

**TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SAFRAN EKSTRATI OLAN KROSETİN'İN BAŞ-BOYUN KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Hazırlayan:
Bilge KALYONCU**

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ**

Ankara-2015

**TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SAFRAN EKSTRATI OLAN KROSETİN'İN BAŞ-BOYUN KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Hazırlayan:
Bilge KALYONCU**

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ**

Bu tez TUBİTAK 3001 projesi (Proje No: 114S358) kapsamında desteklenmiştir.

Ankara-2015

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

Bilge Kalyoncu

ONAYLAMA SAYFASI

Bilge KALYONCU tarafından hazırlanan “Safran Ekstratı Olan Krosetin’in Baş-Boyun Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, 16/06/2014 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda (*oybirliği/oyçokluğu*) ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....
Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ

Anabilim Dalı Başkanı

.....
Doç. Dr. Beyhan CENGİZ

.....
Yrd. Doç. Dr. Sultan YILMAZ

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince teorik ve deneysel yönden altyapı oluşturmamı sağlayan, bu süreçte tecrübeleri ile destek olan, tez çalışmalarım için olanak sağlayan değerli hocalarım Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ, Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ, Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR, Yrd. Doç. Dr. Sultan YILMAZ ÇİFTÇİ, Yrd. Doç. Dr. Murat ÖZNUR, Dr. Eyüp ÜÇTEPE, Dr. Sadık ÇİĞDEM ve Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Yıllardır hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman en büyük destekçilerim olan annem Fatma ATAR, babam Ekrem ATAR ve kardeşim Betül ATAR'a, bu dönemde bana her türlü destek veren hayat arkadaşım Ebuzer KALYONCU'ya ve laboratuvar çalışmalarımı yüksek lisansımın başından itibaren daha da keyifli kılan Turgut Özal Üniversitesi Tıbbi Genetik Ana Bilimdalı'nda eğitimini sürdürmekte olan tüm bölüm arkadaşlarıma ve çalışanlarına en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Farklı yöntemler kullanarak yaptığım deneysel çalışmalar sonucu hazırladığım tezimin, daha ileri çalışmalar için de bir basamak oluşturmasını temenni ediyorum.

Bilge KALYONCU

Ankara-Haziran 2015

ÖZET

Dünyada her yıl yaklaşık 12 milyon kişiye kanser tanısı konulmakta ve 7.6 milyon kişi kanserden yaşamını yitirmektedir. Yeni tedavi yöntemleri bulunmaması durumunda 2030 yılında dünya genelinde 26 milyon yeni kanser vakasına ve 17 milyon ölüme ulaşılacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise her yıl 200 bin yeni kanser vakasının ortaya çıktığını bilinmektedir.

Baş boyun kanseri erken teşhis edilemediğinde tedavisi çok güç olan bir kanser türüdür ve diğer kanserlerden farklı olarak vücudun diğer bölgelerine metastazının yanısıra, bulunduğu bölgede de ciddi hasarlar oluşturur. Bu nedenle hastada fiziksel ve psikolojik olarak oldukça yıkıcı bir hastalıktır. Baş ve boyun kanserlerinin %30'unun sigara ve alkol kullanımı gibi spesifik faktörlere uzun süre maruz kalmayla yakın ilişkisi olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur.

Krosetin; safrana rengini veren krosinin, kimyasal yapısının merkezini oluşturan doğal bir karotenoid dikarboksilik asittir. Çiğdem çiçeklerinde bulunur ve safrandan ekstrakte edilmektedir. 285°C'de ergiyen kırmızı kristaller oluşturur. Yapılan deneysel hayvan modellerinde ve hücre kültürü çalışmalarında, krosetin antitümör ajan olarak önemli bir potansiyel göstermiştir. Krosetin, antioksidan özelliğinden dolayı serbest radikalleri bağlayıcı etki göstermektedir. Ayrıca nükleik asit sentezini inhibe eder, büyüme faktörleri sinyal yollarını engelleyerek ve apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin büyüüp gelişmelerini engeller. Krosetinin etkisi şu ana kadar, meme, serviks, kolorektal, akciğer, karaciğer, pankreas ve cilt kanserleri üzerinde araştırılmış ve her birinde çeşitli etkiler gözlemlenmiştir. Aynı zamanda krosetin, kan kolesterol seviyesini dolaylı olarak düşürür ve ateroskleroz şiddetini yani kalp krizi riskini azaltır. Bizim çalışmamızda krosetinin etkisi baş boyun kanserinde iki farklı yönüyle (tümör ve metastatik olmak üzere) incelenmiş aynı zamanda sağlıklı fibroblast (HUC-F) hücre hattı kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Literatürde ilk kez yapılmış olan bu çalışma ile baş boyun kanseri hücre hattında krosetinin etkisi ortaya konmuştur. Çalışmamıza en yakın olan diğer bir çalışma özefagus skuamoz kanseri üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada sadece tek bir kanser hücre hattında krosetinin etkisini inceleyen deneyler yapılmıştır. Sözkonusu çalışmada da bizim sonuçlarımızı destekleyici sonuçlar elde edilmiştir.

Krosetin; özellikle kanser hücrelerinde apoptoza giden yolda etkili olan Bcl-2 ailesinin ekspresyonunu etkilemektedir. Proapoptotik gen olan Bax'ın ekspresyonunu artırıcı ve anti-apoptotik gen olan Bcl-2'nin ekspresyonunu inhibe edici etkisi saptanmıştır. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) Bcl-2 gen ailesinde tanımlanan ve apoptozu regule eden proteindir. Bcl-2 geninde meydana gelen hasarın, prostat, meme ve cilt kanseri gibi bir dizi kanserin nedeni olduğu tespit

edilmiştir. Bax geni Bcl-2 protein ailesinin ilk tanımlanan proapoptotik üyesidir. Bax geni ifadesi, tümör baskılayıcı protein olan p53 tarafından regüle edilir bu nedenle Bax, p53 aracılı apoptozda yer alır. Hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki homeostatik denge bozulduğunda kanserleşme başlar. Anti-apoptotik genlerin ekspresyonunun artması ve proapoptotik genlerin ekspresyonunun azalması kanserleşme ile sonuçlanabilir.

Bu çalışmada, daha önce yapılmış olan çalışmalardan farklı olarak; daha önce çalışma yapılmamış olan UT-SCC 74A (Baş boyun kanseri primer tümör hücre hattı), UT-SCC-74B(Baş boyun kanseri metastatik hücre hattı) ve kontrol grubu olarak HUC-F (fibroblast) hücre hatları üzerinde araştırma yapıldı ayrıca sadece proliferasyon değil, MTT, migrasyon, kaspaz3 aktivitesi analizleri yapıldı ve real time PCR analizi ile apoptoz ilişkili genler olan Bax ve Bcl-2'nin mRNA ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler incelendi. Diğer yandan Western Blotting ile krosetinin etkisini bu gen ürünlerinin proteinlerini görüntüleyerek ekspresyon farklılıkları doğrulandı. Çalışmamız sonucunda baş boyun kanseri üzerinde krosetinin anti-tümör etkisinin gözlemlendi. Bu şekilde farklı kanser çeşitleri üzerinde de bu etkilerin incelenmesinin yolu açılmış oldu ve krosetin kemoterapi ilaçları ile birlikte yan etkileri azaltmak amacıyla kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler:

1. Krosetin
2. Baş-boyun kanseri
3. Metastaz
4. Bax
5. Bcl-2
6. Apoptoz

ABSTRACT

[KALYONCU, Bilge]. [Investigation Of Effect Of Crocetin Extracted From Saffron On Head And Neck Primary Cancer And Metastaic Paired Cell Lines], [Master's Thesis], Ankara, [2015].

Every year worldwide 12 million people are diagnosed with cancer and 7.6 million people lose their lives to this disease. If no significant progress has been made, it is estimated that in the year 2030 these numbers will rise to 26 million diagnoses and 17 million deaths annually. In Turkey alone, every year 200,000 new cases of cancer develop.

The treatment of Head and Neck Cancer is difficult from other types of cancer if it is not early diagnosed. Head and neck cancer does metastasis into other organs as well as serious problems around face and head. So it causes physical and psychological problems on the patient. Head and neck cancer generally occurs because of drinking and smoking.

Crocetin is a natural carotenoid dicarboxylic acid. It is found in *Crocus Sativus* flowers and it used to make saffron extract. It has a melting point of 285°C and forms red crystals. Crocetin has been shown to have significant anti-tumor potential in both in vitro (cell culture) experiments and in animal models. Saffron is a commonly used spice and is also used as a food coloring agent. In ancient Arab, Indian and Chinese cultures, saffron was used as an herbal remedy for a number of illnesses including cancer. Crocetin affects the growth of cancer cells by enhancing the anti-oxidant system, inhibiting the synthesis of nucleic acids, hindering growth factor signalling pathways and by inducing apoptosis. To date, it has been shown to have numerous effects on many types of cancer including those of the breast, cervix, colorectal, lung, liver, pancreas and skin. In particular, in cancer cells it affects the expression of Bcl-2 family genes which are involved in apoptosis. It was shown that the expression of the pro-apoptotic gene Bax was increased and expression of the anti-apoptotic gene Bcl-2 was inhibited.

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) is a Bcl-2 family protein which regulates apoptosis. The damage which occur in Bcl-2 gene is responsible for prostate, breast and skin cancers. Bax was the first Bcl-2 family protein to be identified as pro-apoptotic. Bax gene expression is upregulated by the tumor suppressor p53 and is involved in p53-mediated apoptosis. Cancer development results from a loss of homeostatic balance between cell proliferation and apoptosis.

In our experiment, we investigated the antiproliferative effect of crocetin, which was extracted from saffron, and search for Bax and Bcl-2 genes' expression changes on primary and metastatic head and neck cancer paired cell lines. We used head and neck cancer primary tumor

(UT-SCC-74A) and metastatic (UT-SCC-74B) cell lines and fibroblasts(HUC-F), investigated the proliferation, migration, cell cycle and apoptosis of crocetin treated cells.

The cell lines were treated with different dosages of crocetin and their proliferation changes were recorded by using CELLigence device. The result of the different concentrations of crocetin on cell lines was showed an inverse proportion with proliferation. After crocetin treatment on UT-SCC-74A, UT-SCC-74B and HUC-F cell lines for 24h, RNA isolations with following cDNA synthesis were performed of the crocetin treated UT-SCC-74A, UT-SCC-74B and HUC-F cell lines for 24h. mRNA expression changes of Bax and Bcl-2 genes were determined and compared with control groups. For the first time we showed that crocetin treatment on UT-SCC-74A and UT-SCC-74B cell lines significantly increased mRNA expression and protein expression of Bax gene and significantly decreased mRNA expression and protein expression of Bcl-2 when compared with expression levels of mRNA and protein of HUC-F cells. When we compared the results of Real time PCR and western blotting, the changes of mRNA expression levels and protein expression levels are parallel to each other. The future studies should be continued on other cancer types and crocetin can be used with chemotherapeutic agents and may be obtained a better way to decrease side effects.

Keywords:

1. Crocetin
2. Head and Neck Cancer
3. Metastasis
4. Bax
5. Bcl-2
6. Apoptosis

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	i
ÖZETLER.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİL DİZİNİ.....	ix
TABLO DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1.BAŞ BOYUN KANSERİ.....	2
2.1.1. Baş Boyun Kanseri Etiyolojisi Ve Epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Baş Boyun Kanseri Belirtileri.....	6
2.1.3. Baş Boyun Kanseri İçin Tanı Yöntemleri.....	7
2.1.4. Baş Boyun Kanselerinde Evreleme.....	8
2.1.5. Baş Boyun Kanselerinde Tedavi Yöntemleri.....	8
2.1.6. Baş Boyun Kanselerinde Tedavi Seçim Kriterleri.....	9
2.1.7. Baş Boyun Kanselerinin Moleküler Biyolojisi.....	9
2.1.8. Baş Boyun Kanselerinde Gen Tedavisi Uygulamaları.....	11
2.2. BCL2 AİLESİ.....	12
2.2.1. Apoptoz ve BCL2 ailesi ilişkisi.....	13
2.2.2. BCL2 Özellikleri Ve Kanselerle İlişkisi.....	14
2.2.3. BAX Özellikleri ve Kanselerle ilişkisi.....	15
2.3.KROSETİN.....	15
2.3.1. Krosetinin Kaynağı: Safran.....	15
2.3.2. Krosetinin Özellikleri Ve Kullanım Alanları.....	16
2.3.3. Krosetin ve Kanseler İlişkisi.....	16
3. MATERYAL VE METOD.....	17
3.1.Hücre kültürü.....	18
3.1.1. Hücre kültüründe kullanılan medyumun hazırlanması.....	19
3.1.2. Hücre ekimi.....	19
3.1.3. Medyum Değişimi.....	19
3.1.4. Harvest İşlemi.....	20
3.1.5. Hücre sayımı.....	20
3.1.6. Krosetin Muamelesi.....	20

3.1.7. MTT.....	21
3.1.8. Xcelligence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi).....	21
3.2.TRİZOL ile Hücreden RNA İzolasyonu.....	22
3.3.cDNA Sentezi.....	23
3.4.Real-Time PCR.....	24
3.4.1. BAX ve BCL2 Primerlerin hazırlanması.....	24
3.4.2. Gradyent PCR.....	24
3.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	25
3.4.4. Jel Ekstraksiyonu.....	25
3.4.5. Real-time PCR İçin Standartların Hazırlanması.....	26
3.4.6. Real-time PCR protokolü.....	26
3.5.Hücreden Protein İzolasyonu.....	27
3.6.Western Blotting.....	27
3.6.1. Proteinlerin boyanması.....	27
3.6.2. Jel hazırlanması.....	28
3.6.3. Proteinlerin Jele Yüklenmesi.....	30
3.6.4. Membrana Transfer Aşaması.....	30
3.6.5. Birincil Antikorlarla Muamele.....	31
3.6.6. Yıkama.....	32
3.6.7. İkincil Antikorlarla Muamele.....	32
3.6.8. Yıkama ve Görüntüleme.....	32
3.7.Kaspaz-3 Activite Assay.....	32
3.7.1. Örnek Hazırlığı.....	32
3.7.2. Solüsyonların Hazırlanması.....	33
3.7.3. MTP Kaplama.....	33
3.7.4. Proteaz Aktivitesi Analizi.....	34
3.7.5. Kaspaz-3 Aktivite Analiz.....	34
3.7.6. Sonuçların Analizi.....	35
3.8. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	50
6. KAYNAKLAR.....	55

KISALTMALAR**Açıklaması**

UT-SCC.....	Squamous Cell Carcinoma
BAX.....	BCL2-Associated X Protein
BCL-2.....	B-cell CLL/lymphoma 2
HPV.....	Human Papilloma Virus
EBV	Ebstein Barr Virus
RTCA.....	Real Time Cell Analysis
AIF.....	Apoptoz İndükleyici Faktör
EGFR.....	Epidermal Growth Factor Receptor
RT.....	Radyoterapi
KT.....	Kemoterapi
EDTA.....	Etilendiamin tetraasetik asit
DMSO.....	Dimetil sülfoksit
SDS.....	Sodyum dodesil sülfat
TEMED.....	Tetramethylethylenediamine

Şekil 1. Baş boyun kanseri çeşitleri.....	2
Şekil 2. Baş boyun kanserinin görüldüğü bölgelerin anatomisi.....	3
Şekil 3. Baş-Boyun Kanserlerinde Gen Tedavisi Stratejileri.....	12
Şekil 4. Apoptotik ve Anti-apoptotik Bcl2 ailesi üyeleri.....	13
Şekil 5. Krosetinin kaynağı olan Çiğdem çiçeği (Crocus Sativus), safran ve ekstrakte edilmiş krosetin.....	15
Şekil 6. Krosetinin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 7. Çalışmamızda kullanılan metodların akış şeması.....	18
Şekil 8. Cell counter ile hücre sayımı ve canlılık oranı ölçümü.....	20
Şekil 9. Real time PCR için standartların hazırlanması.....	26
Şekil 10. Western blotting transfer aşaması.....	31
Şekil 11. Kaspaz 3 assay plate dizaynı.....	35
Şekil 12. Baş boyun kanseri tümör hücrelerine (UT-SCC-74A) farklı krosetin konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hücrelerin görünüşleri.....	37
Şekil 13. Baş boyun kanseri metastaz hücrelerine (UT-SCC-74B) farklı krosetin konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hücrelerin görünüşleri.....	37
Şekil 14. HUC-F (Fibroblast) hücrelerine farklı krosetin konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hücrelerin görünüşleri.....	38
Şekil 15. UT-SCC-74A, UT-SCC-74B ve HUC-F hücre hatlarında yapılan MTT testi sonuçları.....	38
Şekil 16. UT-SCC-74A hücrelerinin (Kırmızı 5000, yeşil 10000, mavi 20000 hücre/kuyucuk ekildi) gerçek zamanlı hücre analiz grafiği.....	39
Şekil 17. UT-SCC-74B hücrelerinin (Kırmızı 5000, yeşil 10000, mavi 20000 hücre/kuyucuk ekildi) gerçek zamanlı hücre analiz grafiği.....	39
Şekil 18. HUC-F hücrelerinin (Kırmızı 5000, yeşil 10000, mavi 20000 hücre/kuyucuk ekildi) gerçek zamanlı hücre analiz grafiği.....	40
Şekil 19. UT-SCC-74A hücrelerinin (Mavi(Kontrol), kırmızı(100µM), yeşil (250 µM), pembe(500µM) krosetin uygulandı) gerçek zamanlı hücre analiz grafiği	41

Şekil 20. UT-SCC-74B hücrelerinin (Pembe(Kontrol), kırmızı(100µM), yeşil (250 µM), mavi(500µM) krosetin uygulandı) gerçek zamanlı hücre analiz grafiği.....	41
Şekil 21. xCELLigence cihazının programında IC50 değerinin hesaplanması.....	42
Şekil 22. UT-SCC-74A Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 protein seviyelerine olan etkisinin gösterildiği western blotting sonuçları.....	43
Şekil 23. UT-SCC-74B Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 protein seviyelerine olan etkisinin gösterildiği western blotting sonuçları.....	44
Şekil 24. Fibroblast Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 protein seviyelerine olan etkisinin gsterildiği western blotting sonuçları.....	45
Şekil 25. UT-SCC-74A Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 genlerinin ekspresyon seviyelerine olan etkisinin gösterildiği Real-time PCR sonuçları.....	46
Şekil 26. UT-SCC-74B Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 genlerinin ekspresyon seviyelerine olan etkisinin gösterildiği Real-time PCR sonuçları.....	46
Şekil 27. HUC-F(Fibroblast) Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 genlerinin ekspresyon seviyelerine olan etkisinin gösterildiği Real-time PCR sonuçları.....	47
Şekil 28. Kaspaz-3 assay standart eğrisi.....	48
Şekil 29. UT-SCC-74A hücre hattındaki kaspaz3 aktivitesi değişimi.....	48
Şekil 30. UT-SCC-74B hücre hattındaki kaspaz3 aktivitesi değişimi.....	49
Şekil 31. HUC-F hücre hattındaki kaspaz 3 aktivitesi değişimi.....	49

TABLO DİZİNİ**Sayfa No**

Tablo 1 Baş boyun kanseri tanısının konulmasında kullanılan görüntüleme yöntemleri.....	7
Tablo 2. Genel tedavi seçim kriterleri.....	9
Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerlerin sekansları.....	24
Tablo 4. Western blot jeli için gerekli solüsyonların hazırlanması.....	28
Tablo 5. Running Jel oranları.....	29
Tablo 6. Stacking Jel oranları.....	29

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, her geçen gün Dünya çapında oranı giderek artarak insan hayatını tehdit etmekte ve tedavi süresince yaşam kalitesini önemli oranda düşürmektedir. Sigara ve alkol kullanımı, kötü beslenme ve HPV (Human papilloma virüs) baş ve boyun kanserlerinin başlıca nedenleridir. Baş-boyun kanserlerinde erken teşhis olmadığı müddetçe tedavi başarı oranı yetersiz düzeyde kalmaktadır. Mevcut tedavi yöntemleri olan cerrahi ve kemoradyoterapideki gelişmelere rağmen sağ kalım oranlarında onyıllar boyunca önemli bir değişim olmamıştır. Ayrıca uygulanan cerrahi tedaviler yüz, boyun, ağız içi, laringofarinks gibi anatomik yapılarda ciddi deformitelere ve bunun sonucunda yutma, konuşma gibi hayat kalitesini de etkileyen önemli fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır.

Bilim dünyasında yapılan kanser araştırmalarında çeşitli bitkilerin kanser üzerine etkileri araştırılmaktadır. Bunlardan biri olan safranın da antitümör özelliği farklı çalışmalar yapılarak araştırılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak literatürde daha önce safran veya krosetin ile ilgili baş boyun kanseri üzerine yapılmış bir çalışma mevcut değildir.

Bu çalışmadaki amacımız safran bitkisinden ekstrakte edilen doğal bir karotenoid olan krosetin maddesinin, baş boyun kanseri primer tümör ve metastaz hücre çifti hatları üzerindeki antikanserojen etkisini göstermektir. Bunun yanında aynı kişiden oluşturulan primer tümör ve metastatik hücre hatları üzerindeki etkileri incelenerek metastaz önlemede rolünün olup olmadığı araştırılmıştır. Hedefimiz ise; baş boyun kanseri primer tümör ve metastaz hücre çifti hatlarına krosetin uygulanmasının sonucunda hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmek ve apoptoz oranını artırmaktır. Ayrıca proapoptotik Bax ve antiapoptotik Bcl-2 gen ekspresyonlarını incelemektir. Diğer taraftan da western blotting deneyleri ile bu genlerin ürünlerinin de ekspresyonlarının değişimini protein seviyesinde de teyit etmektir.

Böylece sağlık sektöründe kanser tedavisi amacıyla sentezlenecek krosetin içeren yeni ilaçların piyasaya çıkmasına katkıda bulunmayı ve kullanılan mevcut ilaçları krosetin desteği ile daha etkin hale getirmeyi ve hali hazırda ülkemizde üretilmekte olan safranın kullanım alanlarının yaygınlaştırılmasını amaçlıyoruz.

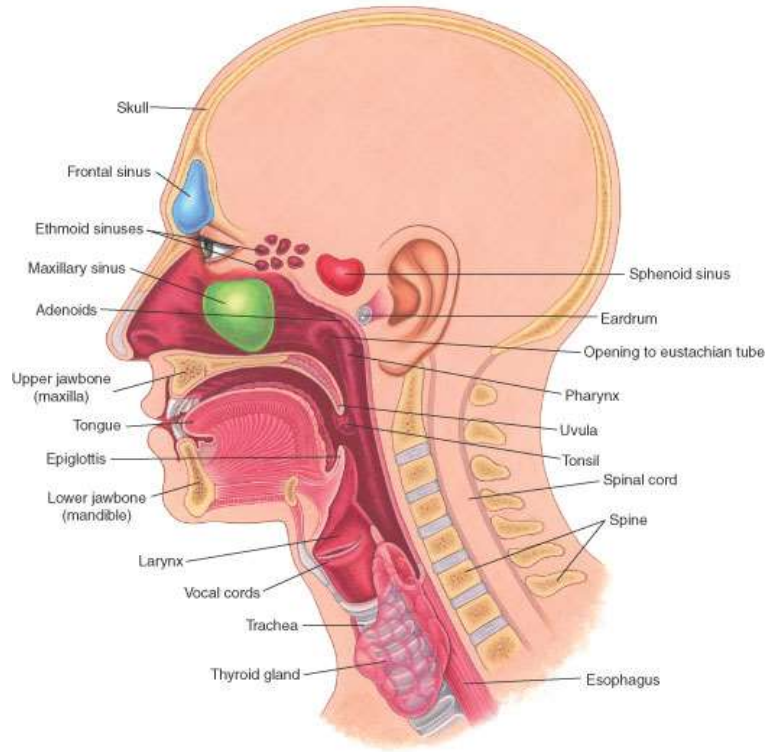
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1.BAŞ BOYUN KANSERİ

Erken teşhis edildiği takdirde Baş ve boyun kanserlerinin tedavi edilebilen bir kanser türüdür. Baş ve boyun kanserlerinin belirtileri genellikle ilk dönemlerde ortaya çıkar ve fark edilebildiği takdirde doğru ve erken teşhis koyulabilir. Ağız boşluğu, dudaklar, diş eti, damak, dil, ağız tabanı, burun delikleri, yüz kemikleri ve çavresi, orofarinks, hipofarinks, larinks, kulak kepçesi, tükürük bezleri, burun delikleri ve çevresi gibi bölgelerde oluşan kanserlerin her biri baş ve boyun kanserlerine dahildir. Baş boyun kanseri çeşitleri temel olarak 5 başlık altında toplanır (Şekil 1). Bunlar Oral kavite, nazal kavite, larinks, hipofarenks ve tükürük bezleri bölgelerinde oluşan tümörlerdir. Baş boyun kanserleri çeşitli faktörlerin etkisi altında oluşabilmektedir ve baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomların %3 kadarı bilinmeyen bir baş ve boyun primer odağında oluşup boyuna metastaz olduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 1. Baş boyun kanseri çeşitleri



Şekil 2. Baş boyun kanserinin görüldüğü bölgelerin anatomisi [1].

