (2010). Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 36: 80-86.
66. Xie X, Hu Y, Xu L, Fu Y, Tu J, Zhao H, Zhang S, Hong R, Gu X (2015). The role of miR-125b-mitochondria-caspase-3 pathway in doxorubicin resistance and therapy in human breast cancer. *Tumour Biol* 36: 7185-7194.
67. Venkatadri R, Muni T, Iyer AK, Yakisich JS, Azad N (2016). Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell Death Dis* 7: e2104.
68. Tuncer S (2014). Çoklu İlaç Dirençli Kanser Hücre Hattına Nanopartiküllerle İlaç Aktarımı. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara.

69. Tao SF, He HF, Chen Q (2015). Quercetin inhibits proliferation and invasion acts by up-regulating miR-146a in human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 402: 93-100.
70. Glasauer A, Chandel NS (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 92: 90-101.
71. Kardeh S, Ashkani-Esfahani S, Alizadeh AM (2014). Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *Eur J Pharmacol* 735: 150-168.
72. Wijnhoven BPL, Michael MZ, Watson DI (2007). MicroRNAs and cancer. *Br J Surg* 94: 23-30.
73. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croc CM (2015). MicroRNA and cancer: a brief overview. *Adv Biol Regul* 57: 1-9.
74. Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV (2009). The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev* 84: 55-71.
75. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
76. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000). The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-906.
77. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV (2011). MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Derg* J 38: 113-120.
78. Ruvkun G (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294: 797-799.
79. Özgün MA (2010). Meme Kanserinde MikroRNA-21 ekspresyonu ve klinikopatolojik özellikler ile ilişkisi. Yandal Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Onkoloji Servis Şefliği, İstanbul.
80. Kent OA, Mendell JT (2006). A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 25: 6188-6196.
81. Lin S, Gregory RI (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 15: 321-333.

82. Javed A, Seyed EH, Maqsood AS, Maqsood A, Javed M, Abdulaziz AA (2013). MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: A new paradigm. *Indian J Med Res* 137: 680-694.
83. Aşçı DÇ, Aslan KP, Özçelik ÇN, Aslan KP, Özçelik N (2013). MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. *SDÜ Tıp Fak Derg* 20: 121-127.
84. Tunalı EN, Tiryakioğlu NO (2010). Kanserde mikroRNA'ların Rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 30: 1690-700.
85. Fabbri E, Brognara E, Borgatti M, Lampronti I, Finotti A, Bianchi N, Sforza S, Tedeschi T, Manicardi A, Marchelli R, Corradini R, Gambari R (2011). miRNA therapeutics: delivery and biological activity of peptide nucleic acids targeting miRNAs. *Epigenomics* 3: 733-745.
86. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce C M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 12: 580-587.
87. Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M (2012). microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol* 13: e249-5.
88. Landau DA, Slack FJ (2011). MicroRNAs in mutagenesis, genomic instability and DNA repair. *Semin Oncol* 38: 743-751.
89. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64: 3753-3756.
90. Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11: 597-610.
91. Kai ZS, Pasquinelli AE (2010). MicroRNA assassins; factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 17: 5-10.
92. Siomi H, Siomi MC (2010). Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell* 38: 323-332.
93. Hermeking H (2012). MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev* 13: 613-626.
94. Lima RT, Busacca S, Almeida GM, Gaudino G, Fennell DA, Vasconcelos MH (2011). MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. *Eur J Cancer* 47: 163-174.

95. Küçükhüseyin Ö, Öztürk O (2013). miRNAlar ve meme kanserindeki etkileri. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi* 5: 13-24.
96. Zamani AG, Zamani A (2013). MikroRNA'lar ve akciğer kanseri. *Tuberk Toraks* 61: 57-62.
97. Cui SY, Wang R, Chen LB (2014). MicroRNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways. *J Cell Mol Med* 18: 1913-1926.
98. Davis-Dusenbery BN, Hata A(2010). MicroRNA in cancer: the involvement of aberrant microRNA biogenesis regulatory pathways. *Genes Cancer* 1: 1100-1114.
98. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004). An oligonucleotide microchip for genomewide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9740-9744.
100. Rzepecka-Stojko A, Kabała-Dzik A, Moździerz A, Kubina R, Wojtyczka RD, Stojko R, Dziedzic A, Jastrzębska-Stojko Ż, Jurzak M, Buszman E, Stojko J (2015). Caffeic acid phenethyl ester and ethanol extract of propolis induce the complementary cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines. *Molecules* 20: 9242-9262.
101. Mostafapour KH, Salimi M, Khorri V, Rastkari N, Amanzadeh A, Salimi M (2016). Mitochondrial apoptosis induced by chamaemelum nobile extract in breast cancer cells. *Iran J Pharm Res* 15: 197-204.
102. Ivona JI, Mornar A, Debeljak Z, Smolcic-Bubalo A, Medic-Saric M, Mayer L, Romic Z, Bucan K, Balog T, Sobocanec S, Sverko V (2007). In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J Ethnopharmacol* 110: 548-554.
103. Ferguson LR (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res* 475: 89-111.
104. Marchand L (2002). Cancer preventive effects of flavonoids: a review. *Biomed Pharmacother* 56: 296-301.
105. Aktuğ H (2014). Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Journal of Medicine* 53: 60-64.
106. Verbon EH, Post JA, Boonstra J (2012). The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 511: 1-6.



107. Wong EV (2009). Cells: Molecules and Mechanisms. Cell Cycle. Axolotl Academic Publishing, Chapter 15, 229-252.
108. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif 36: 131-149.
109. Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M (2013). Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. Pharmacol Ther 138: 255-271.
110. Bueno MJ, Malumbres M (2011). MicroRNAs and the cell cycle. Biochim Biophys Acta 1812: 592-601.
111. Sankari LS, Masthan KMK, Aravindhya BN, Bhattacharjee T, Elumalai M (2012). Apoptosis in cancer-an update. Asian Pacific J Cancer Prev 13: 4873-4878.
112. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH, Bazan NG, Bertrand MJ, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredeisen DE, Brenner C, Campanella M, Candi E, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DiDaniele N, Dixit VM, Dynlacht BD, ElDeiry WS, Fimia GM, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Joseph B, Jost PJ, Kaufmann T, Kepp O, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, Lopez-Otin C, Lugli E, Madeo F, Malorni W, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Meier P, Melino S, Mizushima N, Moll U, Munoz-Pinedo C, Nunez G, Oberst A, Panaretakis T, Penninger JM, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Ravichandran KS, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Shi Y, Simon HU, Stockwell BR, Szabadkai G, Tait SW, Tang HL, Tavernarakis N, Tsujimoto Y, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Villunger A, Wagner EF, Walczak H, White E, Wood WG, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. Cell Death Differ 22: 58-73.
113. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal LM (2015). A time to kill: targeting apoptosis in cancer. Int J Mol Sci 16: 2942-2955.

114. Yazıcı P, Alizadehshargh S, Akdoğan GG (2009). Apoptoz: düzenleyici moleküller, hastalıklarla ilişkisi ve apoptozu saptama yöntemleri. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 29: 1677-1686.
115. Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z (2012). Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg* 3: 11.
116. Elmore S (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516.
117. Liang CH, Wang GH, Chou TH, Wang SH, Lin RJ, Chan LP, So EC, Sheu JH (2012). 5-epi-Sinuleptolide induces cell cycle arrest and apoptosis through tumor necrosis factor/mitochondria-mediated caspase signaling pathway in human skin cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1820: 1149-1157.
118. Fulda S (2010). Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. *Planta Medica* 76: 1075-1079.
119. Atagün G, Eren Z, Gürkanlı İ (2011). Apoptoziste mitokondrinin rolü. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 4: 49-53.
120. Helton ES, Xinbin C (2007). p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* 100: 883-896.
121. Zhenyi S, Zuozhang Y, Yongqing X, Yongbin C, Qiang Y (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget* 6: 11.
122. Chen Y, Fu LL, Wen X, Liu B, Huang J, Wang JH, Wei Y Q (2014). Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy. *Apoptosis* 19: 1177-1189.
123. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget* 6: 8474-8490.
124. Li C, Hashimi SM, Good DA, Cao S, Duan W, Plummer PN, Mellick AS, Wei MQ (2012). Apoptosis and microRNA aberrations in cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39: 739-746.
125. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Phytorem* 288: 369-376.
126. Tolosa L, Donato MT, Gomez-Lechon MJ (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods Mol Biol* 1250: 333-348.