2.1.1. Baş Boyun Kanseri Etiyolojisi Ve Epidemiyolojisi

Baş boyun kanserinin Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan araştırmada, ülkede tiroid hariç tutulduğunda erkeklerde tanınan tüm malignansilerin %8.5, kadınlarda da %3,2'sini oluşturdukları bildirilmektedir. Yine bu ülkede her yıl 400.000 dolayında yeni vaka gözlendiği, baş boyun kanserlerinden ölümlerin ise her yıl 14.000-16.000 civarında olduğu rapor edilmektedir [2].

Baş boyun kanserlerinin ortaya çıkmasının altında birçok neden olabilir. Bunları sırayla açıklamak gerekirse:

Alkol ve tütün kullanımı: Baş ve boyun kanserleri için en önemli iki risk faktörüdür. Özellikle ağız boşluğu, orofarenks, hipofarenks ve larenks kanserleri gelişiminde bu iki etmen oldukça önemli bir yer tutar [3,4,5]. Yapılan çalışmalarda baş-boyun kanserlerinin %85'inin temel sebebi tütün içme (sigara, pipo, tütün çiğneme, dumansız tütün vb.) olduğu görülmektedir [6]. Tütün ve alkolü birlikte kullanan kişiler ise daha büyük bir risk altındadır. Baş-boyun kanseri teşhisi konmuş olan kişiler tütün içmeye devam ettiklerinde tedaviye yanıt azalmakta ve yaşam süreleri kısalmaktadır [7]. Baş ve boyun kanserleri için tedavi olan kişiler genellikle baş, boyun,

yemek borusu, ya da akciğerlerde yeni kanser gelişimi açısından artmış riske sahiptirler [8,9]. İkinci bir primer kanser ortaya çıkma ihtimali, orijinal kanserin yerine bağlı olarak değişir fakat, tütün ve alkol kullanan kişilerde daha yüksek risk taşır [9]. Yapılan araştırmalarda tütün içmeye devam eden ağız ve farenks kanserli kişilerin ikinci bir primer kanser geliştirme risklerinin de, böyle bir alışkanlığı olmayan kişilere göre 5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir [10]. Erişen ve arkadaşları dudak, oral kavite ve orofarengeal kanserli olgularda yaptıkları çalışmada erkek olguların %60'ının sigara, %16.7'sinin alkol kullandığını bildirmiş olup ayrıca olgularda sigara, nargile ve alkolü beraber kullananların oranı %57.2 saptanmıştır [11].

Yaş: Çoğu kanser türünde olduğu gibi baş-boyun kanserlerinde görülme sıklığı, yaşla artar ve hastaların büyük bölümü 50 yaşın üstündedir. Yapılan araştırmalar genç olgularda, 30 ya da daha genç yaşlarda, prognozun daha kötü olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra bazı araştırmacılar prognostik özelliklerin göz önünde bulundurulması ile yapılan analizler sonucu genç hastalarda yaşın değil genetik yatkınlık ve immünolojik özelliklerin kötü prognozdan sorumlu olduğunu düşünmektedirler [12,13].

Gastroözefagial reflü: Larenks veya farenks kanserli hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda hastaların %36-50'sinde gastro özefageal reflü olduğu tespit edilmiştir [14,15,16]. Gastro özefageal reflü hastalığı, midede bulunan içeriğin yemek borusuna geri kaçmasıyla oluşan bir hastalıktır. Bu asit oranı yüksek olan içerik yemek borusuna gelerek temas etmesi sonucu yemek borusunun asitten kendini koruma özelliğinin kaybolmasına sebep olur.

Virüsler: Herpes Simpleks Virüs Tip 1 (HSV-1)'in oral kavite yassı hücreli kanserlerinde mutajen rol oynayabileceği düşünülmüş ve yapılan çalışmalar sonucu oral kavite tümörlerinin az bir kısmında HSV-1'in kofaktör olabileceği bildirilmiştir [17,18]. Ayrıca Human Papillom virüs (HPV) ile baş-boyun kanserleriyle, özellikle dil tabanı ve orofarengeal kanserlerin, HPV-16 ile ilişkili olduğunu düşündüren çalışmalar mevcuttur [19,20]. HPV'nin baş boyun kanserleriyle olan ilişkisini ortaya koymak için çeşitli deneysel çalışmalar devam etmektedir [21,22]. Nazofarenks kanseri için Epstein Barr Virüsü (EBV) önemli bir risk faktörü olarak belirlenmiştir ancak EBV virüs enfeksiyonlarının yalnızca bir kısmında nazofarenks kanseri gelişmesi nedeniyle nazofarenks kanserinin ortaya çıkmasında sadece EBV değil farklı faktörlerin de etkili olduğu düşünülmektedir [23,24]. Ayrıca farklı çalışmalara da EBV ile Tip 2-3 nazofarenks kanserleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir [25,26].

Genetik Yatkınlık: Kanser genetik ilişkili bir hastalık olduğu bilinmektedir. Kansere sebep olan genetik anomaliler çevresel etkenlerle meydana gelebilir. Çeşitli kanserojenlerle indüklenen genetik anomaliler bu gruba dahildir. Baş boyun kanseri hastalarında da bu

kanserojenlerin etkisi ve genetik anomaliler araştırılmıştır. Örneğin larenks kanseri hastalarında sigara dumanında bulunan en önemli karsinojenlerden polisiklik aromatik hidrokarbonları aktive eden aril hidroksikarbon hidroksilaz enzim düzeyleri araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda larenks kanserli hastalarda bu enzimin, kontrol grubundan daha yüksek olduğu görülmüştür. Yine baş-boyun kanserli hastaların karsinogenlerle indüklenen kromozom değişikliklerine daha duyarlı oldukları belirlenmiştir [27,28].

Çevresel etmenlerin genetik anomalilere sebep olmasının yanında ailesel genetik yatkınlık da kanser sebebi olabilir. Egeli ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada baş-boyun kanserli hasta grupları ve birinci derece akrabalarında, kontrol gruplarına göre kan lenfosit kültürlerinde kromozom anomali oranı ve fragil bölge ekspresyon frekanslarının daha fazla olduğunu göstermişlerdir [29]. Bu çalışma aslında baş boyun kanserinde ailesel genetik yatkınlığın bir kanıtı ve 1. dereceden baş boyun kanseri akrabası olanlar daha fazla risk altındadır.

Meslek: Yapılan araştırmalarda mesleği gereği nikel işlemesi, ağaç işleri ve deri sanayi gibi sektör çalışanlarında paranazal sinüs adenokanserlerinin daha sık görüldüğü belirlenmiştir [30,31]. Elçi ve arkadaşlarının araştırmasında ise, silika ve pamuk tozlarına maruz kalan işçilerde larenks kanserinin daha sık görüldüğü ortaya koyulmuştur [32]. Riechelmann'ın 2002 yılında yaptığı araştırması incelenildiğinde kağıt, lastik, tekstil, mobilya ve metal endüstrisi çalışanlarında oral kavite ve farenks kanserlerinin görülme riskinin fazla olduğu görülmektedir [28]. Ayrıca çiftçilerde baş-boyun bölgesi cilt ve dudak kanserlerinin sık görüldüğü belirtilmiştir [33,34,35,36].

Radyasyon: Radyolojik incelemelerde kullanılan thorastrast ile paranazal sinüs kanserleri arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Bunun dışında baş-boyun bölgesine uygulanan ışın tedavisi ve medikal amaçla radyoaktif iyot kullanımı sonrası tiroid kanserlerinin sık görüldüğü bilinmektedir. Çocukluk çağı tümörleri nedeniyle uygulanan ışın tedavisi alanı içinde sarkom gelişebilmektedir. Ancak bu tümörler baş-boyun bölgesi malignitelerinin az bir bölümünü oluşturmaktadır [37,38]. Ultraviyole radyasyonla baş-boyun bölgesi cildi ve alt dudak kanserleri arasında ilişki olduğu da bilinmektedir.

Diyet: Yapılan çalışmalarda epitelyal neoplazmlara karşı beta karoten ve vitamin-A'nın koruyucu roller üstlendiğini belirtilmiştir [39]. Winn ve arkadaşları kadınlarda taze sebze ve meyvelerden oluşan diyet ile oral kavite tümörü riskinin azaldığını saptamışlardır [40]. Sigara kullanımının, besinlerdeki karotenoidlerin emilimini azalttığı bildirilmektedir. Bosetti ve ark İtalya ve İsviçre'de yaptıkları çalışmalarda yağda kızarmış yiyeceklerle larengeal kanser

riskinin arttığını bildirmişlerdir [41]. Tuzlanmış balık ile beslenmenin Nazofarenks kanserlerinde bağımsız bir risk faktörü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [42,43]. Beslenme şekline göre demir eksikliği anemisi gelişenlerde hipofarenks kanserleri görülmektedir.

Etiyolojik ve epidemiyolojik çalışmaların en önemli amacı korunma ve erken tanıyı sağlamaktır. Risk faktörleri göz önüne alındığında baş-boyun bölgesi kanserlerinin %90-95'inin bilinen ve önlem alınabilen karsinojenler sonucu oluştuğu görülmektedir. Özellikle tükürük bezi ve nazofarenks dışındaki baş-boyun kanserlerinin %90-95'i tütün ve alkol kullanımıyla ilişkilidir. Bu durumda tütün ve alkol kullanımının önlenmesiyle baş-boyun kanserlerinin önemli bir bölümünün engellenebileceği açıktır. Diyet açısından tam neden sonuç bilgisi olmasa da, taze sebze ve meyvelerden oluşan diyetin baş-boyun bölgesi kanserlerinde önleyici rolü bilinmektedir [37,39,44,45].

2.1.2. Baş boyun kanseri belirtileri

Deri değişiklikleri: Baş boyun kanserinin en sıklıkla ortaya çıkan türü cilt kanserleridir. Bu kanser türü erken teşhis ve doğru şekilde tedavi uygulanması ile riskli durumlar ortaya çıkmadan tedavi edilebilirler. En yaygın görülen cilt kanseri türü bazal hücreli kanserdir. Bu kanser türü genellikle kulak ve alın gibi güneşin ışınlarının en sık maruz kaldığı kısımlarda ortaya çıkar ancak diğer yerlerde de görülmesi mümkündür ve yavaş bir ilerleme davranışı vardır. Bir de yassı hücreli tipi vardır ki bu kanser tipi çok daha hızlı olarak ilerler ancak kötü huylu olmadığı ve erken teşhis koyulduğu sürece tedavi edilebilir. Malign melanom adı verilen türün ise çok daha kötü bir prognozu vardır. Prognoz tümörün yerleştiği yer, kanserin hangi evrede olduğu ve tümörün histolojik yapısı başta olmak üzere birbirinden farklılık gösterir. Dudak kanserlerinde diğerlerine oranla daha iyi bir prognoza sahiptir. TNM sınıflandırılması yardımıyla evrelendirme yapılır ve daha sonra buna göre tedavi yöntemi seçilerek prognoz tayini belirlenir.

Ses değişiklikleri: Pek çok gırtlak kanseri özellikle ses telleri seviyesinde yerleşenler ses kısıklıklarına sebep olurlar. Üç haftadan uzun süren ses kısıklığı gırtlak kanseri belirtisi olabilir.

Ağız içindeki yara ve şişlikler: Baş boyun kanserinin ağız içinde meydana gelen türünde şişlik ve yaralar gözlenir. Bunlar çoğu zaman ağrısız olmakla birlikte ilerlediklerinde kanamalar görülür.

Yutma problemleri: Yemek borusu ve boğaz bölgelerinde görülen kanserlerde katı yiyeceklerin yutulmasında zorluk meydana gelebilir. Genellikle yiyeceği yutarken boğazda takılma şeklinde görülür.

Tükürükten kan gelmesi: Ağız, akciğer veya burun bölgesinde meydana gelen kanserler tükürükten kan gelmesine sebep olabilir. Ancak bu kan bir çok hastalıkla ilişkili bir belirtidir sebebi kanser olmayabilir.

Kulak ağrısı: Kulak ve çevresindeki sürekli ağrı bu bölgelerde ortaya çıkmakta olan bir tümörün sebep olduğu ağrı olabilir.

Boyunda meydana gelen şişlikler: Baş ve boyun kanserleri, öncelikle boyun bölgesindeki lenf bezine yayılıp daha sonra vücudun farklı yerlerine metastaz yaparlar. Bu nedenle ağrısız ve büyüme eğilimi gösteren şişlikler meydana gelebilir.

2.1.3. Baş boyun kanseri için tanı yöntemleri

Baş boyun kanseri tanısında, fizik muayene ile, tümörün lokalizasyonu, büyüklüğü, çevre dokulara infiltrasyonu, lenf nodlarına yayılımı, kranyal sinir tutulumu değerlendirilir. Ayrıca endoskopik muayeneler gereklidir. Görüntülemeye ise en çok CT ve MR kullanılır. Bunlar dışında farklı görüntüleme yöntemleri de mevcuttur. Bu yöntemler aşağıdaki tabloda açıklanmıştır.

Tablo 1. Baş boyun kanseri tanısının konulmasında kullanılan görüntüleme yöntemleri [46].

Görüntüleme yöntemi	Açıklama
CT (computerised tomography)	Görüntülemeye başlanmadan önce kan damarlarına solüsyon enjekte edilir ve bu sayede tüm damarların net bir şekilde görüntülenmesi sağlanır.
MRI (magnetic resonance imaging)	MRI yönteminde manyetik ve radyo dalgaları kullanılarak görüntüleme sağlanır. Ağrısız bir yöntemdir fakat hastanın belirli bir süre cihazın silindiri içinde durmak zorunda zorunda olması rahatsızlık vericidir.

PET(positron emission tomography)	Bu yöntemde hastalara radyoaktif glikoz solüsyonu verilir ve vücudun hangi bölgesinde daha çok glikoz harcandığına bakılarak kanser hücrelerinin nerelerde olduğu bulunur.
Ultrasound	Ses dalgaları kullanılarak vücut içerisindeki herhangi bir bölgenin görüntülenmesi sağlanır. Acısız olması en büyük avantajıdır.
X-Ray	Kemiklerdeki tümör oluşumunu ve hasarı belirlemek amacıyla kullanılır. Ağrısız ve hızlı bir yöntemdir.

2.1.4. Baş boyun kanserlerinde evreleme

Evrelemede TNM evrelemesi kullanılır

Tüm baş-boyun tümörlerinde N ve M sınıflaması aynıdır

N0= lenf bezi tutulumu yok,

N1=3 cm'den küçük tek lenf bezi tutulmuş

N2=3-6 cm arasında bir veya daha fazla lenf bezi tutulmuş

N3=6 cm'den büyük bir veya daha çok lenf bezi tutulmuş

M1= metastaz varlığı

T evresi ise lokalizasyona göre değişir

2.1.5. Baş Boyun Kanserinde Tedavi Yöntemleri

En etkili tedavi yöntemleri cerrahi ve radyoterapidir. Bu tümörlerde radyoterapi, cerrahi öncesi neoadjuvan olarak, cerrahi sonrası adjuvan olarak kullanılabilir gibi, olguların çoğunda primer tedavi olarak kullanılmaktadır. Kemoterapi genellikle palyasyon ya da adjuvan olarak kullanılır. Son zamanlarda ise organ koruyucu yaklaşım amacıyla ve radyoterapinin etkinliğini artıracak şekilde radyoterapi ile birlikte uygulanmaktadır.

2.1.6. Baş-Boyun Kanserlerinde Tedavi Seçim Kriterleri

Genel tedavi seçiminde bazı temel prensipler göz önünde bulundurularak uygun tedavi metodu seçilmelidir. Tedavinin başarıyla sonuçlanmasında bu adım oldukça önemli yer tutar (Tablo 2).

Tablo 2. Genel tedavi seçim kriterleri

1. Küratif olmak
2. Mümkün olabildiğince fonksiyonların korunabilmesi
3. Kozmetik açıdan kabul edilebilir olunması, toplum içinde rehabilitasyonunun Sağlanabilmesi
4. Metastatik nodal tutulumun yaygınlığı
5. Uzak metastaz varlığı
6. Prognostik faktörler (Tümör farklılaşması, DNA içeriği, Histolojik diferansiyasyon derecesi, Lenf nodu kapsül invazyonu)
7. Elde mevcut imkanlar, alternatif seçenekler
8. Hasta ile ilgili özellikler (Yaş, cinsiyet vb.)
9. Tedavi ile ilgili potansiyel komplikasyonlar (yan etkiler)
10. Tümörün lokalizasyonu
11. Metastatik nodal tutulumun histopatolojik tipi

Baş boyun kanserli hastalarda bir diğer önemli konu hastaların takipleridir. Hastalar düzenli bir şekilde takip edilmesi, hem nükslerin hem de ikincil primer lezyonların erken yakalanabilmesi için son derece önemlidir [47,48,49].

2.1.7. Baş-Boyun Kanserlerinin Moleküler Biyolojisi

Baş boyun kanserlerinin tanımının koyulması ve nasıl bir tedavi yönteminin izleneceğinin belirlenmesinde “bölge kanserleşmesi” oldukça önemlidir. Slaughter ilk kez 1953’te bölge kanserleşmesinin tanımını yapmıştır. Bu tanıma göre bölge kanserleşmesi denilen kavram

mukozal bölgelerin uzun bir süre boyunca kanserojenlere etkileşimi nedeniyle, sayıca çok ve birbirinden tamamen bağımsız bir şekilde prekanseröz ve kanseröz odakların oluşmasıdır [50].

Bölge kanserleşmesi kavramı ağız boşluğu, orofarenks, larenks ve özofagus bölgelerindeki baş boyun kanserlerinde tanımlanmıştır. Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesindeki sürecinde farklı mutasyonların birikmesi söz konusudur ve bu süreç bir çok basamaktan oluşan karsinogenezis (multistep carcinogenesis) adı verilen bir süreçtir. Bu süreçte çeşitli onkogenlerin aktif hale gelirken ve tümör baskılayıcı genler ise inaktif hale gelmektedirler. Bu değişimden dolayı hücre döngüsü ve apoptoz etkilenir ve normal hücrelerin kanser hücresine dönüşüm süreci başlar. Normal hücreler genetik değişikliklere uğradığı için normal şartlardaki büyüme kontrolünü kaybederek çok daha hızlı bir şekilde büyümeye başlar. Böylece kanserleşen tek bir hücre bile çoğalıp klon haline dönüşür. Oluşan bu klon hızlı bir şekilde bölünerek etrafında bulunan normal mukoza hücrelerinin yerine geçerek kanserleşmiş bir bölge oluşur. Kanserojenlere uzun süreli maruz kalınması sonucu, solunum ve sindirim sisteminin mukozal yüzeyinde birbirinden bağımsız olarak farklı yerlerde ve çok sayıda kanserleşmiş bölgeler oluşabilir. Bu yolla oluşmuş olan çeşitli klonlar, zaman geçtikçe yeni genetik mutasyonların eklenmesi sonucu birbirinden farklı özellikler gösteren alt-klonlar da oluşturabilirler. Yeni mutasyonlar hücrenin kontrolsüz olarak büyüüp bölünmesine katkı sağlar ve kanserleşen bölgeler genişler. Bu süreçte oluşan herhangi bir alt klon invaziv bir kanser haline gelebilir. Bu invaziv dönüşüm riski, kanserleşen hücre sayısı ve oluşan mutasyonlarla doğru orantılı olarak artar. Anlatılan bu modelde temel olarak iki tane kritik nokta mevcuttur. Bunların ilki; kanserleşerek belirli bir bölgeyi kapsayan ve kontrolsüz büyüyen çoğalan hücre grubunun ortaya çıkmasıdır. Bir diğeri ise; büyümeye devam eden klonun invaziv ve metastatik hale gelmesidir.

Baş-boyun kanserlerinin oluşumunda normal hücrenin kanser hücresine dönüşmesinde etkili olan genetik değişiklikler tanımlanmıştır. Bu değişikliklerin en önemlisi ise 17. Kromozomda lokalize olan tümör baskılayıcı özelliğe sahip p53 geninin inaktive olmasıdır ki bu duruma baş boyun kanserlerinde %40-70 oranında görülür [51].

Ayrıca premalign bölgelerde %20 oranında p53 mutasyonu görülmektedir [52]. p53 genindeki mutasyonun ardından 3p, 9p, 8p ve 18q kromozom bölgelerinde mutasyonlar oluşarak, buralarda lokalize olan tümör baskılayıcı genleri de inaktif hale getirirler. Böylece daha hızlı bölünüp büyüyen farklı alt-klonlar oluşmaktadır. Örneğin baş boyun kanserlerinde 9. kromozomun kısa kolunda lokalize olan p16 (INK4) geni %50 oranında inaktif olmuş haldedir [53].

Tümör baskılayıcı genler inaktive olurken aynı zamanda onkogenler de aktive olmaktadır. Ancak bu durum tümör baskılayıcı genlere göre daha az oranda görülmektedir. Örneğin baş boyun kanserlerinde myc, ras, neu, bcl ve int gibi onkogenlerin ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir [54]. Baş boyun kanserlerinin bir türü olan larenks kanserinde cyclin D1 de %25-35 oranında, EGFR da ise %25-35 oranlarında amplifikasyon olduğu belirlenmiştir [55]. Cyclin D1 adı verilen proto-onkogen hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynar. Tümörlü dokuda ve etrafında bu genin amplifikasyonu %70 düzeyindedir [56].

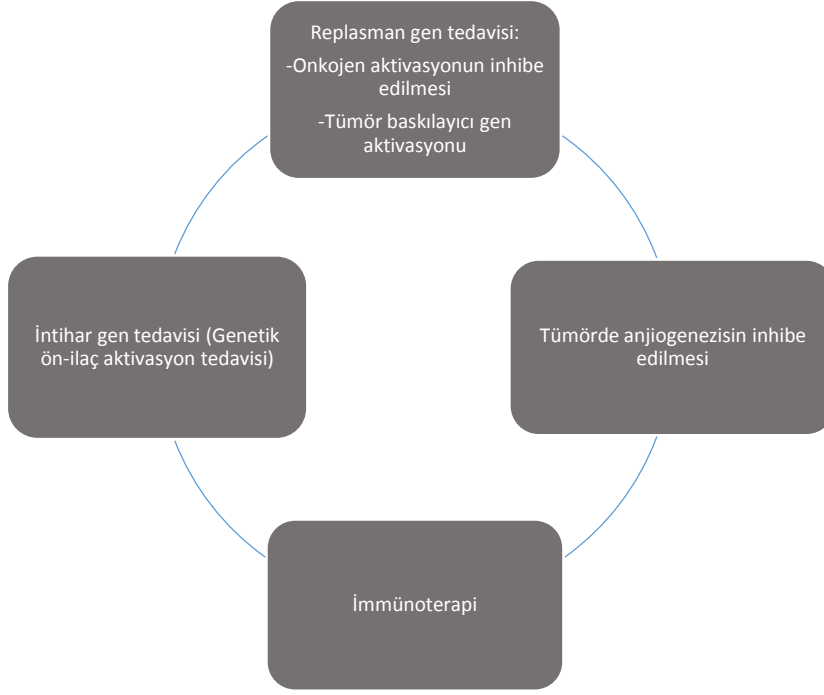
2.1.8. Gen Tedavisi uygulamaları

Günümüzde genel olarak çeşitli kanser tiplerinde olduğu gibi, baş-boyun kanserlerinde de gen tedavisinden yararlanan klinik tedavi stratejilerinde artış görülmektedir. Bu durumun sebebi Baş boyun kanserlerinde klasik yöntemler olan cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi protokollerinin kullanılmasıdır. Günümüzde ek olarak IMRT(Yoğunluk ayarlı radyoterapi) teknolojisi de kullanılmaya başlanmıştır. IMRT, bir çok kanser türünün tedavisinde de kullanılmaktadır [57].

Şimdiye kadar kullanılmakta olan klasik yöntemlerde karşılaşılan sorunlara karşılık genetik ve moleküler biyoloji alanında yapılan bilimsel çalışmalar sonucu son zamanlardaki getirilen yenilikler, kanserleşme süreci ve tümör oluşumundaki yolların aydınlatılmıştır. Ayrıca çalışmalar sonucu elde edilen teorik bilgiler klinik uygulamalara da aktarılmaya başlanmıştır. Normal şartlar altında hücre döngüsü kontrol noktaları olan ve işleyişi kontrol altında tutulan bir sistemdir. Ancak protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğramaları sonucu hücre döngüsünün kontrolü kayba uğrayabilmektedir.

Gen tedavisi yaklaşımında amaçlanan, ortaya çıkmış olan hastalığın genetik temelindeki problemin düzeltilmesidir; yani kısaca normal şartlarda olması gereken “wild tip allel” den elde edilen DNA’nın herhangi bir hastalığa neden olan mutasyona uğramış olan allel’i taşıyan hücrelere verilerek tedavi edilmesi yani bozuk olan fonksiyonu düzeltmek için normal genin aktarılmasıdır. Bu yöntemle yapılan tedaviler hayvan deneylerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. İnsanda ise ilk defa 1990’da gen tedavisi uygulanmış ve günümüzde de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzdeki verilere bakıldığında 5000’in üzerinde hastada 400’den fazla gen tedavisi temelli protokol uygulanmıştır [58].

Bilim dünyasında gerçekleştirilen çalışmalar sonucu gen tedavisinde en üst seviyede etkinliğe sahip olan tedavi stratejileri ortaya konmuştur. Bu tedavi stratejileri temel olarak dört ana başlığa ayrılmaktadır (Tablo 1). Hastalığın özelliklerine ve şartlara göre hangi yöntemin tedaviye uygun olacağına karar verilir ve bu yöntemlerden biri seçilir.

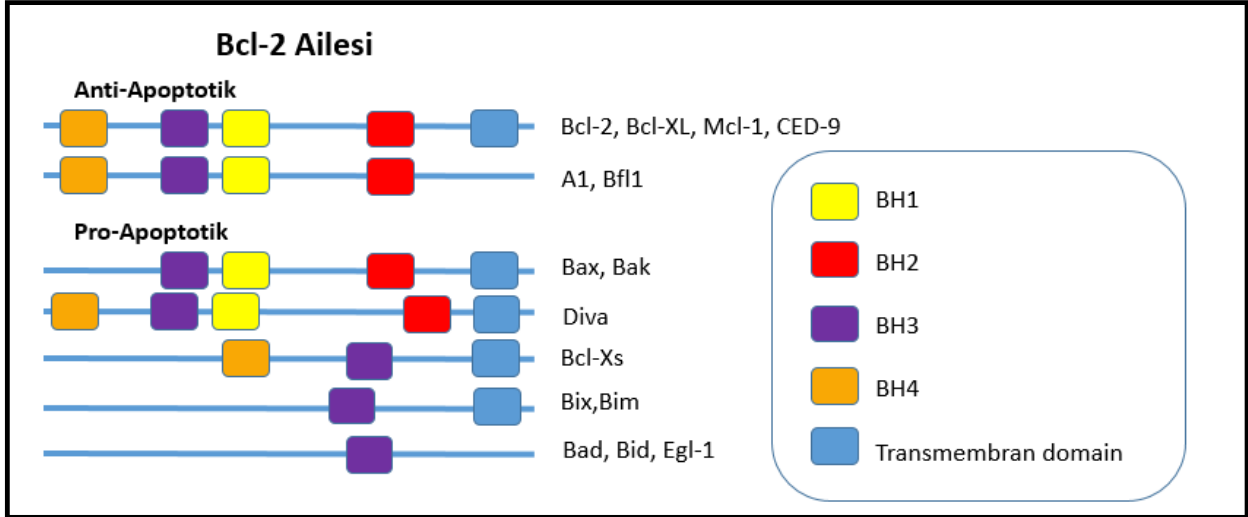


Şekil 3. Baş-Boyun Kanserlerinde Gen Tedavisi Stratejileri

2.2. BCL-2 Ailesi

Kanserlerin çoğu farklı genetik değişimler sonucu oluşur [59]. Büyüme kontrol eden genler olan onkogenler ve tümör süpresör genlerde malign transformasyon oluşmaktadır. Onkogenler normalde büyüme uyarıcı proteinleri kodlarlar. Aşırı sentezleri, translokasyonları ve mutasyonları sonucu malign transformasyon oluşur [60]. Tümör süpresör genler normalde büyüme inhibe eden proteinleri kodlarlar. Delesyonlar, transkripsiyon olmaması ve protein inaktivasyonu ile fonksiyon kaybına uğrarlarsa malign transformasyon oluşabilir [61,62].

Özellikle p53 geninin ve Bcl-2 ailesinin bulunmasından sonra bu proteinlerin kanser gelişimi üzerine etkileri incelenmiş ve pek çok kanserde rol oynadıkları bulunmuştur. Son yıllarda ise bu proteinler ile kanserlerin prognozu arasındaki ilişkiler incelenmekte ve bu proteinlerin prognoz tahminindeki önemleri araştırılmaktadır.



Şekil 4. Apoptotik ve Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri

Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) protein ailesi üyeleri hücre ölümünün önemli regülatörleridirler. Bu proteinlerden bazıları BCL2 ve BCL-xL gibi antiapoptotik, Bazıları da BAX veya BAD gibi proapoptotiktir [63].

2.2.1. Apoptoz ve BCL2 Ailesi İlişkisi

Hücrelerde apoptosisi indükleyen birçok yol vardır. Bu uyarılardan herhangi birine hücrenin cevabı, pro- ve antiapoptotik genlerin ekspresyon miktarına ve uyarının derecesine göre değişir. Bazen, apoptotik uyarılar hücre yüzey reseptörlerine ölüm indükleyici ligandların bağlanması gibi sinyallerden veya sitotoksik T lenfositlerle apoptosisin indüksiyonuyla oluşmaktadır. T hücreleri hasarlı ya da virüsle enfekte olmuş hücreleri tanır ve hasarlı hücreleri neoplastik hücre oluşumundan ya da virüsle enfekte olmuş hücrelerin yayılımını önlemek amacıyla apoptosisi başlatır [51].

Bazı durumlarda apoptosisi hücrel stresini takiben üretilen intrinsik sinyallerle başlatılır. Hücrel stres, radyasyon, kimyasallar ya da viral enfeksiyona maruziyetle oluşabilir. Büyüme faktörünün yoksunluğu ya da oksidatif stresin bir sonucu olarak da hücrel stres meydana gelebilir. Genel olarak intrinsik sinyaller apoptosisi mitokondri aracılığıyla gerçekleştirir [52]. BCL2 proteinleri de apoptosiste yanıt olarak yer alan protein ailesidir.

Bcl-2 ailesinin genleri heterodimer ve homodimer olmak üzere iki formda bulunabilirler. Bu genlerin hangi durumda buldukları hücrenin apoptoza eğilimini belirler. Bcl-2 ailesi genleri birbirine zıt olarak çalışan proapoptotik ve antiapoptotik olmak üzere iki gruptan oluşur. Eğer bir hücrede proapoptotik proteinlerin ekspresyonu daha fazla gerçekleşiyorsa bu hücrenin

apoptoza eğilimi vardır. Tam tersi olacak şekilde antiapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri daha yüksek ise hücrenin apoptoza eğilimi daha azdır. Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri olan proteinler hücrede sitozolde bulunurlar. Bu proteinler Sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımının artmasına yol açarak apoptozu indüklerler. Antiapoptotik proteinler ise mitokondrinin dış zarında, endoplazmik retikülümde ve çekirdek zarında bulunurlar. Bu proteinler porların oluşumunda görev alırlar ve iyon transportunu sağlarlar. Hücrede bulunan kalsiyum oranını düzenlerler. Aynı zamanda prokaspazları, AIF ve sitokrom-c salınımını engelleyerek apoptozun inhibisyonunda görev alırlar.

2.2.2. BCL-2 özellikleri ve kanserle ilişkisi

Bcl-2 proteini Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyelerinden birisidir ve normalde insan vücudunda pek çok dokuda sentez edilmektedir [64]. Görevi apoptosisi engellemektir ve aşırı sentezi sonucu özellikle B hücreli kronik lenfositik lösemi olmak üzere bazı malignansilerde rol oynamaktadır [65].

Bcl-2 proteini mitokondrinin dış membranı, nükleus membranı ve endoplazmik retikulum membranında lokalizedir [66]. Proapoptotik BCL2 proteinleri hücrel hasar ya da stres algılayıcıları olarak görev yaparlar. Hücrel stresi takiben anti-apoptotik proteinlerin yer aldığı mitokondri yüzeyinde yeniden yerleşirler [67]. Bu proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki ilişki antiapoptotik BCL2 proteinlerinin normal fonksiyonunu bozar ve mitokondride por oluşumuna yol açarak sitokrom C'nin ve diğer proapoptotik moleküllerin intermembran boşluktan salınımını sağlar. Bu bir devir şeklinde apoptozom oluşumuna ve kaspaz kaskadının aktivasyonuna yol açar [68].

Bcl-2 geni ilk kez B hücreli foliküler lenfomada klonlanmış bir onkogendir. Aşırı sentezi apoptosisi engelleyerek lenfomaya neden olmaktadır [64]. Lenfoma ve lösemiler yanında barsak, meme, akciğer ve deri kanserinde de aşırı sentezi gösterilmiştir [65]. Normalde ektoserviks skuamöz epitelinin bazal katında bol miktarda, endoservikal hücrelerde de bir miktar sentezlenmektedir [69].

Bcl-2'nin serviks kanserinde normale göre daha az sentezlendiğini bildiren çalışmalar olsa da pek çok çalışmada invaziv kanserde ve yüksek gradeli lezyonlarda daha fazla sentezlendiği gösterilmiştir [70,71]. Bu sonuçlar Bcl-2 aşırı sentezinin serviks kanserinde rol oynadığını düşündürmektedir. Bcl-2'nin serviks kanserinin prognozu ile ilişkisine baktığımızda prognozu etkilemediğini bildiren çalışmalar yanında iyi veya kötü yönde etkilediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur [72,73].

2.2.3. BAX Özellikleri ve Kanserle ilişkisi

BAX; Bcl-2 associated x protein anlamında kullanılmaktadır. Proapoptotik bir proteindir. Bcl-2 ile %43 yapısı aynıdır ve Bcl-2 ile homodimerler ve heterodimerler oluşturabilir. Bax predominant olduğunda apoptosis artmaktadır. Hücre ölüm sinyali geldiği durumlarda Bax sentezi artar ve Bcl-2'nin etkisini nötralize ederek apoptosisi artırır [74]. Normalde sitozolde lokalizedir; apoptosis sırasında mitokondri membranına yerleşir [75]. İyon kanallarını açarak Sitokrom-c salınımına neden olur ve apoptosisi sağlar [76].

Bax fonksiyon kaybının bazı lösemi ve kolon kanserlerinde rol oynadığı gösterilmiştir [77]. Servikte Bax sentezini inceleyen az çalışma olmasına karşın bu çalışmaların çoğunda normal ve neoplastik dokuda Bax sentezinin farklı olmadığı gösterilmiştir [78,79]. Literatürde Bax proteininin serviks kanserinde prognoza etkisine baktığımızda hemen bütün çalışmalarda Bax pozitifliğinin iyi prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca BAX eksikliğinde serviks kanseri gelişiminin arttığı görülmüştür [80,81].

2.3.Krosetin

2.3.1. Krosetinin Kaynağı: Safran

Çiğdem çiçeği latince adı *Crocus sativus* olan ve soğanlı bir bitkidir. Safran ise çiğdem çiçeğinin çiçekler açınca toplanarak kurutulan stigmalarıdır. Krosetin bu kısımdan elde edilir (Şekil1).



Şekil 5. Krosetinin kaynağı olan Çiğdem çiçeği (*Crocus Sativus*), safran ve ekstrakte edilmiş krosetin

Safran az bulunması nedeniyle oldukça pahalı baharattır. İspanya, Fransa, İtalya, İran, Hindistan, Fas, Yunanistanda safran yetiştirilmektedir. Türkiye’de ise Safranbolu’da üretimi yapılmaktadır.

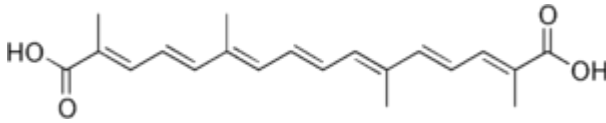
Safranın içeriğinde safranal, pikrokrosin, krosetin adlı maddeler bulunmaktadır. Safran baharat, ilaç ve boya amacıyla tüketilmekte olan bir bitkidir. Boyama özelliği oldukça güçlüdür ki kendisinin yüzbin katını sarı boyayabilir.

Safran uzun yıllardır Uzakdoğu ülkelerinde baharat çeşidi olarak kullanılmaktadır ve dünyada farklı yerlerde yetişen 80 türü vardır [82,83]. Safran yıllardır Hindistanda baharat ve gıda renklendirme amaçları dışında geleneksel tedavi amacıyla da kullanılmıştır. Ağrı kesici, iştah düzenleyici, kalp koruyucu özellikleriyle bu tedavilerde öne çıkmıştır.

2.3.2. Krosetinin özellikleri ve kullanım alanları

Krosetin, *Crocus Sativus*'un safran kısmından elde edilir ve safrana rengini veren kısımdır [84]. Doğal bir karotenoid dikarboksilik asittir. 285 °C'de ergiyen kırmızı kristaller oluşturur.

Safranın başlıca içeriği olan krosetinin (8,8'-diapo-8, 8'-karetionik asit) düşük moleküler ağırlığı (328.41 g/mol) ve simetrik bir kimyasal yapısı vardır. 7 çift bağ ve 4 metil grubu içerir (Şekil 7).



Şekil 6. Krosetinin kimyasal yapısı

Krosetinin antioksidan [85,86], antihiperlipidemik [87], antiarteroskleretik [88,89], kalp koruyucu [90], karaciğeri koruyucu [91] ve sinir sistemini koruyucu etkileri [92] *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir.

2.3.3. Krosetin ve kanser ilişkisi

Krosetin, yapılan deneysel hayvan modellerinde ve hücre kültürü çalışmalarında bir antitümör ajanı olarak önemli bir potansiyel göstermiştir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada farklı tümör tipleri üzerinde toksik etki göstererek farelerin yaşam süresini arttırdığı görülmüştür [93]. Ayrıca farelerin mikrogial hücrelerinde de krosetin etkisi araştırılmış ve nörotoksik moleküllerin üretiminde azalmaya yol açtığı gözlemlenerek anti-inflamatuar etkisi olduğu kanıtlanmıştır [94]. Krosetinin meme kanseri üzerindeki etkisinin araştırıldığı farklı bir çalışmada ise MDA-MB-231 kanser hücrelerine krosetin uygulanarak proliferasyonu azalttığı görülmüştür [95].

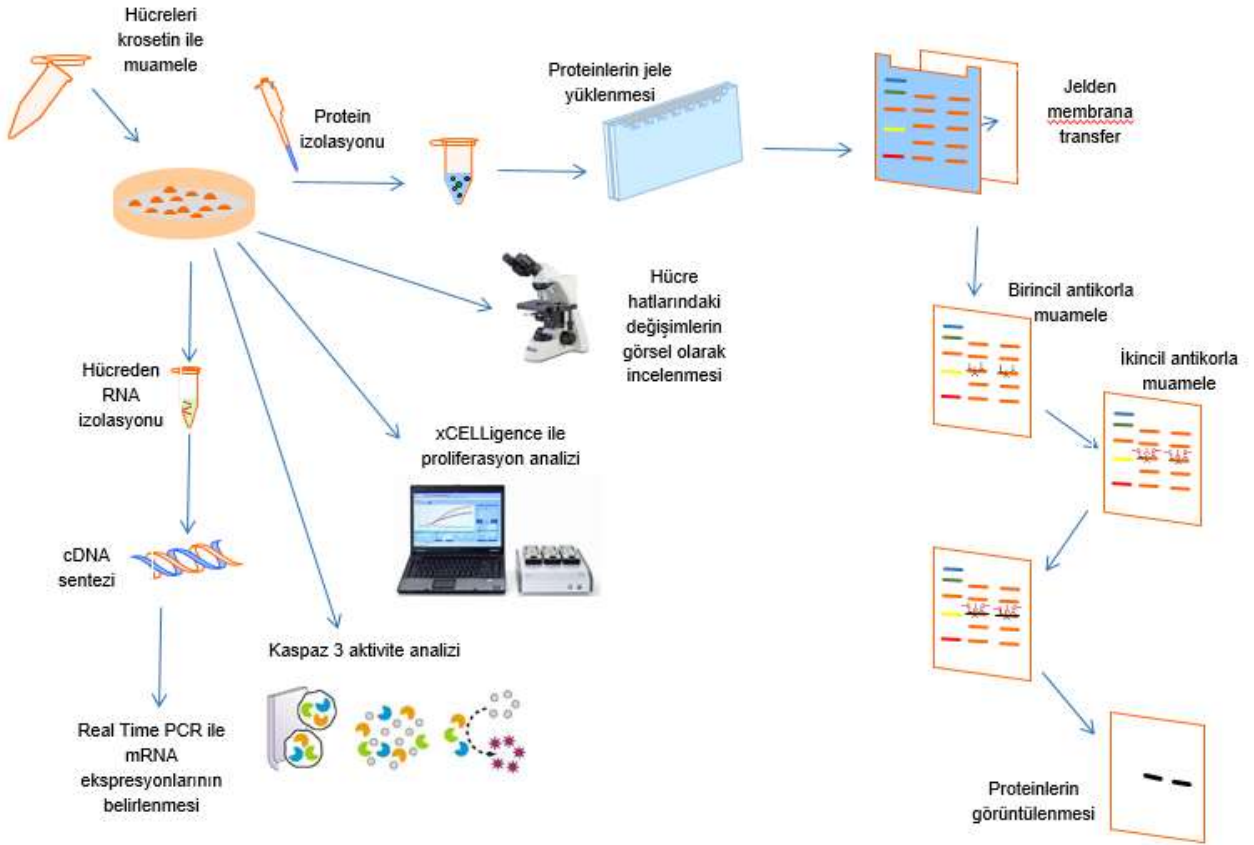
Xenograft fare modeli üzerinde yapılan farklı bir çalışmada ise krosetinin pankreas kanseri üzerindeki etkisi incelenmiş ve kontrol grubundaki farelerle karşılaştırıldığında, krosetin tedavisi ile muamele edilmiş olan farelerde, krosetinin tümör büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir [96].

Krosetinin etkisi serviks, akciğer ve yumurtalık kanseri üzerinde de araştırılmış ve serviks için HeLa, akciğer kanseri için A549 ve ovaryum için SKOV3 hücrele hatları kullanılarak bu hücrelere krosetin uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonunda ise krosetinin hücre döngüsünde G1 kontrol noktası üzerinde etki göstererek kanser hücrelerinin poliferasyonunu inhibe ettiği, apoptoza yol açarak hücre ölümlerinde artışa sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Yine aynı çalışmada, hücre döngüsünde p53 bağımlı ve p53 bağımsız mekanizmalar araştırılmış ve her iki durumda da krosetinin aynı etkiyi gösterildiği sonucuna varılmıştır [97].

3. MATERYAL VE METOD

Bu bölümde çalışmada yer alan deneylerin akış sırasına göre protokolleri ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.

Çalışmayı genel olarak özetlersek, öncelikle baş-boyun kanseri primer tümör ve metastaz hücre hatlarına ve kontrol grubu olarak sağlıklı fibroblast hücre hattına krosetin uygulanarak, krosetinin bu hücrelerin poliferasyonu üzerinde etkisi olup olmadığı xCELLigence cihazı ile incelendi. Baş boyun kanseri primer ve metastaz hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda krosetin uygulandıktan sonra, hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı, ardından cDNA sentezi gerçekleştirilerek Real Time PCR ile Bcl-2 ve Bax genlerinin ekspresyonlarında kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olup olmadığı gözlemlendi. Gen ekspresyonlarına baktıktan sonra Bax ve Bcl-2 genlerinin ürünleri olan proteinler de Western blotting yöntemi ile görüntülendi. Böylece Real time ile ekspresyonları incelenen genler, diğer taraftan bu genlerin ürünü olan proteinler western blotting yöntemi ile görüntülenerek sonuçları her iki yönden de doğrulanmış oldu. Yapılan deneylerin genel olarak özeti Şekil 7'de gösterilmiştir.(Şekil 7)



Şekil 7. Çalışmamızda kullanılan metodların akış şeması

3.1.Hücre kültürü

Deneylerde UT-SCC 74A ve 74B skuamöz hücreli baş boyun kanseri hücre hatları, ayrıca kontrol grubu olarak ta HUC-F (Fibroblast) hücre hattı kullanıldı.

HUC-F Hücre Hattı ve Özellikleri (Riken:RCB0153): HUC-F hücre hattı etnik kökeni Japon olan bir bayanın göbek kordonundan elde edilmiş fibroblast hücreleridir. Morfolojik yapı olarak fibroblastlarla aynı özelliklere sahiptir. Hücre kültürü şartları antibiyotiksiz ortamda 37° ve %5 CO₂ olarak belirlenmiştir .

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B Hücre Hatları ve Özellikleri (The University of TURKU): Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (UT-SCC)'un farklı türleri mevcuttur. Çalışmamızda Finlandiya'da Turku Üniversitesinden alınan UT-SCC-74A primer tümör ve UT-SCC-74B boyun metastazı kullanılmıştır. UT-SCC-74A hücre hattı 31 yaşındaki dilinin sağ marjiniinde SCC olan G1-G2 evresinde bir erkekten elde edilmiştir (T3N1M0). UT-SCC-74B hücre hattı ileri safha boyun metastazından elde edilmiştir. Hücre kültürü şartları antibiyotiksiz ortamda 37° , DMEM medyum ve %5 CO₂ olarak belirlenmiştir. UT-SCC-74B hücre hattı UT-SCC-

74A'nın metastaz halidir. Primer hücre hattı erkek hastanın tümörlü boyun epitel dokusundan hastalığın G1 evresinde elde edilmiştir. Hücre kültürü şartları UT-SCC-74A şartları ile aynıdır. UTSCC-74A ve UT-SCC-74B hücrelerinin temini konusunda yardımını esirgemeyen Reider Grenman'a teşekkürlerimizi sunarız.

3.1.1. Hücre kültüründe kullanılan medyumun hazırlanması

500ml DMEM/High Glukoz (HY-SH30243.01) medyumun içerisine:

- 50 mL FBS (Wısent- 080110 veya HY- CH30160.02)
- 5mL penisilin /streptomysin(HY-SV30010)
- 4 mL L-Glutamin (Wısent-609-065-ZL)
- 0,5mL Plasmocin (ant-mpt (Invivogen)

eklenerek medyum hazırlandı.

3.1.2. Hücre ekimi

- Çalışmaya başlamadan yarım saat önce kabinin UV ışığı açılarak kabin sterilize edildi. Kabin ve kullanılacak pipetler, çalışma öncesinde % 70'lik etanol ile temizlendi.
- Stok hücreler alınarak 37 °C'deki ısıtıcıda 2 dakika bekletildi.
- Cryovial tüplerin etrafı alkol ile temizlenip, kapakları açıldı.
- 8 ml medyum konan falkon tüpünün içine stok solüsyonu içindeki hücreler boşaltıldı..
- 1100 rpm 24 °C de 3 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı (Bu aşamada hücrelere zarar vermemeye dikkat edilmelidir).
- Hücrelerin üzerine 12 mL medyum konulur, pipetaj yapılarak hücreler çözöldü flaska alınır ve böylece ekim gerçekleştirildi.
- Ekilen hücreler 37°C, % 5 CO₂ inkübatöre konuldu.

3.1.3. Medyum Değişimi

- Medyum 37 °C'de ısıtıldı.
- Flasktaki medyum boşaltıldı.
- 12 mL medyum eklenir ve 37°C, % 5 CO₂ inkübatöre konuldu.
- 2-3 günde bir medyum değiştirildi.