127. Mosmann, T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
128. Goiato MCA, Freitas E, Santos DD, Medeiros RD, Sonogo M (2015). Acrylic resin cytotoxicity for denture base -literature review. *Adv Clin Exp Med* 24: 679-686.
129. Taneli F (2007). Methodology of flow cytometry and its role in clinical laboratory. *Journal of Turkish Clinical Biochemistry* 5: 75-82.
130. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 37: 163-176.
131. Karaboz İ, Kayar E, Akar S (2008). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* 6: 1-18.
132. Demirel D (1995). Flow sitometrik DNA analizinin temel prensipleri. *Türk Patoloji Dergisi* 11: 64-65.
133. Martinez MM, Reif RD, Pappas D (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Anal Methods* 2: 996-1004.
134. Ulukaya E, Acilan C, Ari F, İkitimur E, Yılmaz Y (2011). A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turk J Biochem* 36: 261-269.
135. Sankari SL, Masthan KMK, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M (2012). Apoptosis in cancer: An update. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 4873-4878.
136. Dinçel GÇ, Kul O (2016). Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri. *Gümüşhane University Journal of Health Sciences* 5: 86-108.
137. Henry CM, Hollville E, Martin SJ (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* 61: 90-97.
138. Welinder C, Ekblad L (2011). Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res* 10: 1416-1419.
139. Signore M and Reeder KA (2012). Antibody validation by Western blotting. *Methods Mol Biol* 823: 139-155.
140. Kubista M, Andrade JM, Bangtsson M, Forootan A (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27: 95-125.

141. Clementi M, Bagnarelli P (2015). Are three generations of quantitative molecular methods sufficient in medical virology? *New Microbiol* 38: 437-441.
142. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (2005). Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *J Mol Endocrinol* 34: 597-601.
143. Schwarzenbach H, Silva AM, Calin G, Pantel K (2015). Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification? *Clin Chem* 61: 1333-1342.
144. Kappel A, Keller A (2017). miRNA assays in the clinical laboratory: workflow, detection technologies and automation aspects. *Clin Chem Lab Med* 55: 636-647.
145. Slinkard K, Singleton VL (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult* 28: 49-55.
146. Çakıroğlu TN (2010). Çeşitli çözücülerde Türk propolisinin çözünürlüğünün incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
147. Lin JY, Tang CY (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry* 101: 140-147.
148. Teerasripreecha D, Phuwapraisirisan P, Puthong S, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Chanchao C (2012). In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complement Altern Med* 12: 27.
149. Kern KM, Schroeder JR (2014). Comparison of cantharidin toxicity in breast cancer cells to two common chemotherapeutics. *Int J Breast Cancer ID* 423059, 7 pages.
150. Skinner R, Trujillo A, Ma X, Beierle E (2009). Ketone bodies inhibit the viability of human neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg* 44: 212-216.
151. Hsu HF, Huang KH, Lu KJ, Chiou SJ, Yen JH, Chang CC, Houg JY (2011). Typhonium blumei extract inhibits proliferation of humanlung adenocarcinoma A549 cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Ethnopharmacol* 135: 492-500.
152. Sarı C (2016). Kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in farklı kolorektal kanser hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri ve survivin ekspresyonundaki değişimler.

Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

153. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loopRT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33: e179.
154. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  method. *Methods* 25: 402-408.
155. Sayeed MA, Bracci M, Lazzarini R, Tomasetti M, Amati M, Lucarini G, Primio RD, Santarelli L (2017). Use of potential dietary phytochemicals to target miRNA: Promising option for breast cancer prevention and treatment? *J Funct Foods* 28: 177-193.
156. Shaker O, Maher M, Nassar Y, Morcos G, Gad Z (2015). Role of microRNAs - 29b-2,-155,-197 and-205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females. *Gene* 560: 77-82.
157. Duo J, Ying GG, Wang GW, Zhang L (2012). Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Mol Med Rep* 5: 1453-1456.
158. Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal* 41: 1220-1234.
159. Khachananda S, Tragoolpua K, Chantawannakul P, Tragoolpua Y (2013). Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 6991-6995.
160. Barlak Y, Deger O, Colak M, Karatayli SC, Bozdayi AM, Yucesan F (2011). Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Sci* 9: 74.
161. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem* 84: 329-339.

162. Mihai CM, Mărghitaş LA, Dezmirean DS, Bărnuţiu L (2011). Correlation between polyphenolic profile and antioxidant activity of propolis from Transylvania. *Anim Sci Biotechnol* 44: 2.
163. Yang H, Dong Y, Du H, Shi H, Peng Y, Li X (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules* 16: 3444-3455.
164. Socha R, Gałkowska D, Bugaj M, Juszczak L (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Product Res* 29: 416-422.
165. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 288: 369-376.
166. Russo A, Cardile V, Sanchez F, Troncoso N, Vanella A, Garbarino JA (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci* 76: 545-558.
167. Frión-Herrera Y, Díaz-García A, Ruiz-Fuentes J, Rodríguez-Sánchez H, Sforcin JM (2015). Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *J Pharm Pharmacol* 67: 1448-1456.
168. Szliszka E, Czuba ZP, Bronikowska J, et al (2011). Ethanolic extract of propolis augments TRAIL-induced apoptotic death in prostate cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med* ID 535172, 11 pages.
169. Kouidhi B, Zmantar T, Bakhrouf A (2010). Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *Anaerobe* 16: 566-571.
170. Tetsuro K, Hiroko N, Hirokazu H, Tetsuo A (2012). Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. *J. Agric Food Chem* 60: 11065-11070.
171. Xuan H, Li Z, Yan H, Sang Q, Wang K, He Q, Wang Y, Hu F (2014). Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evid Based Complement Alternat Med* ID 280120, 11 pages.
172. Vatansever HS, Sorkun K, Gurhan ID, Ozdal-Kurt F, Turkoz E, Gencay O, Salih B (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem* 112: 546-556.

173. Özay G, Ülker E (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi* 2: 73-78.
174. Clarke ST, Calderon V, Bradford JA (2017). Click chemistry for analysis of cell proliferation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* 82: 7.49.1-7.49.30.
175. Boonstra J, Post JA (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1-13.
176. Malumbres M, Barbacid M (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9: 153-166.
177. Mojžišová G, Kello M, Pilátová M, Tomečková V, Vašková J, Vaško L, Bernátová S, Mirossay L, Mojžiš J (2016). Antiproliferative effect of beta-escin-an in vitro study. *Acta Biochim Pol* 63: 79-87.
178. Popolo A, Piccinelli LA, Morello S, Cuesta-Rubio O, Sorrentino R, Rastrelli L, Pinto A (2009). Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. *Nat Prod Commun* 4: 1711-1716.
179. Wang P, Wang B, Chung S, Wu Y, Henning SM, Vadgama JV (2015). Increased chemopreventive effect by combining arctigenin, green tea polyphenol and curcumin in prostate and breast cancer cells. *RSC Adv* 4: 35242-35250.
180. Wu J, Omene C, Karkoszka J, Bosland M, Eckard J, Klein CB, Frenkel K (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Lett* 308: 43-53.
181. Chou CC, Yang JS, Lu HF, Ip SW, Lo C, Wu CC, Lin JP, Tang NY, Chung JG, Chou MJ, Teng YH, Chen DR (2010). Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Arch Pharm Res* 33: 1181-1191.
182. Weng MS, Ho YS, Lin JK (2005). Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol* 69: 1815-1827.
183. Zhu L, Luo Q, Bi J, Ding J, Ge S, Chen F (2014). Galangin inhibits growth of human head and neck squamous carcinoma cells in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact* 224: 149-156.