3.1.4. Harvest İşlemi

- Flasktaki medyum boşaltıldı.
- Flaska 10 ml 1xPBS ilave edilir ve bu şekilde varsa ölü hücreler uzaklaştırıldı (Bu yıkama işlemi 2 kez tekrar edildi).
- 3 mL tripsin-EDTA (HY-SV30031.01) eklenip 37 °C’de ve 4-5 dakika inkübe edilerek hücrelerin kalkması sağlandı (Tripsin-EDTA ısıyla aktivitesi artan bir kimyasaldır ve hücreleri yüzeyden kaldırır).
- 8 mL medyum eklenip, pipetaj yapılarak solüsyon falkon tüpe aktarıldı.
- 1100 rpm’de 25 °C’de 6 dk. santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atılarak temiz medyum eklenir ve tekrar santrifüj edildi.
- Süpernatantın tamamı hücrelere zarar vermeden dikkatlice çekildi.
- Medyumda hücreler çözülüp deneye devam edildi. (Buradan sonra hücreler yeniden ekilebileceği gibi stok yapılabilir)

3.1.5. Hücre sayımı

- 10 ul Tryphan Blue, 10 ul hücre örneği ile karıştırıldı.
- Thermo cell counter platelerine bu karışımdan 10 ul konularak okuma yaptırıldı.
- Bu cihaz ile ml başına hücre sayısı ve hücrelerin canlılık oranları elde edilir. (Şekil 8)



Şekil 8. Biorad cell counter ile hücre sayımı ve canlılık oranı ölçümü

3.1.6. Krosetin Muamelesi:

- Ticari olarak satın alınan krosetin (02193543 MP Biomedicals, free acid from Gardenia jasminoides ellis) DMSO içerisinde çözülerek son konsantrasyon 100mM olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı.

- Krosetin Mw: 328.4 g/mol olduğundan 100 mM'lık stok solüsyonu hazırlamak için 101.6 µL DMSO içerisinde 5mg kroseti çözüldü.
- Krosetinin etkinliğini kaybetmemesi için solüsyon -20 °C ve karanlık ortamda saklanmalıdır.

3.1.7. MTT

MTT deneyi Vybrant MTT Cell Proliferatiom Assay kit (V-13154) kiti kullanılarak yapıldı.

Solüsyonların Hazırlanması:

Compotent A:

- 12nM MTT stok solüsyonu hazırlamak için;
- 5 mg MTT tüpünün içine steril 1 ml 1xPBS eklendi.
- Mix vortexlenerek iyi bir şekilde karışması sağlandı.

Component B:

- İçinde 1 gr SDS solüsyonu olan tüpün içine 10 ml 0.01 M HCl eklendi ve çözünene dek iyice karışması sağlandı.

Solüsyonlar hazırlandıktan sonra;

- Kuyucuklarda bulunan medyum çekildi ve 100µl fresh medyum koyuldu.
- Üzerine 10 µl 12mM MTT solüsyonu eklendi.
- 37 °C'de 4 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında 100 µl önceden hazırladığımız SDS-HCl solüsyonu eklendi.
- Tekrar 37 °C'de 4 saat inkübe edildi.
- Varioscan cihazında 570 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

3.1.8. Xcelligence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi)

- İstenilen yoğunluğa ulaşan hücre hatları her xCeLLigence cihazında kullanmak için e-plate'lere, her kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde ekildi.
- Platelere 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörün içerisinde bulunan xCeLLigence cihazına yerleştirildi.
- Programa gerekli bilgiler girilerek dosya oluşturulur ve okuma başlatıldı.

- 24 saat inkübasyondan sonra platelerdek hücelere krosetinin farklı konsantrasyonları (800 μ M, 600 μ M, 400 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M ve 25 μ M) ile muamele edilir ve n=3 olacak şekilde doz uygulandı.
- Krosetin uygulamasından sonra hücelerin bulunduğu plateler, 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörün içerisinde bulunan xCeLLiegence cihazına yerleştirilir ve cihazın okuması tekrar başlatıldı.
- Madde uygulanmasından sonra sağlıklı bir proliferasyon analizi yapılabilmesi için 72 saat civarı okuma yaptırılmalıdır.
- Cihazda kurduğumuz program bittiğinde analiz kısmına geçilir.

3.2. TRİZOL ile Hücreden RNA İzolasyonu

Hücelere krosetin uygulandıktan sonra 24 saat boyunca 37 °C de inkübasyonun ardından aşağıdaki protokol takip edilerek RNA izolasyonu yapıldı.

- Medyum boşaltıldı.
- 1XPBS'le (2 mL) iki kez yıkandı.
- Her bir tabağa 1 mL TRİZOL(Invitrogen, Cat. No.15596-026) ilave edilir. Pipet ucuyla iyice kazındı.
- 2 mL'lik ependorf tüplere alındı.
- 200 μ L kloroform (Merck, 102431) eklenir ve renk değişene kadar 2-3 dk sallandı.
- 12.000xg'de 15 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
- Üstteki şeffaf kısım (süpernatant) yeni ependorf tüpe aktarıldı.
- 500 μ L 2-propanol(Merck, cat. No.100995) eklendi. Sallanarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- 12.000xg'de 10 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
- Süpernatant RNA'ya zarar vermeden dikkatlice atılır. % 75'lik etanolden(Merck, cat. No. 100993) 1000 μ L eklendi.
- Hafifçe sallandı.
- 7500 xg'de 5 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atılır ve alkolün uzaklaşması için 10-15 dk oda sıcaklığında (buz üzerinde) kapakları açık olarak bekletildi.
- 100-200 μ L PCR-grade DEPC(Invitrogen, 46-2224) su eklenerek RNA pipetejla çözüldü.

- Böylece RNA bir sonraki deney için hazır haldedir ve kullanılabilir.
- RNA -70 °C de saklanmalıdır.

3.3.cDNA Protokolü

- Tüm RNA'lar sabit bir sayıya eşitlendi. (0,5-1-2-3-4 µg gibi)
- Hesaplama işlemi şöyle yapıldı;

Örneğin izole ettiğiniz RNA değeri $X=274,2$ ng/µl olsun. Bunu 1 µg' ma eşitlemek istiyorsanız,

$$274,2 \text{ ng} = 0,274 \text{ µg}$$

(0,274'ü neyle çarparsam 1'e eşitlenir diye hesap yapılır)

$$0,274 \times 3,65 \approx 1,0001 \text{ µg}$$

3,65 µl = alınacak RNA miktarı

- Hesaplamaları yaptıktan sonra çalışmaya geçildi.

NOT: RNA ve kitin içinde bulunan malzemeler her zaman buzda bekletilmelidir. Enzimler (Ribolock™ RNase Inhibitor ve RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase) mix'e eklenmeden hemen önce -20 deki kutusunda çıkarılmalı, eklendikten sonra hemen yerine konulmalıdır.

- Örnek sayısı kadar 1,5 ml'lik ependorf tüp çıkartıldı.
- Her tüpe ayrı ayrı 1µl oligo(dT)₁₈ primer konuldu.
- Her bir örnek için hesaplanan miktarda RNA sırasıyla ependorf tüplere konuldu.
- Her bir örnek için hesaplanan miktarda su (kitin içinde mevcut) sırasıyla ependorf tüplere konuldu (örneğin RNA 2µl ise 11µl'ye tamamlayacak şekilde yani 9µl su tüplere konuldu).
- Ayrı bir temiz ependorf tüpün içinde aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı.

➤ Bir örnek için hazırlanacak miktarlar (örnek sayısıyla çarpılarak mix hazırlandı).

- | | |
|--------------------------------------|-----|
| • 5X Reaction Buffer | 4µl |
| • Ribolock™ RNase Inhibitor(20 u/µl) | 1µl |
| • 10mM DNTP Mix | 2µl |

- RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase(200 u/μl) 1μl
- Hazırlanan mix örnek tüplerinin üstüne 8μl olacak şekilde dağıtıldı.
- Tüplerdeki toplam volüm 20 μl olacak.
- 42 °C 60 dk inkübasyona bırakılır. Sonra 70°C de 5 dk bekletildi. Spin atırıldı.
- Elde elden cDNA lar -70 derecede saklandı.

3.4. Real Time PCR

3.4.1. BAX ve BCL2 Primerlerin Hazırlanması

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda 1XTE (Tris-EDTA) eklenerek 100 pmol/mL'lik stok çözeltiler hazırlandı. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 20 μL alınarak 80 μL 1×TE tamponu eklendi.

Primer Sekansları:

Tablo 3. Çalışmada kullanılan primerlerin sekansları

Primer	Sekans
BAX rs	5'-GTCCAATGTCCAGCCCATGA-3'
BAX ras	5'-AGCTGAGCGAGTGTCTCAAG-3'
BCL-2 rs	5'-CGGGAGATGTGCCCCCTGGT-3'
BCL-2 ras	5'-GCATGCTGGGGCCGTACAGT-3'
Beta Actin rs	5'-TTCCTGGGCATGGAGTCCT-3'
Beta Actin ras	5'-AGGAGGAGCAATGATCTTGATC-3'

3.4.2. Gradyent PCR

Real-time pcr da kullanılacak olan primerlerimizin çalışma sıcaklığını bulmak için aşağıdaki solüsyonlar ve program kullanılarak gradiyent PCR yapıldı.

Gradyent PCR için aşağıdaki solüsyonlar ile mix hazırlanır:

- NH₄ buffer (2,5 μL)
- MgCl₂ (2,5 μL)
- dNTP (0,5 μL)
- Primer(reverse) (0,5 μL)
- Primer(forward) (0,5 μL)
- Taq polimeraz (0,2 μL)
- Nuclease free water (16,3 μL)

Primer datasheetlerindeki belirtilen Tm sıcaklıkları baz alınarak uygun program oluşturuldu ve gradiyent pcr yapıldı.

3.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrası istenen bölgenin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü.

- 100mL 1xTAE (Tris/Asetik Asit /EDTA) tamponunun içine
- 2 gr agaroz (Invitrogen kat no: 16500-100g) konuldu.
- Mikrodalga fırında karışım homojen olana kadar ısıtıldı.
- 1.2µL ethidium bromide (Merck, 11608.0030) ilave edildikten sonra jel kalıba dökülerek donmaya bırakıldı.
- PCR ürünlerinden 5µL alınarak 1µL 6xLoading dye(Thermo, #R0611) ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi.
- Jel, 110 V'de yaklaşık 15-20 dk. yürütüldükten sonra UV transliminatörde görüntülendi.

3.4.4. Jel Ekstraksiyonu

Jel ekstraksiyonu Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, cat. No 28704) ile yapıldı.

- Jel ekstraksiyonu yapılacak PCR ürünleri (20µL) kalın tarak ile hazırlanmış jele yüklendi.
 - Dimerlerin uzaklaşması için mümkün olan en uzun süre yürütüldü.
 - Karanlık odada bantlara bakılıp, hangisinin alınacağına karar verildi.
 - DNA bantları bant kesici (extractor) ile dikkatlice alındı.
 - Kesilen jel parçası tartılıp ependorf tüpe aktarıldı.
 - Örneğin; 1 Jel 40 mg = 40µL hesabına göre kaç kuyucuk kesildi ise 2 ya da 3 oranda 2x40, 3x40 düşünüldü.
 - 6. 40xörnek sayısı kadar QG tamponu eklendi (QIAGEN).
 - 7. 50 °C de 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
 - Jel parçaları tamamen eriyene kadar 2-3 dakikada bir vortex yapıldı. (Jel parçaları eridikten sonra tamponun rengi sarı olmalı, eğer turuncu ya da mor renk oluşursa renk sarı olana kadar 10µL 3M sodyum asetat eklenir.)
 - Süpernatant mor kapaklı spin kolona aktarıldı ve 13.000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.
 - Alttaki toplama tüpü boşaltılıp tekrar takıldı.

- İçindeki alkolün tamamen uzaklaşması için boş olarak tekrar santrifüj yapıldı.
- Spin kolon yeni ependorf tüpe oturtuldu. Toplama tüpleri atıldı.
- 30µL EB buffer (QIAGEN) eklendi. 4dk. oda sıcaklığında bekletildi.
- 13.000 rpm’de 1dk. santrifüjlendi. DNA değeri spektrofotometrede okutuldu.

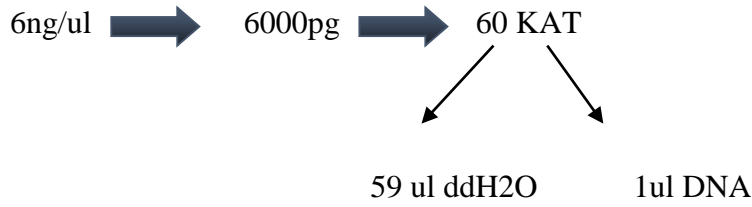
3.4.5. Real-time PCR için Standartların Hazırlanması

Jel ekstraksiyonu yapılan DNA lardan standart hazırlandı.

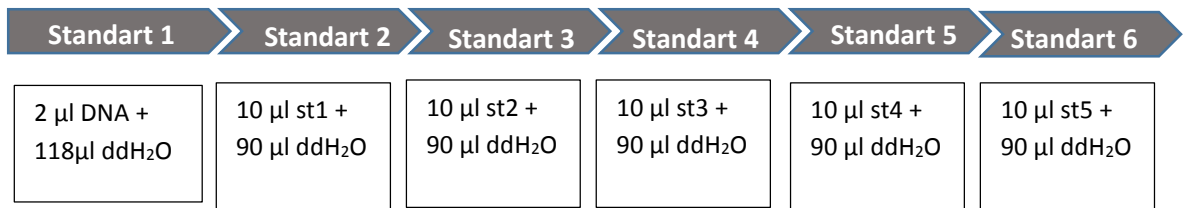
Primere ait jel ekstraksiyonu yaptıktan sonra spektrofotometrede konsantrasyon ve kalite ölçümü yapıldı.

ÖRNEK:

BETA-ACTİN geninin jel ekstraksiyon sonucu:



Bu hesaplama sonucunda sulandırma katsayısı bulunarak aşağıda verilen miktarlarda seri dilüsyon yapıldı.



Şekil 9. Real time PCR için standartların hazırlanması

Şeklinde sulandırma yapılarak standartlar çalışmaya hazır hale getirildi.

3.4.6. Real-time PCR Protokolü

Real-time PCR’da kullanılan sybergreen ışıktan etkilendiği için çalışma alanı karanlık olmalı, metal bloklarda ve aşağıdaki miktarlarda (bir örnek için) çalışılmalıdır.

PCR için aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı.

- Primer(forward) (0,5 µL)
 - Primer(reverse) (0,5 µL)
 - cDNA (2,5 µL)
 - syber green master mix (12,5 µL)
 - nüklease free water (9 µL)
- Real Time PCR'da cihaza çalışılan gene göre program girildi.
 - Denatürasyon için 15" 94 °C,
 - Annealing 30" (her gen için normal PCR'daki çalışma sıcaklığının 2°C altı seçildi).
 - Extention 30" 72 °C, cycle çalışmaya göre 45 seçildi.
 - Aynı şekilde houskeeping gen olan β -aktin ile normalize edildi.
 - Analizde okunan BAX, BCL2 ve β -aktin değerleri excel'e girilip oranlamaları, ortalama değerleri hesaplanıp varsa ekspresyon değişimine bakıldı.

3.5.Hücreden Protein İzolasyonu

- Plaketeki hücrelerin üzerinden medyumunu atıldı.
- Hücreler 500 µl PBS ile yıkandı. (2 kez)
- %90 lysis buffer + %10 proteaz inhibitör olacak şekilde bir karışım hazırlandı.
- PBS çekilip atıldıktan sonra karışımı her velle 250şer µl paylaştırıldı.
- +4 teki shakerda 15 dk bekletildi.
- Hücreler kazılır ve pipetle ependorflara aktarıldı.
- 15-30 dk +4 te shakerda bekletildi.

3.6.Western Blotting

3.6.1. Proteinlerin boyanması

- Proteinleri boyamak için buffer hazırlandı.
- Bufferin içeriği ve oranları: Sample buffer (%95) + Merkaptolanol(%5)
(Merkaptolanol; sülfür bağlarını kırarak proteinin 3 boyutlu yapısını bozar ve düzgün bir şekilde akmasını sağlar.)
- +4'te bekleyen hücre örneklerimizi alıp 5 dk en yüksek devirde santrifüj yapıldı.
- Süpernatantı ependorfa alıp pelletleri atıldı.
- Ependorflardaki örneklerden alarak 1 e 1 oranında üstlerine hazırladığımız sample bufferdan eklendi.

- Heat block'ta 95 oC de 5 dk bekletildi.
- Ve böylece protein izolasyonu aşaması tamamlanmış oldu.

3.6.2. Jel hazırlanması

Jel hazırlamak için öncelikle gerekli solüsyonlar hazırlandı. Bu solüsyonların hazırlanması aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tablo 4. Western Blot jeli için gerekli solüsyonların hazırlanması

%30 ACA (akrilamid)	58 gr ACA + 2 gr N,N,metilen bis ACA + 200 mL dW
2M Tris HCL	72 gr Tris + 250 Ml dW karışımı hazırlanır ve iyice çözüldükten sonra pH:8,8 e ayarlanır.
0.5M Tris HCL	6 gr Tris + 80 Ml dW karışımı hazırlanır ve iyice çözüldükten sonra pH:6,8 e ayarlanır.
% 10 APS (amonyumpersülfat)	25 mg APS + 250 μ L dW karışımı hazırlanır. Bu karışım uzun süre dayanmaz o yüzden hemen hazırlayıp kullanmalıyız.
% 10 SDS (sodyumdodesilsülfat)	5gr SDS tartılıp 50 mL'ye dW ile tamamlanır.

- Solüsyonlar hazırlandıktan sonra running ve stacking jel olmak üzere iki ayrı jel karışımı hazırlandı.
- Jel hazırlanırken % 10'luk oranlar kullanıldı.

Tablo 5. Running jel oranları

	%4	%5	%6	%7	%8	%9	%10	%12
dW	11.86 ml	11.26 ml	10.6 ml	10 ml	9.46 ml	8.84 ml	8.26 ml	7 ml
%30 ACA	2.4 ml	3 ml	3.6 ml	4.2 ml	4.8 ml	5.4 ml	6 ml	7.2 ml
2M Tris	3.38 ml	3.38 ml	3.38 ml	3.38 ml	3.38 ml	3.38 ml	3.38 ml	3.38 ml
%10APS	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL
%10SDS	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL	180 µL
TEMED	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20µL

Tablo 6. Staking jel oranları

dW	4.055 ml
%30 ACA	0.7 ml
0.5 M Tris	1.5 ml
%10 APS	50 µL
%10 SDS	60 µL
TEMED	10 µL

NOT: Bu tablolardaki oranlar 2 adet jel dökmek için gerekli olan oranlardır.

- Öncelikle running jel hazırlandı.
- Belirtilen oranlarda çözeltiler birleştirildi ancak APS ve TEMED jelleşmeyi sağlayan ajanlar olduklarından dolayı karışıma en son eklendi.
- Jel karışımı iki camdan oluşan kasetin arasına dikkatlice akıtıldı.
- Üzerine 2-propanol eklendi.
- Kuruduktan sonra propanol akıtıldı.
- Hazırlanan staking jel karışımı donmuş haldeki running jelin üzerine akıtılarak tarak takıldı.

- İyice kuruduktan sonra tarak çıkartıldı ve jel running buffer ile doldurulmuş tankın içine alındı.

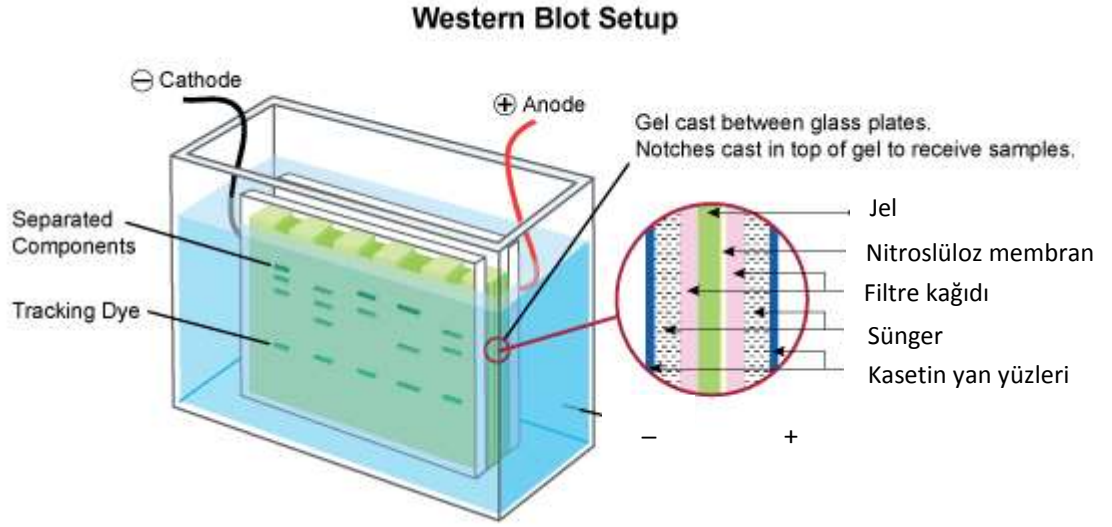
3.6.3. Proteinlerin Jele Yüklenmesi

- Öncelikle yükleme için buffer hazırlandı.
- Bufferin içeriği ve oranları: Sample buffer (%95) + Merkaptoetanol(%5)
- Merkaptoetanol; sülfür bağlarını kırarak proteinin 3 boyutlu yapısını bozar ve düzgün bir şekilde akmasını sağlar.
- Biz bu karışımı 2x'lik olacak şekilde hazırlanıp, 1 birim bu karışımdan 1 birim hücre örneğinden alarak çalışıldı.
- +4'te bekleyen hücre örneklerimizi alıp 5 dk en yüksek devirde santrifüj yapıldı.
- Süpernatantı ependorfa alıp pelletleri atıldı.
- Ependorflardaki örneklerden alarak 1 / 1 oranında üstlerine hazırladığımız örnek bufferdan eklenir (biz bu aşamada 60 µl örnek 60 µl buffer kullandık).
- Heat block'ta 95 °C'de 5 dk bekletildi.
- Ve böylece protein izolasyonu aşaması tamamlanmış oldu.
- Proteinler Jele yüklendi ve tank güç kaynağına bağlandı.
- 30 dk 90 V, ardından 1 saat 20 Voltta proteinler yürütüldü.

3.6.4. Membrana Transfer Aşaması

- Nitroselüloz membran metanol koyduğumuz bir kabın içerisinde 5 dk bekletildi.
- Proteinleri yürütülen jel alındı.

- Transfer buffer geniş bir kabın içine dolduruldu. Ve şekildeki gibi düzenek oluşturuldu.



Şekil 10. Western blotting transfer aşaması

- Transfer esnasında aşırı ısınmayı engellemek için tankın içine buz torbası konuldu ve 100 V 1 saat boyunca proteinlerin jelden membrana transferi sağlandı. (30 V overnight, 60V 4saat, 100V-1saat seçeneklerinden biri seçilebilir)
- Proteinleri jelden membrana aktardıktan sonra, membran PBS-T'ye konuldu.
- Falkonda 2.5 g süttozunun üzerini PBS-T ile 50 ml ye tamamlayarak süttozu çözeltisi hazırlandı.
- Membranı PBS ten alarak süttozu çözeltisi koyduğumuz kutunun içine konuldu.
- Membran süttozu çözeltisinde oda sıcaklığında shakerda 1 saat bekledi.

3.6.5. Birincil Antikorla Muamele

- Proteinleri jelden membrana aktardıktan sonra, membran PBS-T'ye konuldu.
- Falkonda 2.5 g süttozunun üzerini PBS-T ile 50 ml ye tamamlayarak süttozu çözeltisi hazırlandı.
- Membranı PBS ten alarak süttozu çözeltisi koyduğumuz kutunun içine konuldu.
- Membran süttozu çözeltisinde oda sıcaklığında shakerda 1 saat bekledi.
- Ayrı bir falkonda 1/1000 oranında olacak şekilde birincil antikor karışımı hazırlandı.
- 1 saat beklettiğimiz membranımızın kutusundaki süttozu çözeltisini atıldı ve 5 ml birincil antikor çözeltisinden eklendi.
- Membran çözeltisiyle birlikte paketlenildi.