184. Cho HJ, Park JHY (2013). Kaempferol induces cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *J Cancer Prev* 18: 257-263.
185. Buahorm S, Puthong S, Palaga T, Lirdprapamongkol K, Phuwapraisirisan P, Svasti J, Chanchao C (2015). Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. *Daru* 23:55.
186. Shimizu K, Das SK, Hashimoto T, Sowa Y, Yoshida T, Sakai T, Matsuura Y, Kanazawa K (2005). Artepillin C in Brazilian propolis induces G0/G1 arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. *Mol Carcinog* 44: 293-299.
187. Yuan Z, Long C, Junming T, Qihuan L, Youshun Z, Chan Z (2012). Quercetin-induced apoptosis of HL-60 cells by reducing PI3K/Akt. *Mol Biol Rep* 39: 7785-7793.
188. Sutandy FX, Qian J, Chen CS, Zhu H (2013). Overview of protein microarrays. *Curr Protoc Protein Sci*. Chapter 27:Unit 27.1.
189. Berggard T, Linse S, James P (2007). Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 7: 2833-2842.
190. Watabe S, Morikawa M, Kaneda M, Nakaishi K, Nakatsuma A, Ninomiya M, Yoshimura T, Miura T, Ito E (2016). Ultrasensitive detection of proteins and sugars at single-cell level. *Commun Integr Biol* 9: e1124201.
191. Kurien BT, Scofield RH (2006). Western blotting. *Methods* 38: 283-293.
192. Seo HS, Ju JH, Jang K, Shin I (2011). Induction of apoptotic cell death by phytoestrogens by up-regulating the levels of phospho-p53 and p21 in normal and malignant estrogen receptor  $\alpha$ -negative breast cells. *Nutr Res* 31: 139-146.
193. Gartel AL (2009). p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm? *Biofactors* 35: 161-164.
194. Liu S, Bishop WR, Liu M (2003). Differential effects of cell cycle regulatory protein p21 WAF1/Cip1 on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Update* 6: 183-195.
195. Gartel AL, Radhakrishnan SK (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 65: 3980-3985.



196. Motomura M, Kwon KM, Suh SJ, Lee YC, Kim YK, Lee IS, Kim MS, Kwon DY, Suzuki I, Kim CH (2008). Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *Environ Toxicol Pharmacol* 26: 61-67.
197. Nguyen LT, Lee YH, Sharma AR, Park JB, Jagga S, Sharma G, Lee SS, Nam JS (2017). Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity. *Korean J Physiol Pharmacol* 21: 205-213.
198. Ranganathan S, Halagowder D, Sivasithambaram ND (2015). Quercetin suppresses twist to induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 10: e0141370.
199. Meng LH, Kohn KW, Pommier Y (2007). Dose-response transition from cell cycle arrest to apoptosis with selective degradation of Mdm2 and p21WAF1/CIP1 in response to the novel anticancer agent, aminoflavone (NSC 686,288). *Oncogene* 26: 4806-4816.
200. Deng J (2017). How to unleash mitochondrial apoptotic blockades to kill cancers? *Acta Pharm Sin B* 7: 18-26.
201. Zhao J, Lu Y, Shen HM (2012). Targeting p53 as a therapeutic strategy in sensitizing TRAIL induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Lett* 314: 8-23.
202. Novello C, Pazzaglia L, Conti A, Quattrini I, Pollino S, Perego P, Picci P, Benassi MS (2014). p53-dependent activation of microRNA 34a in response to etoposide induced DNA damage in osteosarcoma cell lines not impaired by dominant negative p53 expression. *PLoS One* 9: e114757.
203. Salim EI, Abd El-Magid AD, Farara KM, Maria DS (2015). Antitumoral and antioxidant potential of Egyptian Propolis against the PC3 prostate cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 7641-7651.
204. Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, Araki Y, Mishima S, Nozawa Y (2003). Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol Pharm Bull* 26: 1057-1059.

205. Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A (2000). Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life* 50: 167-171.
206. Yao XD, Li P, Wang JS (2017). MicroRNA differential expression spectrum and microRNA-125a-5p inhibition of laryngeal cancer cell proliferation. *Exp Ther Med* 14: 1699-1705.
207. Zhou J, Gong J, Ding C, Chen G (2015). Quercetin induces the apoptosis of human ovarian carcinoma cells by upregulating the expression of microRNA-145. *Mol Med Rep* 12: 3127-3131.
208. Tsang WP, Kwok TT (2010). Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells. *J Nutr Biochem* 21:140-146.
209. Mukhopadhyay CS, Verma R, Singh J (2017). Extraction and qPCR-Based detection of miRNAs from cultured PBMCs of bubaline origin. *Methods Mol Biol* 1656: 89-102.
210. Kadri S, Hinman VF, Benos PV (2011). RNA deep sequencing reveals differential microRNA expression during development of sea urchin and sea star. *PLoS One* 6: e29217.
211. Lam TK, Shao S, Zhao Y, Marincola F, Pesatori A, Bertazzi PA, Caporaso NE, Wang E, Teresa LM (2012). Influence of quercetin-rich food intake on microRNA expression in lung cancer tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21: 2176-2184.
212. Debnath T, Deb Nath NC, Kim EK, Lee KG (2017). Role of phytochemicals in the modulation of miRNA expression in cancer. *Food Funct* 8: 3432-3442.
213. Srivastava SK, Arora S, Averett C, Singh S, Singh AP (2015). Modulation of microRNAs by phytochemicals in cancer: underlying mechanisms and translational significance. *Biomed Res Int* ID 848710, 9 pages.
214. Wang X, Hang Y, Liu J, Hou Y, Wang N, Wang M (2017). Anticancer effect of curcumin inhibits cell growth through miR-21/PTEN/Akt pathway in breast cancer cell. *Oncol Lett* 13: 4825-4831.
215. Mudduluru G, George-William JN, Muppala S, Asangani IA, Kumarswamy R, Nelson LD, Allgayer H (2011). Curcumin regulates miR 21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Biosci Rep* 31: 185-197.

216. Tili E, Michaille JJ, Alder H, Volinia S, Delmas D, Latruffe N, Croce CM (2010). Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor suppressors and effectors of TGF $\beta$  signaling pathway in SW480 cells. *Biochem Pharmacol* 80: 2057-2065.
217. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I (2015). MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics* 5: 1122-1143.
218. Goeman F, Strano S, Blandino G (2017). MicroRNAs as key effectors in the p53 network. *Int Rev Cell Mol Biol* 333: 51-90.
219. Zhao J, Lammers P, Torrance CJ, Bader AG (2013). TP53-independent function of miR-34a via HDAC1 and p21CIP1/WAF1. *Mol Ther* 21: 1678-1686.
220. Liu Q, Fu H, Sun F, Zhang H, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X (2008). miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res* 36: 5391-5404.
221. Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM (2010). miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ* 17: 215-220.
222. Mobarra N, Shafiee A, Rad SM, Tasharrofi N, Soufi-Zomorod M, Hafizi M, Movahed M, Kouhkan F, Soleimani M (2015). Overexpression of microRNA-16 declines cellular growth, proliferation and induces apoptosis in human breast cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 51: 604-611.
223. Janaki Ramaiah M, Lavanya A, Honarpisheh M, Zarea M, Bhadra U, Bhadra MP (2014). miR-15/16 complex targets p70S6 kinase 1 and controls cell proliferation in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Gene* 552: 255-264.
224. Pan X, Wang ZX, Wang R (2010). MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biol Ther* 10: 1224-1232.
225. Hemmatzadeh M, Mohammadi H, Jadidi-Niaragh F, Asghari F, Yousefi M (2016). The role of oncomirs in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 78: 129-139.
226. Ma X, Choudhury SN, Hua X, Dai Z, Li Y (2013). Interaction of the oncogenic miR-21 microRNA and the p53 tumor suppressor pathway. *Carcinogenesis* 34: 1216-1223.