- +4 te overnight shakerda bekledi. (Bu aşamadaki zaman ve sıcaklık antibodye göre değişebilir)

3.6.6. Yıkama

- Paketler açılarak içindeki membran PBS-T ile dolu kaba alındı.
- Shakerda 10 dk bekletildi (bu yıkama işlemi PBS-T değiştirerek 3 kez tekrar ediliyor)

3.6.7. İkincil Antikorla Muamele

- Stok sütünzozu çözeltisinden alınıp 1/2500 oranında ikincil antikor çözeltisini hazırlandı.
- Yıkama işleminden sonra membran 5 ml ikincil antikor çözeltisine konuldu.
- Oda sıcaklığında 1 saat shakerda bekletildi.

3.6.8. Yıkama ve Görüntüleme

- Membran 3 defa 10ar dk PBS-T ile yıkandı.
- Temiz bir yüzeye sera stretch yayarak düz zemin oluşturuldu.
- 750:750 µl oranında ECL ile enzim çözeltisi hazırlandı.
- Membranın üzerine karanlık ortamda enzim çözeltisi konularak 5 dk bekletildi.
(Burada kullandığımız enzim çözeltisi ikincil antikorlara bağlanarak ışığa olmasını sağlar.)
- Membranları CD poşeti arasına alınarak görüntülemeye hazır hale getirildi.
- Membranlar UV cihazda görüntülendi.

3.7.Kaspaz-3 Activite Assay

- UT-SCC-74A, UT-SCC-74B ve HUC-F hücre hatları kullanılarak caspase 3 activity Assay Kit (Roche, 120129522001) kullanılarak kaspaz-3 aktivite analizi yapıldı.
- Bu deney için hücre hatları 6'lık welllere ekildi.
- Yeterli yoğunluğa ulaştıklarında kontrol gruplarına DMEM+DMSO, deney gruplarına 100µM krosetin uygulandı.Hücreler 37 oC inkübe edildi.

3.7.1. Örnek Hazırlığı

- Bu assay için 2 milyon hücre lazımdır.
- 6 lık wellde bulunan hücreler öncelikle 2 kez 1 mL 1X PBS ile yıkandı.
- Daha sonra 500 ul tripsin eklenip 37 inkübatöre kaldırıldı.

- 5 dakika sonra hücrelerin kalktığı mikroskopta bakılarak gözlendikten sonra kalkan hücreler her well için 1 mL medium ile 1,6 ependorf tüplere toplandı.
- 1100 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Pelletin üzerine 1mL soğuk 1X PBS eklenerek hücreler pipetajla yıkandı.
- 300 g'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Pellerin üzerine 200 ul 1X DDT eklendi ve hücreler pipetajla çözdürüldü.
- 1 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
- 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 100 -200 ul supernatant analiz için ayrı tüplere alındı ve -20 dolabında saklandı.

3.7.2. Solüsyonların hazırlanması

- **Coating Buffer(10x):** 1x yapmak için 1 ml coating buffer, 9 ml ddH₂O ile çözüldü.(Hemen kullanılmalı!)
- **Anti-Caspase-3(20x):** Kullanmadan hemen önce bu antibody 1:20 oranında coating buffer ile seyreltildi. (Vorteks yok!)
- **Blocking buffer:** 25 ml şişesinde kullanıma hazırdır.
- **Incubation buffer(5x):** 1x yapmak için 50 ml incubation buffer, 200 ml ddH₂O ile sulandırıldı. (+4 oC de saklanır)
- **DDT(100x):** 1x yapmak için 10 µl DDT, 990 µl incubation buffer ile çözüldü.(Hemen kullanılmalı!)
- **Substrat solution(20x):** 1x yapmak için 1:20 oranında DDT ile sulandırıldı. (Hemen kullanılmalı!)
- **AFC solution:** 1 mM solüsyon, 1x substrat solüsyon ile dilüsyonları hazırlanarak kullanıldı. (Hemen kullanılmalı!)

3.7.3. MTP Kaplama

- MTP kitin içinden çıkan plate'in adıdır.
- Uygulama yapılacak her well'e 100 ul anti-caspase 3 Coating solution eklendi.
- MTP yapışkan bir folyo kapak ile sıkıca kaplanır ve 37 de 1 saat inkübe edildi.
- Coating solüsyonu çekildi ve wellere 200 ul Blocking buffer eklendi.
- MTP yapışkan kapak ile sıkıca kapatıldı. 15-25 te 30 dakika inkübe edildi.

- Blocking buffer tamamen çekildi ve weller 3 kez 200 ul 1X Incubation buffer ile yıkandı.
- Böylece platedeki kuyucuklar kaplanmış oldu.

3.7.4. Proteaz Aktivitesi Analizi

- Well'lere 100'er ul örnekler ve pozitif control eklendi ve MTP üzeri yapışkan folyo ile kaplandı.
- 1 saat 37 derecede inkübe edildi.
- Örnekler tamamen çekilerek weller 3 kez 200 ul 1X Incubation buffer ile yıkandı.
- Well'lere 100ul 1X Substrate Solution eklendi.
- Florometrik okuma yapıldı. Buna okumaya T0 denir. Okuma için excitation filter 370-425nm ve emisyon filter 490-530nm. (maximaex:400 em:505)
- MTP üzeri yapışkan folyo ile sıkıca kapatıldı ve 37 de 2 saat inkübe edildi.
- 2 saat sonra tekrar ölçüm yapıldı. Buna da T1 denir. T1 deki değişim hesaplandı.

3.7.5. Kaspaz-3 Aktivite Analiz

- AFC bu bölümde taze olmalıdır.
- Aşağıdaki şekilde Substrate Solution ile dilue edildi.
- 50 mikromolar için; 25ul AFC + 475ul Substrate Solution
- Daha sonra bu karışımdan standartlar hazırlandı:
 - 50mikromolar standart için: 250ul AFC
 - 25mikromolar için: 125ul AFC + 125 ul Substrate Solution
 - 10mikromolar için: 50ul AFC + 200ul Substrate Solution
 - 1mikromolar için: 5ul AFC + 245 ul Substrate Solution
 - 0.5mikromolar için: 5 ul AFC + 495 ul Substrate Solution
 - 0 mikromolar için: 200 ul Substrate Solution
- Daha sonra bu standartlardan her birinden 2 well olacak şekilde 100 ul eklendi.
- Florometrik ölçüm yapıldı. Excitation filter: 370-425 emission filter: 490-530 (maximaex:400 em:505)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bl	Bl	P1	P1								
B	Sa	Sa										
C	Sb	Sb										
D	Sc	Sc										
E	Sd	Sd										
F	Se	Se										
G	Sf	Sf										
H	P0	P0									P40	P40

Şekil 11. Kaspaz 3 assay plate dizaynı. (Bl=Blank, Sa= 50 µM standart, Sb=25 µM standart, Sc=10 µM standart, Sd=5 µM standart, Se=1 µM standart, Sf=0 µM standart, P0= pozitif kontrol, P1,P2,P3..-P40= örnekler)

3.7.6. Sonuçların Analizi

Florometrik okuma ile alınan sonuçlar olan T0 ve T1 değerleri kullanılarak aşağıda verilen denklem 1 ye göre her örnek için ayrı ayrı Δ FU değerleri hesaplandı.

Denklem 1.

$$\Delta\text{FU} = (\text{Sample FU at T1} - \text{Blank FU at T1}) - (\text{Sample FU at T0} - \text{Blank FU at T0})$$

Daha sonra standartların florometrik okuma değerleri excele girildi, grafik çizilerek grafiğin eğimi hesaplandı.

Kaspaz 3 aktivitesi aşağıdaki denklem 2 kullanılarak her örnek için hesaplandı.

Denklem 2.

$$\text{Kaspaz3 aktivitesi} = (\Delta\text{FU}/120)/\text{eğim}$$

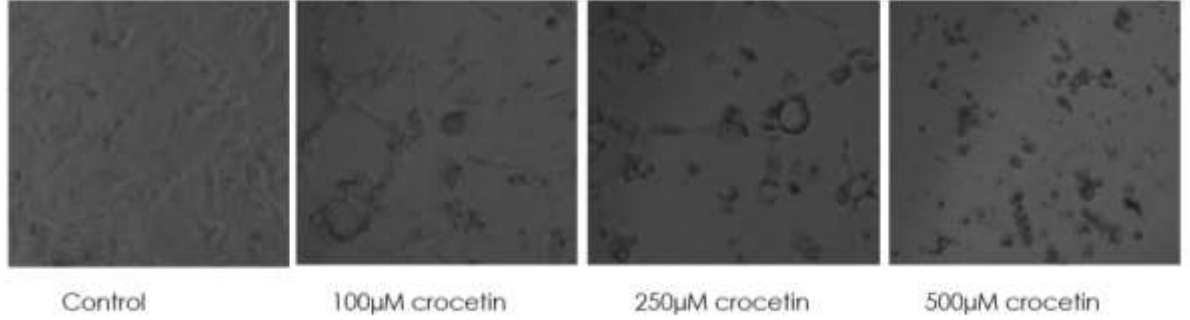
3.8.Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj cihazı (Nüve Bench Top Centrifuge)
- Su banyosu (Memmert Benmari)
- Pipet tabancası (Thermo Scientific)
- Mikroskop (Leica DM IL LED)
- Güç kaynağı (Electronic ballast)
- Steril hücre kültürü kabini (Biosafety Cabinet Class II Thermo Scientific)
- Gerçek zamanlı hücre analizi cihazı (xCeLLigence DP Real Time cell analyzer,Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- Hücre sayım cihazı (Biorad cell counter)
- Hassas terazi (Shimadzu AUWD unibloc)
- Katı otoklav (Nüve Steamart)
- Sıvı otoklav (Nüve Steamart)
- Floresan okuyucu (Thermo Varioscan)
- Thermal cycler (Techne TC3000X)
- Otomatik Pipetler (Gilson pipette-man)
- Spektrofotometre (Shimadzu Biospec nano)
- Buz makinası (Scotsman)
- Vorteks (VWR Galaxy ministar)
- CO2 inkübatör (Sanyo MCO 18A)
- Mikrosantrifüj (VWR Galaxy 14D)
- -20 Derece Dondurucu (Bosch)
- -80 Derece Dondurucu (Sanyo)
- Jel elektroforezleri (Cleaver Scientific)
- Ultra saf su cihazı (Thermo scientific easy pure)
- Mikrodalga fırın (Samsung TDS)
- Distile su cihazı (Thermo scientific barnstead)
- Isıtmalı manyetik karıştırıcılar (VWR)
- Molecular İmaging Görüntüleme sistemi (Vilber Lourmant) Kamera attaçmanlı

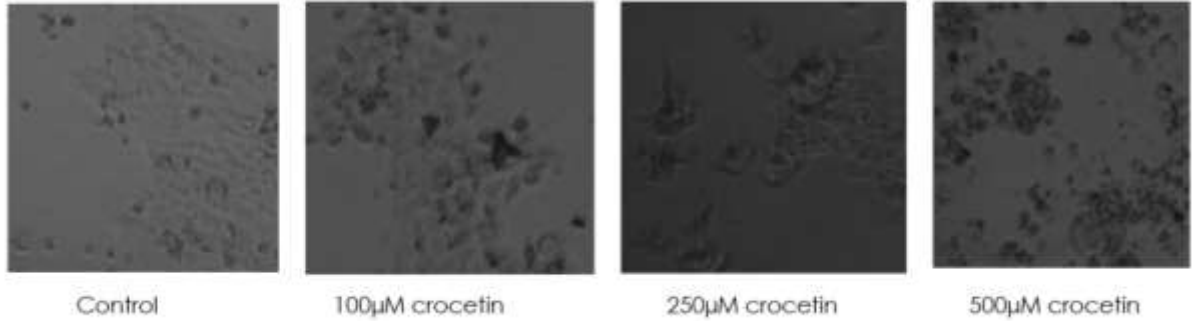
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.Hücelere Krosetin Uygulanmasının Hücre Canlılığına Etkisi

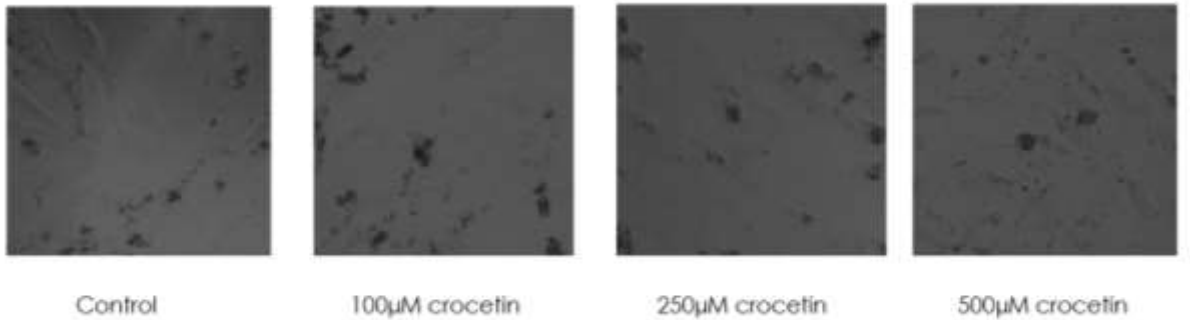
UT-SCC-74A, UT-SCC-74B ve fibroblast hücrelerine krosetin uygulanmasının ardından 24 saat sonra mikroskop görüntüleri alındı. Bu görüntülere bakıldığında krosetinin artan konsantrasyonlarında kanser hücrelerinin ölüm oranının arttığı görülüyor. Ancak fibroblast hücrelerinde çok belirgin farklılıklar gözlenmemiştir.



Şekil 12. Baş boyun kanseri tümör hücrelerine (UT-SCC-74A) farklı krosetin konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hücrelerin görünüşleri

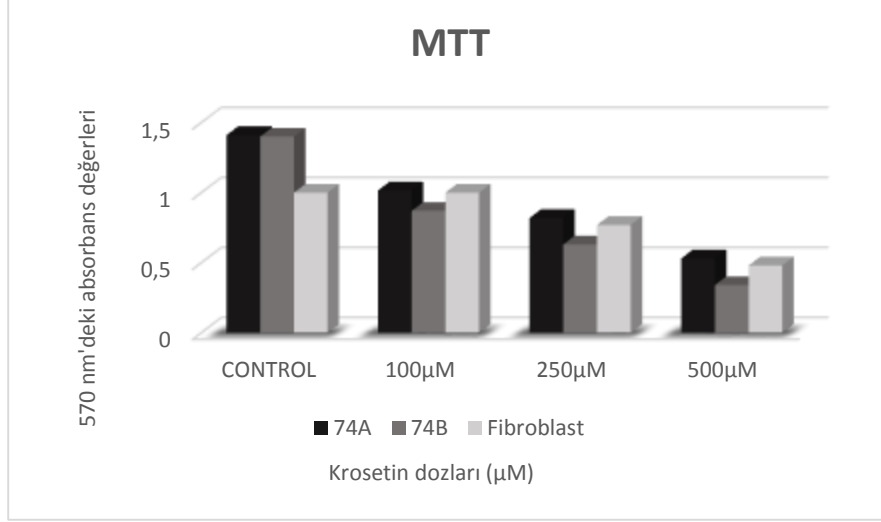


Şekil 13. Baş boyun kanseri metastaz hücrelerine (UT-SCC-74B) farklı krosetin konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hücrelerin görünüşleri



Şekil 14. HUC-F (Fibroblast) hücrelerine farklı krosetin konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hücrelerin görüntüleri

4.2. MTT deneyi sonuçları



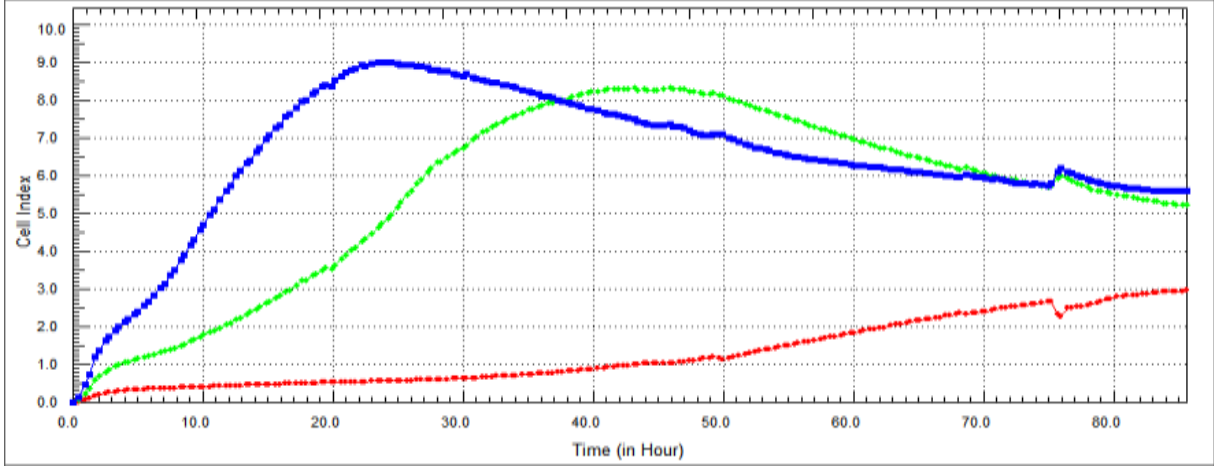
Şekil 15. UT-SCC-74A, UT-SCC-74B ve HUC-F hücre hatlarında yapılan MTT testi sonuçları

MTT sonuçlarına bakıldığında hücre hatlarına uygulanan krosetin konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının azaldığını görüyoruz. Ancak HUC-F hücreleri UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarına göre krosetinden daha az oranda etkilenmiştir. En belirgin azalış en yüksek doz olan 500 µM krosetin konsantrasyonunda görülmüştür. 100 µM krosetin HUC-F hücrelerinin canlılık oranını etkilemezken, baş boyun kanseri primer tümör (UT-SCC-74A) ve metastaz (UT-SCC-74B) hücre hatlarının canlılığını belirgin bir oranda düşürmüştür.

4.3.xCELLigence İle Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Sonuçları

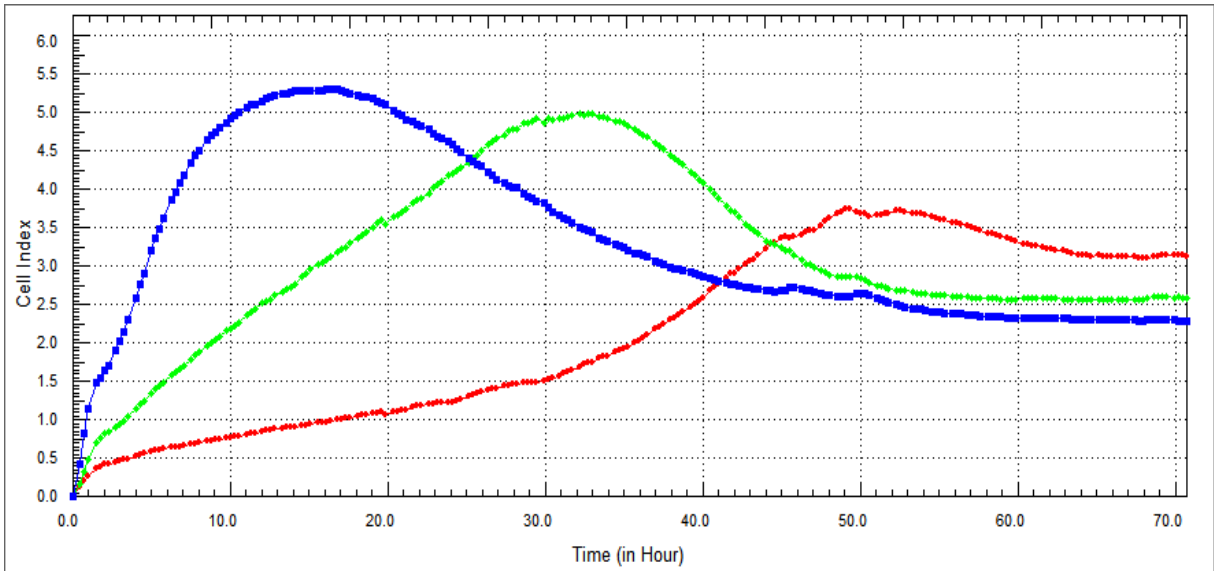
4.3.1. Hücre Sayısı Belirlemek İçin Yapılan Gerçek Zamanlı Hücre Analizi sonuçları (Titration Deneyi)

Öncelikle xCELLigence cihazının platelerinin herbir kuyucuğuna sayıca ne kadar yoğunlukta hücre ekerek daha iyi bir büyüme grafiği elde edeceğimizi anlamak için krosetin uygulamaksızın sadece hücreler ekilerek titration deneyi yapıldı.



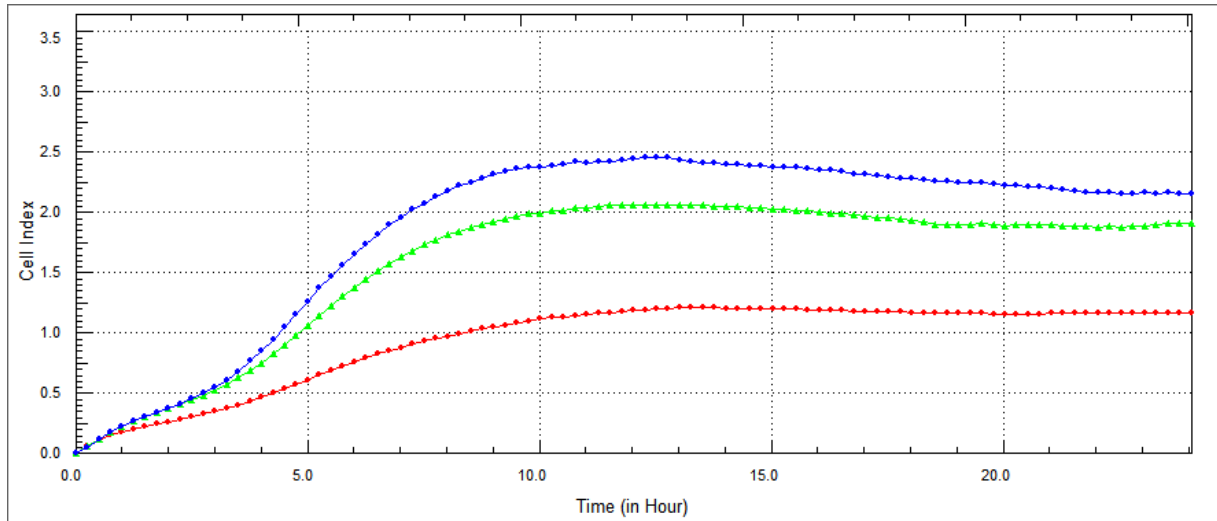
Şekil 16. UT-SCC-74A hücrelerinin (Kırmızı 5000, yeşil 10000, mavi 20000 hücre/kuyucuk ekildi) gerçek zamanlı hücre analiz grafiği.

Bu analiz sonucu en iyi büyüme grafiğinin kuyucuk başına 10000 hücre ekteğimizde elde edildiğini görüyoruz. Böylece UT-SCC-74A hücre hattı için deneyde kullanacağımız hücre konsantrasyonu 10000 hücre/kuyucuk olarak belirlenmiştir. Çünkü 20000 hücre/kuyucuk ekteğimizde hücre yoğunluğu çok hızlı bir şekilde ve 5000 hücre/kuyucuk ekteğimizde ise çok yavaş arttığını görüyoruz. Ayrıca bu grafik sonucu krosetin uygulama saatinin ise 24. Saat olduğuna karar verilmiştir. Çünkü büyüme grafiğinin artış kısmına baktığımızda son 1/3'lük kısmının başına denk gelen zaman aralığı madde uygulanması için en uygun zaman aralığıdır.



Şekil 17. UT-SCC-74B hücrelerinin (Kırmızı 5000, yeşil 10000, mavi 20000 hücre/kuyucuk ekildi) gerçek zamanlı hücre analiz grafiği.

Bu analiz sonucu en iyi büyüme grafiğinin kuyucuk başına 10000 hücre ekteğimde elde edildiğini görüyoruz. Böylece UT-SCC-74B hücre hattı için de deneyde kullanacağımız hücre konsantrasyonu 10000 hücre/kuyucuk olarak belirlenmiştir. Çünkü 20000 hücre/kuyucuk ekteğimde hücre yoğunluğu çok hızlı bir şekilde ve 5000 hücre/kuyucuk ekteğimde ise çok yavaş arttığını görüyoruz. Bu grafik sonucunda da krosetin uygulama saatinin ise 24. Saat olduğuna karar verilmiştir.