227. Zhou C, Ding J, Wu Y (2014). Resveratrol induces apoptosis of bladder cancer cells via miR 21 regulation of the Akt/Bcl 2 signaling pathway. *Mol Med Rep* 9: 1467-1473.
228. Yang FQ, Liu M, Li W, Che JP, Wang GC, Zheng JH (2015). Combination of quercetin and hyperoside inhibits prostate cancer cell growth and metastasis via regulation of microRNA 21. *Mol Med Rep* 11: 1085-1092.
229. Aliyazicioglu R, Sahin H, Erturk O, Ulusoy E, Kolayli S (2013). Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey. *Int J Food Prop* 16: 277-287.
230. Duran N, Muz M, Culha G, Duran G, Ozer B (2011). GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitol Res* 108: 95-105.
231. Temiz A, Sener A, Ozkok Tuylu A, Sorkun K, Salih B (2011). Antibacterial activity of bee propolis samples from different geographical regions of Turkey against two foodborne pathogens, *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Turk J Biol* 35: 503-511.
232. Uzel A, Sorkun K, Oncag O, Cogulu D, Gencay O, Salih B (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 160: 189-195.
233. Bufalo MC, Candeias JMG, Sforcin JM (2007). *In vitro* cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Evid Based Complementary Altern Med*. 6: 483-487.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** Sema MISIR  
**Doğum Tarihi/Yeri** 12.04.1985/TRABZON/AKÇAABAT  
**E-posta** semay-61@hotmail.com  
**Adres** KTÜ SABE, Tıbbi Biyokimya AD, Trabzon

### EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Fakülte/Bölüm	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Fakültesi/Kimya	KTÜ	2005-2009
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2009-2012
Doktora	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2013-2017
Görev, Unvan	Görev Yeri		Yıl
Arş. Gör.	Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı		2013-devam

### YABANCI DİL

İngilizce

### YAYINLAR

#### Yüksek Lisans Tezi:

Türk Propolisinin Farklı Çözücülerdeki Ekstraktlarının Radikal Yakalama Ve Demir Şelatlama Aktivitesinin İncelenmesi

## **Makaleler**

1-Turan I, Demir S, Misir S, Kilinc K, Mentese A, Aliyazicioglu Y, Deger O (2015). Cytotoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast,cervix and prostate cancer cell lines. Trop J Pharm Res 14: 777-782.

2-Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Yaman Ozer S, Akbulut K, Kilinc K, Deger O (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. Nutr Cancer 68:165-172.

3-Yalcin CO, Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Bahat Z, Misir S, Deger O (2016). Evaluation of the radioprotective effect of Turkish propolis on foreskin fibroblast cells. Journal of Cancer Research and Therapeutics 12 (2) 990-994

4-Ozkan MT, Aliyazicioglu R, Demir S, Misir S, Turan I, Yildirmis S and Aliyazicioglu Y (2016). Phenolic Characterisation and Antioxidant Activity of Primula Vulgaris and Its Antigenotoxic Effect on Fibroblast Cells. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 12(1) DOI: 10.5812/jjnpp.40073.

5-Hepokur C, Misir S, Kariper A (2017). The Interaction of Clarithromycin with a New Polymer-Based Nipam-Sepiolite . Lat Am J Pharm 36 (2): 301-7

6-Hepokur C, Misir S, Kariper AI, and Hepokur AI (2017). Physical Interaction Between Water-Soluble Poly(Acrylamide/Itaconic Acid) with Acriflavine and Procainamide Hydrochloride. Asian Journal Of Chemistry 29(2):279-282.

7-Turan I, Demir S, Kılınç K, Aliyazıcıoğlu Y, Alver A, Misir S, Yaman SO, Akbulut K, Mentese A, Deger O (2017). Morus rubra Extract Induces G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Lung and Prostate Cancer Cells. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research 51(1):51-58.

8-Turan İ, Demir S, Aliyazıcıoğlu R, Mısır S, Aliyazıcıoğlu Y (2017). Dianthus carmelitarum Ekstraktının Antioksidan ve Sitotoksik Özelliklerinin İncelenmesi. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 7: 41-50.