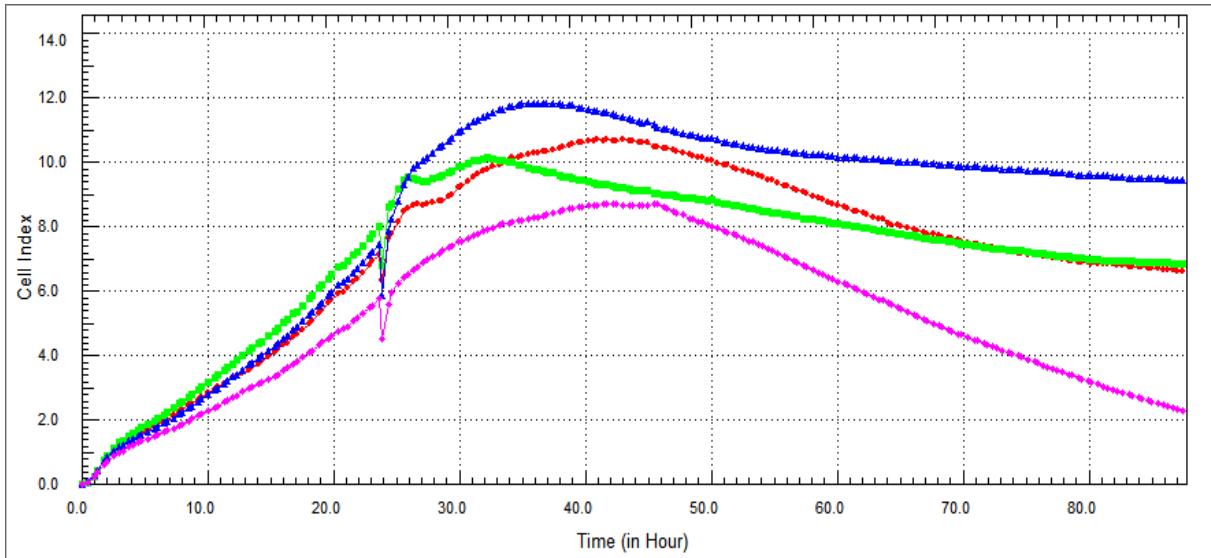


Şekil 18. HUC-F hücrelerinin (Kırmızı 5000, yeşil 10000, mavi 20000 hücre/kuyucuk ekildi) gerçek zamanlı hücre analiz grafiği.

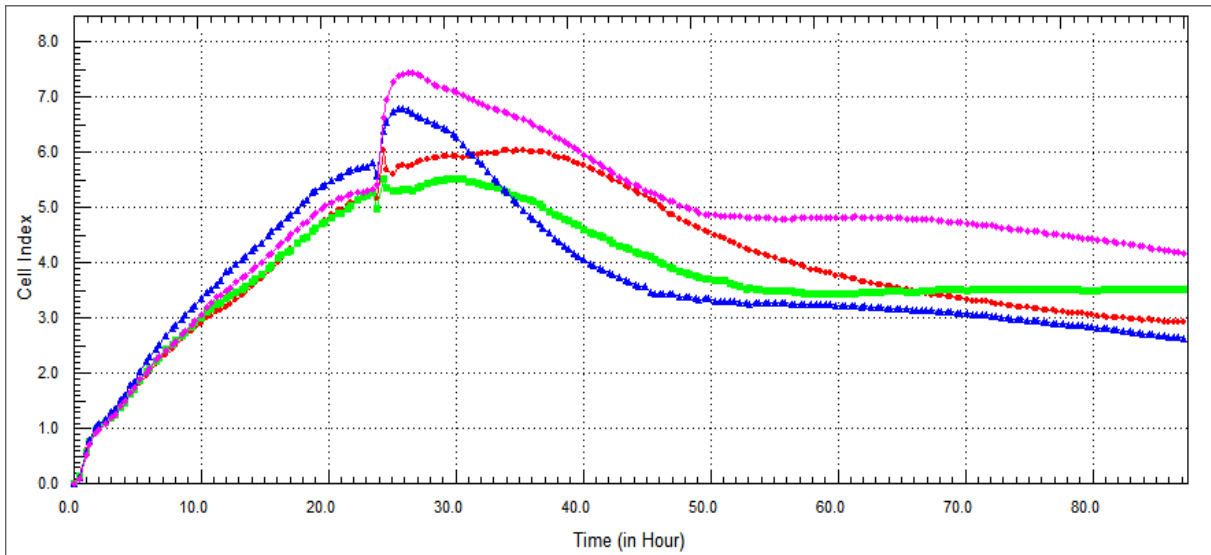
Bu analiz sonucunda da diğerlerinde olduğu gibi en iyi büyüme grafiğinin kuyucuk başına 10000 hücre ekteğimde elde edildiğini görüyoruz. Böylece HUC-F hücre hattı için de deneyde kullanacağımız hücre konsantrasyonu 10000 hücre/kuyucuk olarak belirlenmiştir. Ancak bu grafik sonucunda madde uygulama için uygun olan saatin farklı olduğunu görüyoruz. Diğer hücre hatlarına göre çok daha kısa sürede maksimum cell indeksine ulaşmıştır. HUC-F hücre hattı için krosetin uygulama saatinin 8. Saat olduğuna karar verilmiştir.

4.3.2. Krosetinin Hücre Hatları Üzerindeki Etkisini Gösteren Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Sonuçları

UT-SCC-74A, UT-SCC-74B ve HUC-F hücreleri xCELLigence cihazının platelerine ekilerek ardından krosetin uygulandı ve gerçek zamanlı hücre analizi yapıldı.



Şekil 19. UT-SCC-74A hücrelerinin (Mavi(Kontrol), kırmızı(100 μ M), yeşil (250 μ M), pembe(500 μ M) krosetin uygulandı) gerçek zamanlı hücre analiz grafiği.

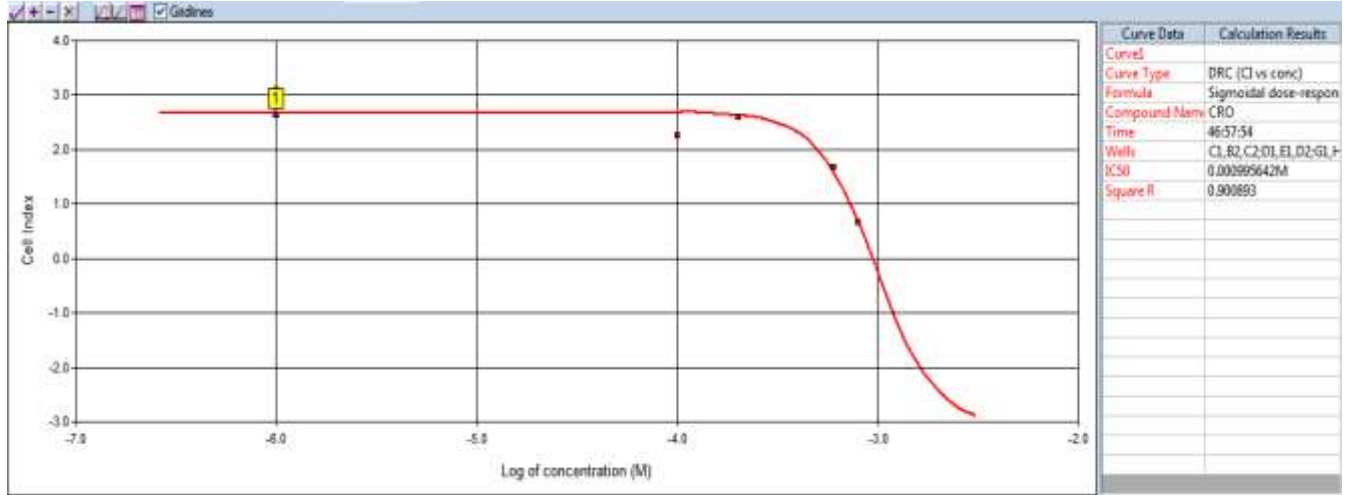


Şekil 20. UT-SCC-74B hücrelerinin(Pembe(Kontrol), kırmızı(100 μ M), yeşil (250 μ M), mavi(500 μ M) krosetin uygulandı) gerçek zamanlı hücre analiz grafiği.

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hattında krosetinin farklı konsantrasyonların etkisi belirlenmiştir. Bu grafiklere bakıldığında uygulanan krosetin dozu arttıkça hücre proliferasyonunun azaldığı görülmektedir.

4.3.3. IC50 değerinin belirlenmesi

xCELLigence analizlerinin sonucuna göre bundan sonraki western blotting ve Real time PCR aşamalarında kullanmak için krosetinin etkili olduğu değeri bulmak gerekiyordu. Bu nedenle krosetinin hücreleri en çok ldrdęu değerin yarısı olan IC50 değeri belirlendi.

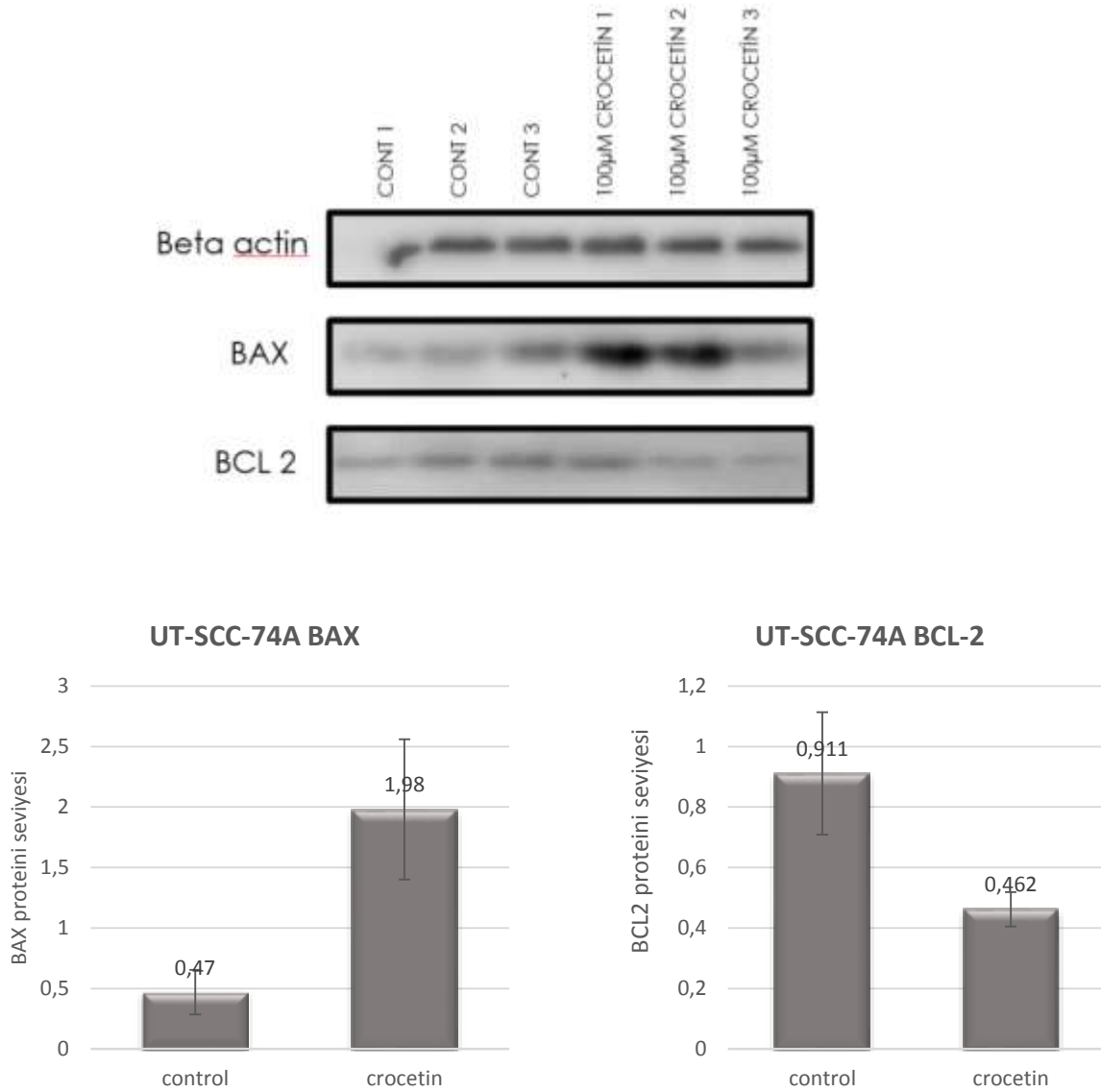


şekil 21. xCELLigence cihazının programında IC50 değerinin hesaplanması.

4.4. Krosetinin Etkisini Gösteren Western Blotting Sonuçları

UT-SCC-74A, UT-SCC-74B ve fibroblast hücreleri hücre kültüründe büyütülerek krosetin uygulanmasının ardından western blotting yapmak üzere proteinleri izole edildi ve western blotting yöntemi ile krosetinin BAX, BCL-2 ve beta aktin protein seviyelerine etkisi gözlemlendi.

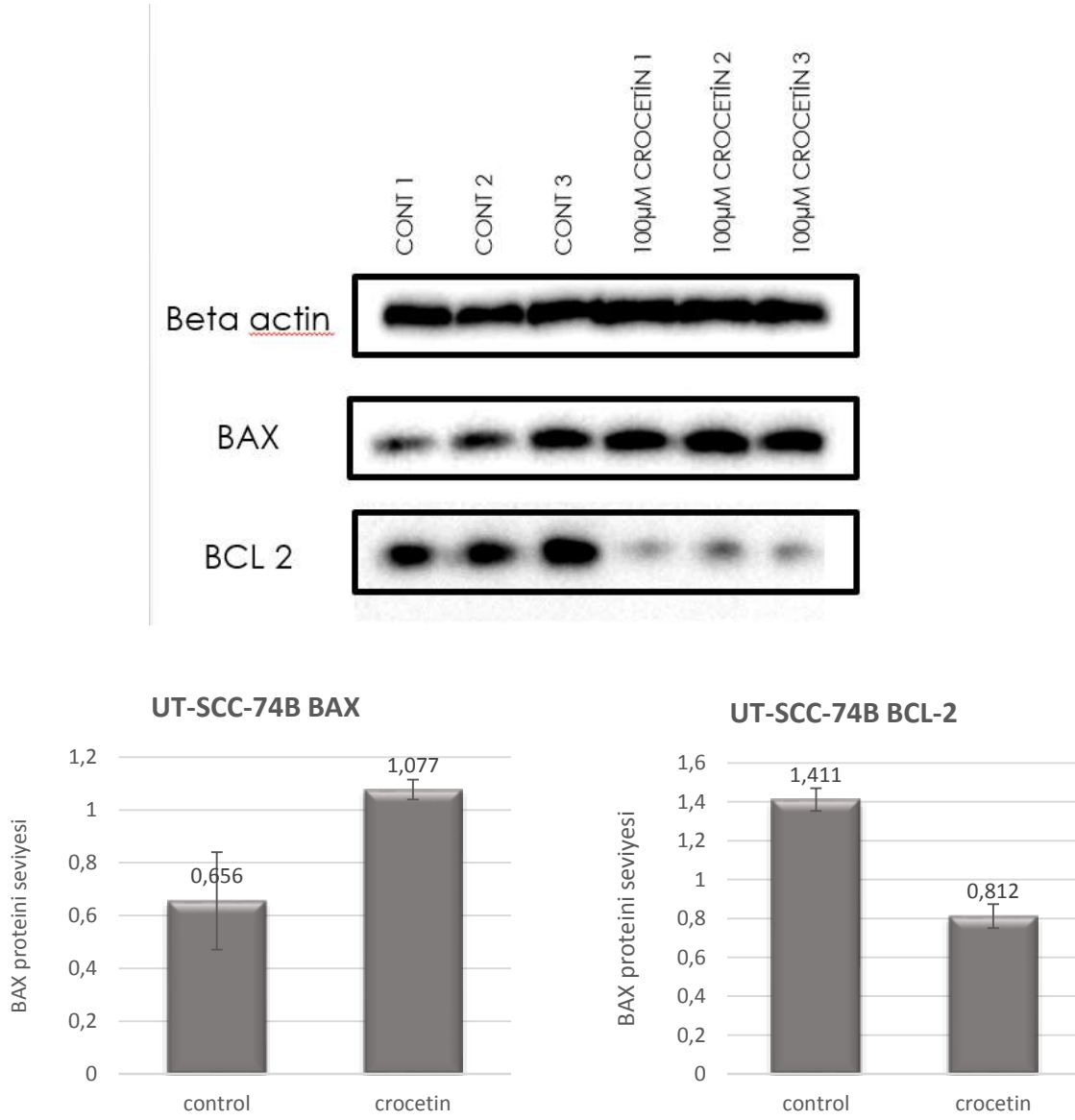
4.4.1. UT-SCC-74A Hücre Hattında Krosetinin BAX Ve BCL-2 Proteinlerine Olan Etkisinin Western Blotting Sonuçları



Şekil 22. UT-SCC-74A Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 protein seviyelerine olan etkisinin gösterildiği western blotting sonuçları

UT-SCC-74A hücrelerinden izole edilen proteinlerle yapılan western blotting sonuçlarına bakıldığında BAX proteinin seviyesinin kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde arttığını, BCL-2 protein seviyesinin ise aynı şekilde azaldığını görüyoruz.

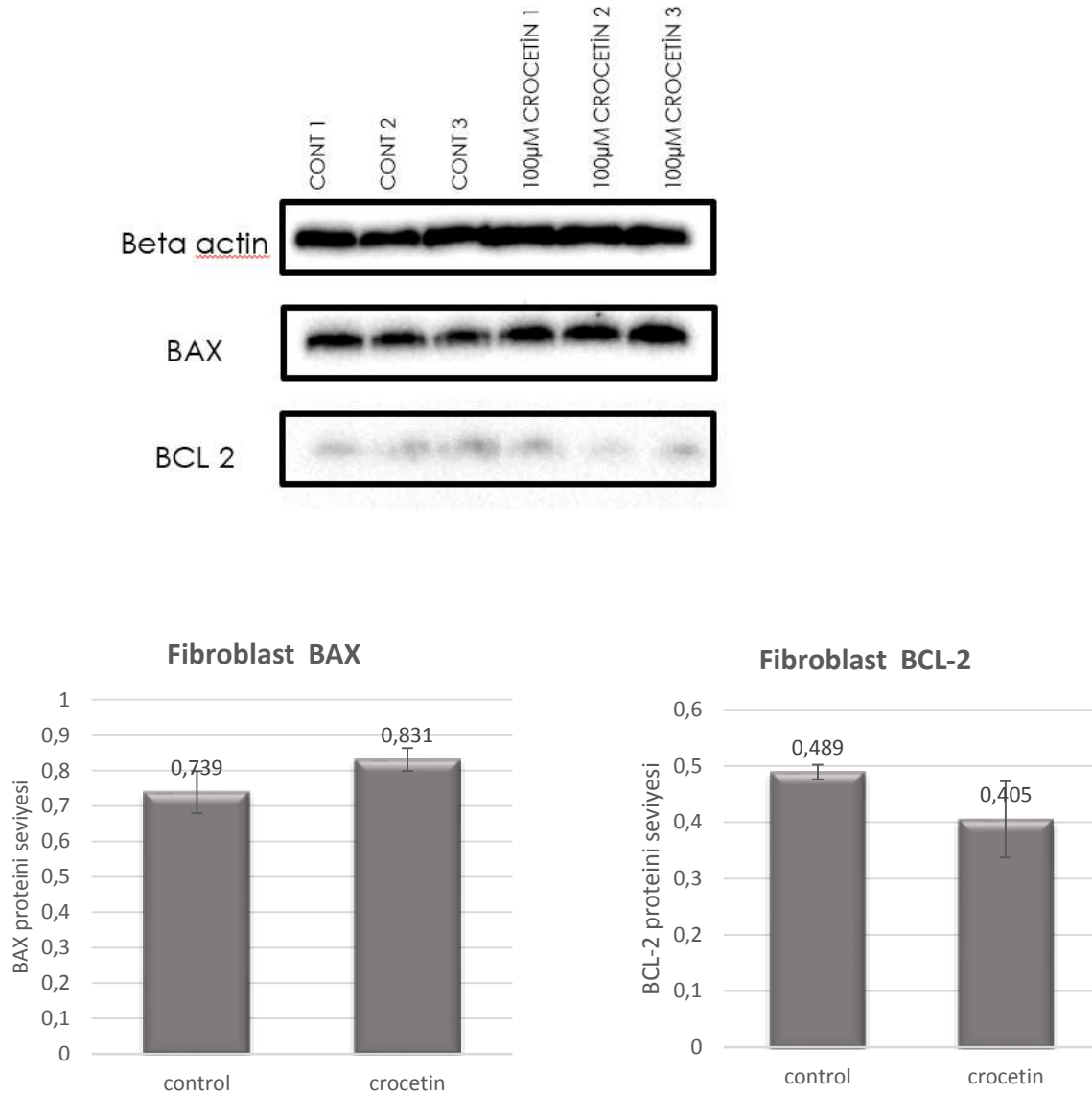
4.4.2. UT-SCC-74B Hücre Hattında Krosetinin BAX Ve BCL-2 Proteinlerine Olan Etkisinin Western Blotting Sonuçları



Şekil 23. UT-SCC-74B Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 protein seviyelerine olan etkisinin gösterildiği western blotting sonuçları

UT-SCC-74B hücrelerinden izole edilen proteinlerle yapılan western blotting sonuçlarına bakıldığında BAX proteinin seviyesinin kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde arttığını, BCL-2 protein seviyesinin ise aynı şekilde azaldığını görüyoruz.

4.4.3. Fibroblast Hücre Hattında Krosetinin BAX Ve BCL-2 Proteinlerine Olan Etkisinin Western Blotting Sonuçları

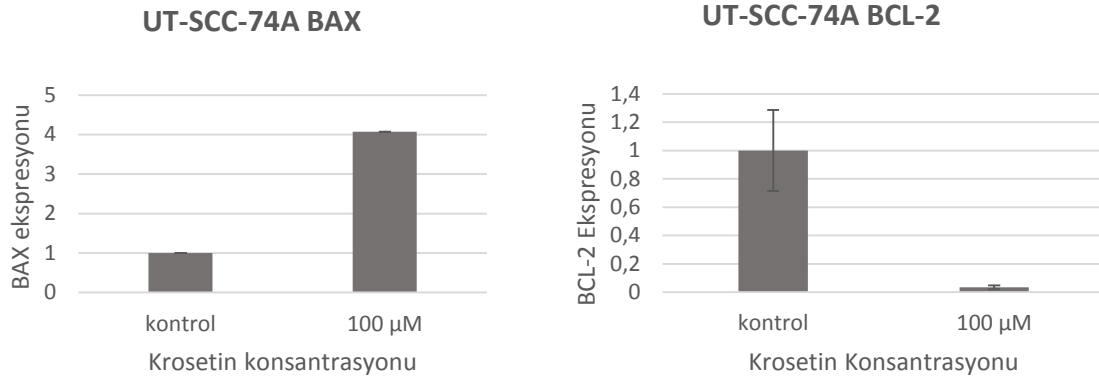


Şekil 24. Fibroblast Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 protein seviyelerine olan etkisinin gösterildiği western blotting sonuçları

HUC-F (Fibroblast) hücrelerinden izole edilen proteinlerle yapılan western blotting sonuçlarına bakıldığında BAX proteinin seviyesinin kontrol grubuna kıyasla az bir miktarda şekilde arttığını, BCL-2 protein seviyesinin ise aynı şekilde azaldığını görüyoruz. Ancak UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hatlarına göre bu değişim çok az müktaarlarda gerçekleşmiştir. Kanserli hücre hatlarında çok daha belirgin bir fark gözlenmiştir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ve sağlıklı hücrelerle kanser hücreleri aralarındaki BAX, BCL-2 protein seviyeleri değişimi istatistiksel olarak anlamlıdır $p < 0,5$.

4.5. Krosetinin Etkisini Gösteren Real-Time PCR Sonuçları

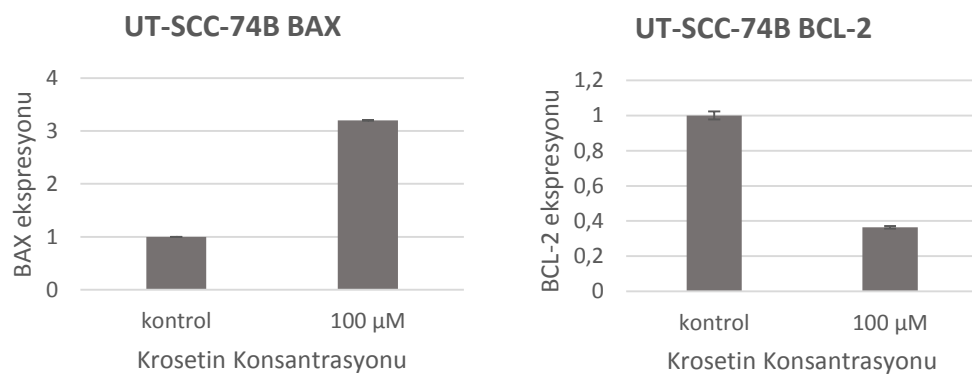
4.5.1. UT-SCC-74A Hücre Hattında Krosetinin BAX Ve BCL-2 Ekspresyonlarına Olan Etkisinin Real-Time PCR Sonuçları



Şekil 25. UT-SCC-74A Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 genlerinin ekspresyon seviyelerine olan etkisinin gösterildiği Real-time PCR sonuçları

UT-SCC-74A hücrelerinde real time sonuçlarına bakıldığında BAX ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla 4 kat kadar arttığını, BCL-2 ekspresyonunun ise aynı şekilde belirgin miktarda azaldığını görüyoruz. Bu artış ve azalış hücrelerin apoptoza gittiğinin önemli bir göstergesidir.

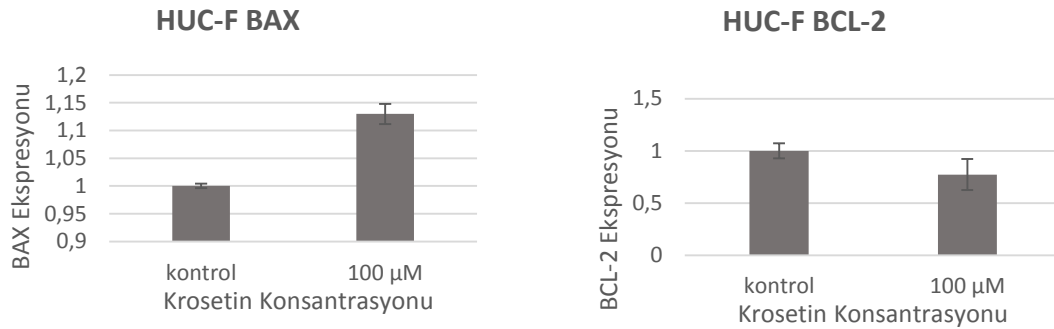
4.5.2. UT-SCC-74B Hücre Hattında Krosetinin BAX Ve BCL-2 Ekspresyonlarına Olan Etkisinin Real-Time PCR Sonuçları



Şekil 26. UT-SCC-74B Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 genlerinin ekspresyon seviyelerine olan etkisinin gösterildiği Real-time PCR sonuçları

UT-SCC-74B hücrelerinde real time sonuçlarına bakıldığında BAX ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla 3 kat kadar arttığını, BCL-2 ekspresyonunun ise aynı şekilde yaklaşık 3 kat azaldığını görüyoruz. Bu artış ve azalış hücrelerin apoptoza gittiğinin önemli bir göstergesidir.

4.5.3. Fibroblast Hücre Hattında Krosetinin BAX Ve BCL-2 Ekspresyonlarına Olan Etkisinin Real-Time PCR Sonuçları

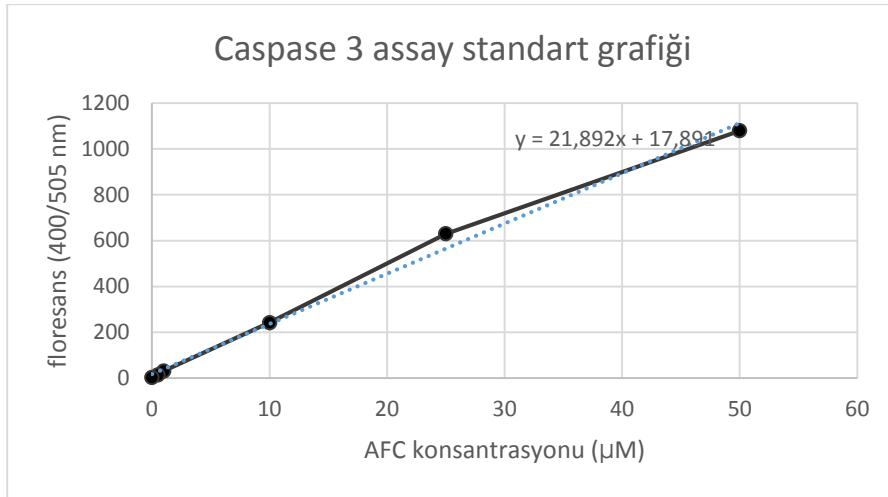


Şekil 27. HUC-F(Fibroblast) Hücre hattında krosetinin BAX ve BCL-2 genlerinin ekspresyon seviyelerine olan etkisinin gösterildiği Real-time PCR sonuçları

HUC-F hücrelerinde real time sonuçlarına bakıldığında BAX ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla arttığını, BCL-2 ekspresyonunun ise azaldığını görüyoruz. Ancak bu değişimin UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücrelerinde olduğu kadar fazla bir oranda değil, çok daha az oranda olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ve sağlıklı hücrelerle kanser hücreleri aralarındaki BAX, BCL-2 gen ekspresyonları değişimi istatistiksel olarak anlamlıdır $p < 0,5$.

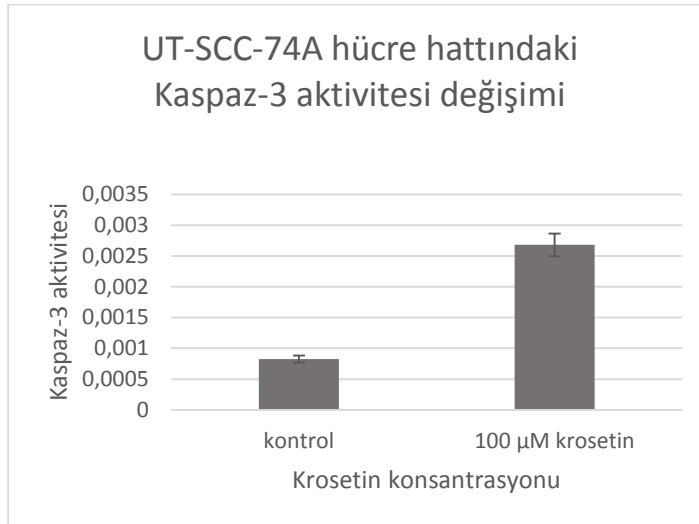
4.6.Krosetinin Kaspaz-3 Aktivitesine Olan Etkisini Gösteren Sonuçları

Kaspaz-3 Assay sonucunda florometrik ölçüm sonucu elde edilen standartların değerleri kullanılarak standart eğrisi çizildi(Şekil 24). Bu eğrinin eğimi kaspaz-3 aktivitesi hesaplarken kullanıldı.



Şekil 28. Kaspaz-3 assay standart eğrisi

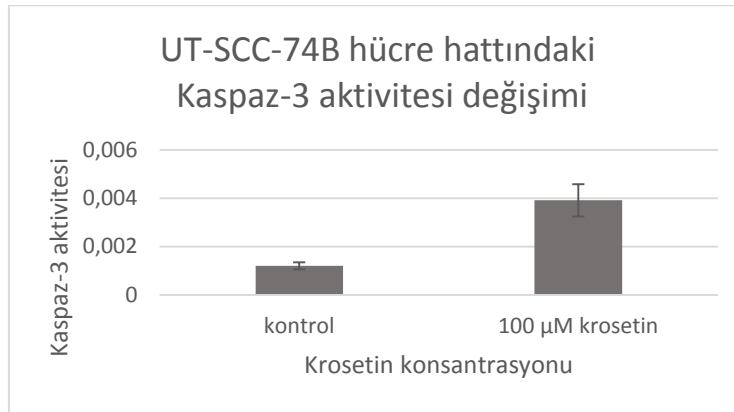
4.6.1. UT-SCC-74A Hücre Hattında Krosetinin Kaspaz-3 Aktivitesine Olan Etkisi



Şekil 29. UT-SCC-74A hücre hattındaki kaspaz3 aktivitesi değişimi

UT-SCC-74A hücrelerinde yapılan kaspaz-3 assay sonuçlarına bakıldığında kaspaz-3 aktivitesinin kontrol grubuna göre belirgin miktarda arttığını görüyoruz. Bu artış baş boyun kanseri primer tümör hücrelerinin krosetin etkisiyle apoptoza gidişinin indüklendiğinin göstergesidir.

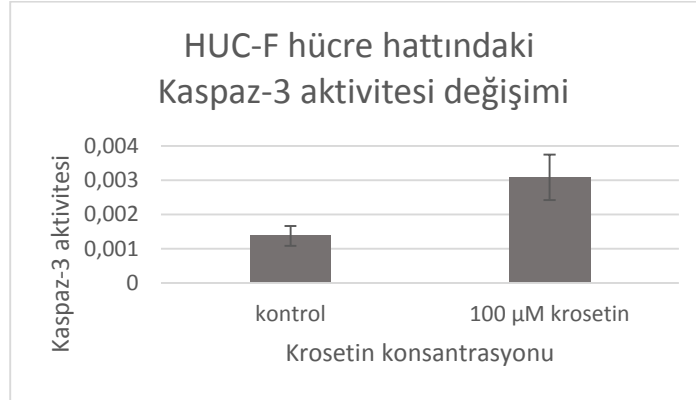
4.6.2. UT-SCC-74B Hücre Hattında Krosetinin Kaspaz-3 Aktivitesine Olan Etkisi



Şekil 30. UT-SCC-74B hücre hattındaki kaspaz3 aktivitesi değişimi

UT-SCC-74B hücrelerinde yapılan kaspaz-3 assay sonuçlarına bakıldığında kaspaz-3 aktivitesinin kontrol grubuna göre belirgin miktarda arttığını görüyoruz. Bu artış baş boyun kanseri metastaz tümör hücrelerinin krosetin etkisiyle apoptoza gidişinin indüklendiğinin göstergesidir.

4.6.3. HUC-F Hücre Hattında Krosetinin Kaspaz-3 Aktivitesine Olan Etkisi



Şekil 31. HUC-F hücre hattındaki kaspaz 3 aktivitesi değişimi

HUC-F hücrelerinde yapılan kaspaz-3 assay sonuçlarına bakıldığında kaspaz-3 aktivitesinin kontrol grubuna göre bir miktar arttığını görüyoruz. Ancak bu artış kanser hücrelerindeki kadar fazla bir oranda değildir. Bu artış baş boyun kanseri primer tümör ve metastaz hücrelerinde de, sağlıklı fibroblast hücrelerinde de krosetin etkisiyle apoptoza gidişinin indüklendiğinin göstergesidir ancak kanser hücrelerindeki kaspaz-3 aktivitesi çok daha fazla bir oranda artış göstermektedir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ve sağlıklı hücrelerle kanser hücreleri aralarındaki kaspaz 3 aktivitesi değişimi istatistiksel olarak anlamlıdır $p < 0,5$.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, üzerinde çok fazla araştırma yapılan, günümüze kadar birçok bilim adamının üzerinde durduğu bir hastalıktır. Latince’de yengeç anlamına gelen “crab” sözcüğünden türetilmiştir. Bu hastalık başladığı bölgeden diğer organlara yayıldığında Yunanlı hekim Hipokrat bu tanımlamayı yapmıştır [99]. Kanser, hücrelerin farklılaşarak kontrolsüz, anormal ve aşırı derecede çoğalıp bir kitle ve tümör oluşturmasıdır. Kanser birçok çeşidi vardır ama hepsi anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesiyle başlamaktadır. Kontrolsüz büyüme özelliği kazanarak tümör oluşturan kanser hücreleri tümörden ayrıldıklarında, kan veya lenf dolaşımına katılarak vücudun farklı bölgelerine metastaz yaparlar ve farklı bölgelerde tümör kolonileri oluştururarak büyümeye devam ederler. Kanser sebepleri çevresel etkenler veya genetik yatkınlık olabilir. Yani sigara, kimyasallar, radyasyon, beslenme gibi dış kaynaklı sebepler kansere yol açtığı gibi, kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, immün koşullar ve genlerdeki mutasyonlar da kansere yol açmaktadır. Bu faktörler birlikte kansere neden olabileceği gibi tek başlarına da kansere sebep olabilirler [100].

Amerika’da yapılan araştırmaya göre, kanserin en çok karşılaşılan ikinci ölüm sebebi olduğu belirtilmiştir. Hayatları boyunca erkeklerin yarısında ve kadınların üçte birinde kanser hastalığının görülebileceği belirtilmiştir. Günümüzde de milyonlarca insanın kanserli olduğu ve öncesinde kanser öyküsüne sahip olduğu belirtilmiştir [101].

Çalışmamızda alternatif tıpta kullanılan doğal bir bileşen olan krosetinden faydalanılmıştır. Bitkilerden elde edilen bazı özler kanserden koruyucu ajanların gelişmesi amacıyla kullanılmaktadırlar. Safrandan elde edilen bileşenlerin antitümör etkisi olduğu ve anti-kanser ajanı olarak kullanılan ilaçların yan etkilerini azalttığı bilinmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda kanser tedavisinde sitotoksitesitesi düşük maddelerin kanser üzerindeki etkileri ve hedefe yönelik tedaviler araştırılmaktadır. Hedefe yönelik tedaviler içinde hücre ölümünde rol oynayan genler incelenmiş, bunlar üzerine çalışmalar yapılmıştır. Örneğin hücre ölüm türü olan apoptoz yolağında görevli Bcl-XL, Bcl-2 gibi anti-apoptotik genleri hedef alan inhibe edici küçük moleküllerin klinik öncesi deneme aşamasında olduğu belirtilmiştir. Günümüzde bu şekilde araştırması sürdürülen molekül olduğu gibi tedavide kullanılan moleküller de mevcuttur. Anti-apoptotik olan Bcl-2 üzerine fosforilasyonla etki edip, meme kanseri hücrelerini apoptoza götüren Doksitaksel de buna örnek gösterilebilir [102]. Bu ilaçların

kemoterapik ilaçlarla kullanımının tedaviyi etkin hale getirdiği çalışmalarda belirtilmiştir [103]. Bu tarz birçok çalışma olmakla birlikte bu çalışmaların tamamen çare olmadığı, sağlıklı hücrelere zarar vermeyen sitotoksik etkisi az olan ilaçlar olmadığı belirtilmiştir. Farklı yollar esas alınarak yapılan çalışmalar da dahil olmak üzere bu çalışmaların yetersiz olduğu sitotoksitesi düşük maddelerin tedavide arandığı bildirilmiştir [104]. Bu çalışmada da krosetinin yukarıda anlatılan apoptoz yollarında etkili olan genler üzerindeki etkisi incelendi ve apoptoza olan etkisi araştırıldı. Daha önceki yapılan çalışmalarda bitkisel tedavinin sağlıklı hücrelere zarar vermediği tespit edilmiştir. Halk arasında birçok bitki hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkilerin yaprakları, kökleri, gövdeleri, meyveleri, bitkilerden elde edilen yağları hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ünce yapılan çalışmada dünyadaki nüfusun %80'inin sağlığı için geleneksel tedaviye güvendiği tespit edilmiştir [105]. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımlarının insanlık tarihiyle birlikte başladığı, binlerce yıl öncesinden bitkilerin tedavi ediciliğinden faydalanmaya başladığı kaynaklarda belirtilmiştir. Halk arasında kullanılan bitkilerin Anadolu'da da yaygın olduğu ve bunun günümüze kadar geldiği bildirilmiştir.

Halen kullanılan ilaçlar arasında da birçok ilacın bitki kökenli olduğu ifade edilmiştir. Ülkemizde üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunmasından dolayı birçok farklı çeşit bitkiye ev sahipliği yapmaktadır. Terapötik amaçla çeşitli bitkiler kullanıldığı ve bunların sayısının 20.000 olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilmiştir. İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgular insanların besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalandığını göstermektedir [106].

Safran Hititler zamanından beri Anadolu'daki insanlar tarafından baharat ve ilaç olarak kullanılmaktadır ve tedavi edici birçok özelliğe sahiptir. Bu bitkinin birçok kullanım alanı olduğu gibi antikanserojen etkisinin de mevcut olduğuna dair çalışmalar yapılmıştır. Safranın farklı yerlerde yetişen 80 türü vardır [107,108]. Safranın toksisitesi de birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda safranın kayda değer bir toksik etkisi bulunmadığı sonucuna varılmıştır [109].

Krosetin, safrandan elde edilmiş doğal bir bileşen olup yapılan deneysel hayvan modellerinde ve hücre kültürü çalışmalarında bir antitümör ajanı olarak önemli bir potansiyel göstermiştir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada farklı tümör tipleri üzerinde toksik etki göstererek farelerin yaşam süresini arttırdığı görülmüştür [93]. Ayrıca farelerin mikrogial hücrelerinde de krosetin etkisi araştırılmış ve nörotoksik moleküllerin üretiminde azalmaya yol açtığı gözlemlenerek anti-inflamatuar etkisi olduğu kanıtlanmıştır [94]. Krosetinin meme

kanseri üzerindeki etkisinin araştırıldığı farklı bir çalışmada ise MDA-MB-231 kanser hücrelerine krosetin uygulanarak proliferasyonu azalttığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda da krosetin baş boyun kanseri hücre hatlarına uygulandığında artan dozlarla orantılı bir şekilde proliferasyonu azalttığı gözlenmiştir. Proliferasyon deneyimiz meme kanseri ile yapılan bu çalışmayla örtüşmektedir.

Ayrıca başka bir çalışmada pankreas kanseri hücreleri olan MIA- PaCa-2, BxPC3, Capan-1 ve ASPC-1 hücre hatlarına krosetin uygulanan bir diğer çalışmada, BAX, BCL gibi apoptoz ilişkili proteinler ve hücre döngüsünü etkileyen CyclinB gibi protein seviyelerindeki değişim incelenmiş ve krosetinin BAX ekspresyonunu arttırdığı, BCL2 ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir. BAX ve BCL2 gen ekspresyon seviyelerini baş boyun kanserinde incelediğimiz bizim çalışmamızda da aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle krosetin uygulanmasının diğer kanser türlerinde gösterdiği benzer etkiyi, yaptığımız çalışma sonucu baş boyun kanseri üzerinde de gösterdiğini söyleyebiliriz [95].

Krosetinin etkisi serviks, akciğer ve yumurtalık kanseri üzerinde de araştırılmış ve serviks için HeLa, akciğer kanseri için A549 ve ovaryum için SKOV3 hücrele hatları kullanılarak bu hücrelere krosetin uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonunda ise krosetinin hücre döngüsünde G1 kontrol noktası üzerinde etki göstererek kanser hücrelerinin poliferasyonunu inhibe ettiği, apoptoza yol açarak hücre ölümlerinde artışa sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Yine aynı çalışmada, hücre döngüsünde p53 bağımlı ve p53 bağımsız mekanizmalar araştırılmış ve her iki durumda da krosetinin aynı etkiyi gösterildiği sonucuna varılmıştır [97].

Sheng Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bu konudaki yayımlanan son çalışmalardan biridir ve özafagus kanserinde krosetinin antitümör etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada da bizim çalışmamızla örtüşen sonuçlar elde edilmiştir. Krosetinin artan dozlarla uygulandığında, hücre canlılığını azalttığını belirlemişlerdir ayrıca protein düzeyinde yaptıkları çalışmada BAX'ın krosetin uygulaması sonucu artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da BAX, ehem gen ekspresyonu düzeyinde hem de protein düzeyinde incelenmiş ve krosetinin etkisiyle artışı gözlenmiştir, ayrıca BAX'a zıt çalışan BCL-2 de aynı şekilde incelenmiş ve gen ekspresyonlarında ve protein seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. Diğer taraftan Sheng Li ve arkadaşlarının çalışmasında migrasyon deneylerinde kontrol grubuna göre krosetinin hücre migrasyonunu yavaşlattığını göstermişlerdir [110].

Tüm bu çalışmalara bakıldığında hedef seçilen bu bitki üzerinde birçok çalışma yapılabilecek bir bitkidir. Yapılan çalışmalarda krosetinin kanser hücre hatlarında hücreleri apoptotik yolağı kullanarak ölüme götürdüğü bildirildiğinden bu çalışmada da bu yolak hedef alınmış, çalışmalar buna göre sürdürülmüştür.

Apoptoz regülasyonunun Bcl-2 gen ailesi ile sağlandığı belirtilmiştir. Bu ailenin yirmi üyesi vardır ve Bax proapoptotik genidir, Bcl-2’de apoptoz inhibitörüdür, antiapoptotiktir [111]. Proapoptotik proteinler, Sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salımının artmasına yol açarak apoptozu indükler. Antiapoptotik proteinler ise mitokondrinin dış zarında, endoplazmik retikülümde ve çekirdek zarında bulunurlar. Bu proteinler porların oluşumunda görev alırlar ve iyon transportunu sağlarlar. Hücrede bulunan kalsiyum oranını düzenlerler. Aynı zamanda prokaspazları, AIF ve sitokrom-c salımını engelleyerek apoptozun inhibisyonunda görev alırlar [112]. Sitoplazmaki sitokrom c apoptozun en son basamağında rol alırken, AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanan çekirdeğe yönelir [111-113]. Hücrenin yaşamını ya da ölümünü belirleyen önemli bir kapı; mitokondrinin dış membranıdır. Bu membrandaki kanallların açılıp kapanmasında anti-apoptotik ve pro-apoptotik genler görevlidir. Bazı anti-apoptotik sinyaller dış mitokondriyal membran kanallarını kapalı tutmaya çalışırken bazıları tersine pro-apoptotik ölüm sinyalleri de bu kanalları açmak için çalışır.

Bax ve Bcl-2 genleri ile şu ana kadar yapılan birçok çalışmada farklı maddelerin kanser hücrelerinde etkisi incelenirken bu genlerin apoptoz üzerindeki rolleri araştırılmıştır [114,115]. Ve yapılan çalışmalar Bcl-2 ve Bax genlerinin hücre proliferasyonu ve apoptozda kilit rol oynadıklarını göstermektedir [116,117]. Krosetin de hücrelerde apoptoz yolaklarında etkili olan Bcl-2 ailesinin ekspresyonunu etkilemektedir. Farklı çalışmalarda krosetinin, proapoptotik gen olan Bax’ın ekspresyonunu artırıcı ve antiapoptotik gen olan Bcl-2’nin ekspresyonunu inhibe edici etkisi saptanmıştır [118].

Çalışmamızda baş-boyun kanseri primer tümör ve metastaz hücre hatlarına krosetin uygulanarak, bu hücrelerin poliferasyonu, migrasyonu, hücre döngüsü ve apoptoza gidiş oranları üzerinde etkisi olup olmadığı incelendi. Öncelikle farklı dozlarda krosetin ile muamele edilen baş boyun kanseri hücre hatlarının proliferasyonlarındaki değişim incelendi. Proliferasyon deneyleri xCELLigence cihazı ile yapıldı ve krosetinin artan dozları uygulandığında proliferasyonun orantılı bir şekilde azaldığı gözlemlendi.

Baş boyun kanseri primer ve metastaz hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda krosetin uygulandıktan sonra, krosetin uygulanmış ve kontrol grubu hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı, ardından cDNA sentezi gerçekleştirilerek Real Time PCR yapılarak gen ekspresyonlarındaki değişime bakıldı. Sonucunda ise krosetinin apoptozda yer alan proapoptotik bir gen olan BAX’ın gen ekspresyonu düzeyinde ve aynı zamanda protein düzeyinde artışına sebep olduğu ve anti-apoptotik gen olan BCL-2’nin ise hem gen ekspresyon düzeyinde hem de protein seviyeleri düzeyinde düşüşe neden olduğu belirlendi. Real time PCR

ile Bcl-2 ve Bax genlerinin ekspresyonlarında kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. Gen ekspresyonlarına baktıktan sonra Bax ve Bcl-2 genlerinin ürünleri olan proteinler de ayrıca izole edilerek western blotting yöntemi ile görüntüldü. Böylece Real time ile ekspresyonlarına bakılan genler, diğer taraftan bu genlerin ürünü olan proteinler western blotting yöntemi ile görüntülenerek sonuçları her iki yönden doğrulamış olduk.

Diğer yandan kontrol gruplarında ve krosetin uygulanmış gruplarda apoptoz yolağında oldukça önemli role sahip bir protein olan kaspaz3 aktiviteleri incelendi. Kaspaz3 aktivitesi analizinin sonucunda krosetinin kaspaz3 aktivitesini arttırdığı görüldü. Tüm bu sonuçlar krosetinin, hücreleri apoptoza götürdüğünün önemli bir göstergesidir. Aynı zamanda elde ettiğimiz sonuçlarımız, literatürdeki krosetinin farklı kanser hücre hatlarına olan etkilerinin incelendiği çalışmalara bakıldığında bu çalışmalardan elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir. Bu çalışmada literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak kanser hücre hatlarının yanında bir de kontrol olarak sağlıklı hücre hattı olan HUC-F(fibroblast) hücre hattı da kullanıldı

Tüm bu çalışmalar ışığında krosetinin apoptotik etkisini baş boyun kanseri tümör ve metastaz hücre hatlarında gözlemlerken, daha az oranda da olsa HUC-F hücre hattında da görüldü. Ancak tüm deneylerdeki kanser hücre hatları ve sağlıklı hücre hattındaki krosetinin etkisini gösteren sayısal değerler kullanılarak istatistiksel olarak incelendi ve tüm deneyler için aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı $p < 0.05$ bulundu. Yapılacak daha geniş çalışmalar ile apoptotik yolaktaki diğer genler de incelenerek bu çalışma ilerletilebilir.

Sonuçta bu çalışmada doğal bir bileşen olan krosetinin baş-boyun kanseri tedavilerinde daha etkili tedavilerin bulunabileceğine işaret olabileceği gösterilmiştir. Krosetinin ilerleyen çalışmalarda da kemoterapik ilaçlarla birlikte kullanılabilmesi, yan etkilerinin azaltılabileceği öngörülmektedir. Yapılan bu çalışma ülkemizin de ilerlemesine sebep olacaktır. Çünkü krosetinin elde edildiği safranın kaynağı olan *Crocus sativus* ülkemizde yetişen oldukça değerli bir bitkidir. *In vitro*'da başlayan bu çalışma *in vivo* aşamaya da geçirilerek ilerletilebilir, sonrasında tedavi amacıyla kullanılabilir. Bu çalışmada ileriki çalışmalar için basamak oluşturmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. imgarcade.com/galleryforheadandneckanatomy (alıntı tar. 04.05.15)
2. Million, R.R., Cassisi, N.J., Mancuso, A.A., (1994). *Management of Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach Lippincott* (Sf.311-320), Philadelphia.
3. Boffetta, P., Hecht, S., Gray, N., Gupta, P., Straif, K., (2008). Smo-keless tobacco and cancer, *The Lancet Oncology*, 9(7):667–675.
4. Blot, W.J., McLaughlin, J.K., Winn, D.M., et al., Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer, *Cancer Research*, 1988;48:3282.
5. Gandini, S., Botteri, E., Iodice, S., et al. (2008). Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis, *International Journal of Cancer*,122(1):155–164.
6. Shopland, D.R., Burns, D.M., Garfinkel, L., et al. Monograph 8: Changes in cigarette-related disease risks and their implications for prevention and control. *Bethesda: National Institutes of Health, National Cancer Institute*, NIH Pub. No 97-4213,1997.
7. Stevens, M.H., Gardner, J.W., Parkin, J.L., et al. (1983) Head and neck cancer survival and lifestyle change, *Arc Otolaryngol Head Neck*; 109(11):746-9.
8. Chuang, S.C., Scelo, G., Tonita, J.M., et al. (2008). Risk of se-cond primary cancer among patients with head and neck cancers: a pooled analysis of 13 cancer registries. *International Journal of Cancer*, 123(10):2390–2396.
9. Do, K.A., Johnson, M.M., Doherty, D.A., et al.(2003). Second primary tumors in patients with upper aerodigestive tract cancers: joint effects of smoking and alcohol, *Cancer Causes and Control*, 14(2):131–138. United States.
10. Des Rochers, C., Dische, S., Saunders, M.I.(1992). The problem of cigarette smoking in radiotherapy for cancer in the head and neck, *Clinical Oncology*, 4(4):214-6.
11. Cancer Facts and Figures (2012). *American Cancer Society*, Atlanta, GA.
12. Devesa, S.S., Blot, W.J., Stone, B.J., et al.(1995). Recent cancer trends in the United States. *J Natl Cancer Inst* ;87:175-82.
13. Mork, J., Moller, B., Glatte, E., (1999). Familial risk in head and neck squamous cell carcinoma diagnosed before the age of 45: a population- based study. *Oral Oncology*;35:360-7
14. Donald, P.J., Marijiuna, (1986). Smoking-possible cause of head and neck carcinoma in young patients, *Otolaryngol Head Neck Surgery*;94:517.

15. Galli, J., Cammarota, G., Calo, L., et al.(2002). The role of acid and alkaline reflux in laryngeal squamous cell carcinoma, *Laryngoscope*;112(10): 1861-5.
16. El-Serag, H.B., Hepworth, E.J., Lee, P., et al.(2001). Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer, *Am J Gastroenterology*,96:2013-8.
17. Fey, S.J., Larsen, P.M.(1998) DNA viruses and human cancer, *Cancer Letters*;41:1.

18. Shilitoe, E.J., Hwang, C.B., Silverman, S. Jr., et al.(1996). Examination of oral cancer tissue for the presence of the proteins ICP4,ICP5,ICP6,ICP8 and gB of her-pes simplex virus type 1, *J Natl Cancer Inst*;76:371.
19. Chaturvedi, A.K., Engels, E.A., Pfeiffer, R.M., et al. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States, *Journal of Clinical Oncology*;29(32):4294–4301.
20. Gillison, M.L., D'Souza, G., Westra, W., et al.(2008). Distinct risk factors profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type-16 negative head and neck cancers, *Journal of the National Cancer Institute*;100(6):407–420.
21. Brachman, D.G., Graves, D., Vokes, E., et al.(1992). Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Research*;52:4832.
22. Almadori, G., Galli, J., Cadoni, G., et al.(2002). Human papillomavirus infection and cyclin D1 gene amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: biologic function and clinical significance, *Head Neck* ;24:597-604.
23. Ringborg, U., Henle, G., et al.(1983). Epstein-Barr Virus-specific serodiagnostic tests in carcinomas of the head and neck, *Cancer*;52:1237.
24. Ning, J.P., Yu, M.C., Wang, Q.S., et al.(1990). Consumption of salted fish and other risk factors for nasopharyngeal carcinoma (NPC) in Tianjin, a low-risk region for NPC in the People's Republic of China, *J Natl Cancer Inst*;82:291.
25. Epstein, M.A.(1986). Vaccination against Epstein-Barr virus: current progress and future strategies, *Lancet*;1:1425.
26. Zeng, Y., (1985). Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma in China, *Adv Cancer Research*;44:121.
27. Barton, R.T., Hogetveit, A.C.(1990). Nickel-related cancers of the respiratory tract. *Cancer*;45:3061.

28. Riechelmann, H.,(2002). Occupational exposure and cancer of the oral cavity and pharynx, *Laryngorhinootologie*;81(8):573-9
29. Egeli, U., Ozkan, L., Tunca, B., et al.(2002). The relationship between genetic susceptibility to head and neck can-cer with the expression of common fragile sites, *Head Neck*;2(6):591-8.
30. Barton, R.T., Hogetveit, A.C.,(1980). Nckel-related cancers of the respiratory tract, *Cancer*;45:3061.
31. Riechelmann, H.(2002). Occupational exposure and cancer of the oral cavity and pharynx, *Laryngorhinootologie*;81(8):573-9.
32. Elci, O.C., Akpinar-Elci, M., Blair, A., et al.(2002). Occupational dust exposure and the risk of laryngeal cancer in Turkey, *Scand J Work Environ Health*; 28:278-84
33. Rafferty, M.A., Fenton, J.E., Jones, A.S.(2001). The history, aetiology and epidemiology of laryngeal carcinoma, *Clinical Otolaryngol*;26:442-6
34. Chan, C.K., Gee, J.B.L.(1988). Asbestos exposure and alryngeal cancers: an analysis of the epidemiologic evidence, *J Occup Med*;30:23.
35. Zheng, W., Blot, W.J., Shu, X.O. et al.(1992). Diet and other risk factors for laryngeal cancer in Shangai, China, *Am J Epidemiology*; 136:178-91
36. Muscat, J.E., Wynder, E.L.,(1992). Tobacco,alcohol, asbestos and occupational risk factors for laryngeal cancer,*Cancer*;69:2244-51
37. Clayman, G.L., Lippman, S.M., Laramore, G.E., Hong, W.K., (2000). *Neoplasms of head and neck*. In: Bast, Kufe, Pollock, Weichselbaum, Holland, Frei, editors. *Cancer medicine*. 5th ed, London: BC Decker Inc., 2000; 1173-220
38. Ron, E.(1998). Lonizing radiation and cancer risk; evidence from epidemiology, *Radiat Res*; 150(5Suppl):S30-41
39. Mayne, S.T., Lippman, S.M.(2001). Retinoids, carotenoids, and micronutrients. In: De Vita VT, Hellman S, Ro-senberg SA, editors, *Cancer: principles and practise of oncology*., 6th edition, JB Lippin-cott, 2001;575-89, Philadelphia.
40. Winn, D.M., Ziegler ,R.G., Pickle, L.W., et al.(1984). Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among women from the southern United States, *Cancer Research*;44:1216
41. Bosetti, C., La Vecchia, C., Talamini, R., et al.(2002). Food groups and laryngeal cancer risk: a case-control study in Italy and Switzerland, *Int J Cancer* ;20:355-60

42. Connors, J.M., Jacops, C.,(1987). Nasopharyngeal carcinoma: relationship to Epstein-Barr virüs and treatment with interferon. In: Jacops C, editör. *Cancers of the head and neck*. Martinus Nijhoff ;167-75, Boston.
43. Yu, M.C.(1990). Diet and nasopharyngeal carcinoma, *FEMS Microbiol Immunology* ;2(4):235-42
44. Koh, H.K., Kannler, C., Geller, A.C.(2001), Cancer prevention: preventing tobacco-related cancers. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and practice of oncology*. 6th edition. JB Lippincott; 549-60, Philadelphia.
45. Baden, E.(1987). Prevention of cancer of the oral cavity and pharynx, *CA Cancer J Clin* ;37:49.
46. Understanding head and neck cancer(2012). *Cancer council NSW*
47. Batsakis, J.G.(1999). Tumors of the head and neck: Clinical and pathological considerations. 2nd ed. *Baltimore: Williams and Wilcons*, London.
48. Kaya, S.(2002). *Larenks hastalıkları*, 1. Baskı, Bilimsel tıp yayınevi, Ankara.
49. Ballenger, J.J.(1991). Disease of the Nose, Throat, Ear, Head and Neck. *Lea and Febiger*, Philadelphia.
50. Braakhuis, B.J., Tabor, M.P., Kummer, J.A., Leemans, C.R., Brakenhoff, R.H.(2003). A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications, *Cancer Research*; 63(8):1727-30. (PMID: 12702551)
51. Nadal, A., Cardesa, A.(2003). Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma, *Virchows Arch* ; 442(1):1-7. (PMID: 12536308)
52. Sozzi, G., Miozzo, M., Donghi, R., Pilotti, S., Cariani, C.T., Pastorino, U., Della Porta, G., Pierotti, M.A.(1992). Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung, *Cancer Res* ;52(21):6079-82. (PMID: 1394234)
53. Gleich, L.L., Salamone, F.N.(2002). Molecular genetics of head and neck cancer, *Cancer Control* ;9(5):369-78. (PMID:12410176)
54. Field, J.K., Spandidos, D.A., Stell, P.M., Vaughan, E.D., Evan, G.I., Moore, J.P.(1989). Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncogene*, 4(12):1463-8. (PMID:2687767)
55. Mobley, S.R., Liu, T.J., Hudson, J.M., Clayman, G.L.(1998). In vitro growth suppression by adenoviral transduction of p21 and p16 in squamous cell carcinoma of the head and neck: a research model for combination gene therapy, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* ;124(1):88-92. (PMID: 9440786)

56. Izzo, J.G., Papadimitrakopoulou, V.A., Li, X.Q., Ibarguen, H., Lee, J.S., Ro, J.Y., El-Naggar, A., Hong, W.K., Hittelman, W.N.(1998). Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification, *Oncogene*; 17(18):2313-22. (PMID: 9811462)
57. Vinita Takiar, MD, PhD, Dominic Ma, BS, Adam S. Garden, MD, Beth M. Beadle, MD, PhD, Clifton D. Fuller, MD, PhD, Gary B. Gunn.,(2015), Tumor Control and Toxicity Outcomes for Head and Neck Cancer Patients Re-Treated With Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT)—A Fifteen-Year Experience, *Oncology*,
58. Uzun, L. Beder, L.B., (2004). Baş-boyun kanserlerinde gen tedavisi uygulamaları, *KBB-Forum*;3(3).
59. Tunç, İ., Zergeroğlu, S., Daylan, B.H., Aydoğdu, T., Mollamahmutoğlu, L.(2004). Serviks Kanserlerinde BCL-2 ve BAX Protein Expresyonları ve Prognostik Faktörlerle Korelasyonu, *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi*, Cilt 7, Say. 4,140-148.
60. Bishop, J.M.(1991). Molecular themes in oncogenesis, *Cell* ;64:235-48.
61. Levine, A.J.(1993). The tumor supressor genes, *Annu Rev Biochemistry* ; 623-51.
62. Knudson, A.G.(1998). Antioncogenes and human cancer, *Proc Natl Acad Sci USA*;90:10914-21.
63. Vaux, D.L., Gry, S., Adame, J.M.(1998). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* ;335:440-2.
64. McDonnell, T.J., Beham, A., Sarkiss, M.(1996). Importance of the Bcl-2 in cell death regulation, *Experientia*;52:1008-17.
65. Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., et al.(1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria, *J Cell Biology*;143:207-15.
66. Bernecker, O.Y., Huq, F., Heist, E.K.(2003). Podesser, B.K., Hajjar, R.J., Apoptosis in heart failure and the senescent heart, *Cardiovasc Toxicol*; 3(3):183-90.
67. Mayer, R.J.(2003). From neurodegeneration to neurohomeostasis: the role of ubiquitin, *Drug News Perspect* ; 16(2): 103-8.
68. Mc Cluggage, G., Mc Bride, H., Maxwell, P.(1997). Immunohistochemical detection of p53 and Bcl-2 proteins in neoplastic and non-neoplastic endocervical glandular lesions, *Hum Pathology*; 28:309-15.
69. Ferrandina, G., Mozetti, S., Marone, M.(2000). Bcl-2, Bax, bcl-x expressions in neoplastic and normal cervical tissue, *Cancer letters*; 155(1):19-27.

70. Bryhova, S., Brychta, T., Kotrsova, L.(2000). Expression of Bcl-2 in dysplastic and neoplastic cervical lesions in relation to cell proliferation and HPV infection. *Neoplasma*; 47(3):143-7.
71. Jain, D., Srinvasaon, R., Patel, F.D., Kuman, J.(2003). Evaluation of p53 and Bcl-2 expression as prognostic markers in invasive cervical cancer stage I.b/III patients treated by radiotherapy, *Gynecol Oncology*;88(1):22-8.
72. Harima, Y., Oka, A., Napata, K.(1998). Bax and Bcl-2 expression predict response to radiotherapy human cervical cancer, *Gan To Kogaku Ryoha* ;25(9): 1273-7.
73. Oltvai, Z.N., Miliman, C.L., Korsmeyer, S.J.(1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax , that accelerates programmed cell death, *Cell*;74:609.
74. Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C.(1998). Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis, *EMBOJ*;17:3878-85.
75. Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q.(1998). Bax directly induces release of cytochrome C from isolated mitochondria, *Proc Natl Acad Sci USA*;95:4997-5002.
76. Maijerink, J.P., Mensink, E.J., Wang, K. et al.(1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of Bax, *Blood* ;91:2991-7.
77. Giarnieri, E., Moncihi, R., Pisani, T.(2000). Msh-2, Mlh-1, Fhit, p53, Bcl-2, Bax expressions in invasive and in situ squamous cell carcinoma of the uterine cervix, *Clinical Cancer Research* ;6(9):3600-6.
78. Mozetti, S., Ferrandina, G., Morore, M.(2000). Expression of Bcl-2, Bax and bcl-xl in endometrial and cervical tissue, *Cancer Detect Prev* ;24(6):536-41.
79. Harima, Y., Harima, K., Shikata, N.(1998). Bax and Bcl-2 expression predict response to radiotherapy in human cervical cancer, *J. Cancer Res Clin* ;124(9):503-10.
80. Harima, Y., Nagata, K., Harima, K.(2000). Bax and Bcl-2 protein expression following radiation therapy versus radiation plus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical cancer, *Cancer* ;88(1):132-8.
81. Abdullaev, F.I., Espinosa-Aguirre, J.J.(2004). Biomedical Properties of Saffron and Its Potential Use In Cancer Therapy And Chemoprevention Trials, *Cancer Detection and Prevention*, 28(6): 426-432.
82. Giaccio, M.(2004). Crocetin from Saffron: An Active Component of an Ancient Spice, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(3): 155-172.
83. Million, R.R., Cassisi, N.J., Mancuso, A.A.(1994). The unknown primary. Million, R.R., Cassisi, N.J. (editörler). *Management of Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach Lippincott*, pp. 311-320 , Philadelphia

84. Ordoudi, S.A., Befani, C.D., Nenadis, N., Koliakos, G.G., Tsimidou, M.Z.(2009). Further examination of antiradical properties of Crocus sativus stigmas extract rich in crocins. *J Agric Food Chem*; 57: 3080–6.
85. Kanakis, C.D., Tarantilis, P.A., Pappas, C., Bariyanga, J., Tajmir-Riahi, H.A., Polissiou, M.G.(2009). An overview of structural features of DNA and RNA complexes with saffron compounds: Models and antioxidant activity, *J Photochem Photobiol*; 95: 204–12.
86. Lee, I.A., Lee, J.H., Baek, N.I., Kim, D.H.(2005). Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite Crocetin, *Biol Pharm Bull*; 28: 2106–10.
87. Zheng, S., Qian, Z., Tang, F., Sheng, L.(2005). Suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression by crocetin contributes to attenuation of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits, *Biochem Pharmacol*; 70: 1192–9.
88. He, S.Y., Qian, Z.Y., Wen, N., Tang, F.T., Xu, G.L., Zhou, C.H.(2007). Influence of Crocetin on experimental atherosclerosis in hyperlipidemic-diet quails, *Eur J Pharmacol* ; 554: 191–5.
89. Cai, J., Yi, F.F., Bian, Z.Y. et al.(2009). Crocetin protects against cardiac hypertrophy by blocking MEK-ERK1/2 signalling pathway, *J Cell Mol Med*; 13: 909–25.
90. Dhar, A., Cherian, G., Dhar, G., Ray, G., Sharma, R., Banerjee, S.K.(2005). Molecular basis of protective effect by crocetin on survival and liver tissue damage following hemorrhagic shock, *Mol Cell Biochem*; 278: 139–46.
91. Ahmad, A.S., Ansari, M.A., Ahmad, M., Saleem, S., Yousuf, S., Hoda, M.N., et al. (2005). Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model, *Pharmacology, biochemistry, and behavior*; 81: 805–13.
92. Nair, S.C., Pannikkar, B., Pannikkar, K.R (1991). Antitumor activity of saffron (*Crocus Sativus*), *Cancer Letters*, 1;57(2).
93. Nam, K.N., Park, Y.M., Jung, H.J., Lee, J.Y., Min, B.D., Park, S.U., Jung, W.S., Chu, K.H., Park, J.H., Kang, I., Hong, J.W., Lee, E.H.(2010). Anti-Inflammatory Effects Of Crocin And Crocetin In Rat Brain Microglial Cells, *European Journal of Pharmacology* ;648(1-3):110-6.
94. Dimitra, G., Chryssanthi, Fotini, N., Lamari, Iatrou, G., Pylara, A., Nikos, K., Karamanos, Cordopatis, P.(2007). Inhibition of Breast Cancer Cell Proliferation by Style Constituents of Different Crocus Species, *Anticancer Research*, 27: 357-362.

95. Dhar, A., Mehta, S., Dhar, G., Dhar, K., Banerjee, S., Veldhuizen, P., et al.(2009). Crocetin Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation And Tumor Progression In A Xenograft Mouse Model, *Molecular Cancer Therapy*, 8: 315–23.
96. Zhong, Y., Shi, F., Zheng, X., Wang, Q., Yang, L., Sun, H., He, F., Zhang, L., Lin, Y., Qin, Y., Liao, L., Wang, X.(2011). Crocetin Induces Cytotoxicity And Enhances Vincristine-Induced Cancer Cell Death Via P53- Dependent And Independent Mechanisms, *Acta Pharmacologica Sinica*, 32: 1529–1536.
97. Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M.(1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR, *Genome Res*; 6:995-1001.
98. Bustin, S.A.(2000). Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays, *J Mol Endocrinology*;25:169-93.
99. Lyons AS, P. R. (1978). *Medicine: An Illustrated History*. New York: Harry N. Abrams Publishers:
100. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2014*. . Atlanta: American Cancer Society2014.2012
101. Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention and Screening, www.cancer.net/patient. 2009, 2012.
102. Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer. *Drugs*, 65: 2513-2531 Lyseng-Williamson, K. A. ve Fenton, C. (2005).
103. Gianni, L., Pienkowski, T., Im, Y. H., Roman, L., Tseng, L. M., Liu, M. C., Lluch, A., Staroslawska, E., de la Haba-Rodriguez, J., Im, S. A., Pedrini, J. L., Poirier, B., Morandi, P., Semiglazov, V., Srimuninnimit, V., Bianchi, G., Szado, T., Ratnayake, J., Ross, G. ve Valagussa, P. (2012).
104. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 13: 25-32 143. Li, F., Zhao, C. ve Wang, L. (2014).
105. Molecular-targeted agents combination therapy for cancer: developments and potentials. *Int J Cancer*, 134: 1257-1269 144. Parasuraman, S., Thing, G. S. ve Dhanaraj, S. A. (2014).
106. Polyherbal formulation: Concept of ayurveda. *Pharmacogn Rev*, 8: 73-80 145. Faydaoğlu, E. v. S., M.S. . (2011).

107. ABDULLAEV, F.I., ESPINOSA-AGUIRRE, J.J., Biomedical Properties of Saffron and Its Potential Use In Cancer Therapy And Chemoprevention Trials, *Cancer Detection and Prevention*, 28(6): 426-432, (2004).
108. GIACCIO, M., Crocetin from Saffron: An Active Component of an Ancient Spice, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(3): 155-172, (2004).
109. DIMITRA, G., CHRYSANTHI, FOTINI, N., LAMARI, IATROU, G., PYLARA, A., NIKOS, K., KARAMANOS, CORDOPATIS, P, Inhibition of Breast Cancer Cell Proliferation by Style Constituents of Different Crocus Species, *Anticancer Research*, 27: 357-362, (2007).
110. SHENG LI, SHENG JIANG, WEI JIANG, YUE ZHOU, XIU-YIN SHEN, TAO LUO, LING-PING KONG, HUA-QIAO WANG, Anticancer effects of crocetin in human esophageal squamous cell carcinoma KYSE-150 cells, *Oncology Letters*,
111. Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365
112. Kaneda, K., Kashii, S., Kurosawa, T., Kaneko, S., Akaike, A., Honda, Y., Minami, M. ve Satoh, M. (1999). Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Res*, 815: 11-20
113. A.G., T. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri*: 499-508
114. ZEESTRATEN, E.C., BENARD, A., REÏMERS, M.S., SCHOUTEN, P.C., LÏEFERS, G.J., VAN DE VELDE, C.J., KUPPEN, P.J., The Prognostic Value of the Apoptosis Pathway in Colorectal Cancer: A Review of the Literature on Biomarkers Identified by Immunohistochemistry, *Biomark Cancer*, 4;5:13-29, (2013).
115. ZHU, M., HONG, D., BAO, Y., WANG, C., PAN, W., Oridonin İnduces The Apoptosis Of Metastatic Hepatocellular Carcinoma Cells Via A Mitochondrial Pathway, *Oncology Letters*, 6(5):1502-1506, (2013).
116. THOMAS, S., QUINN, B.A., DAS, S.K. et al., Targeting the Bcl-2 Family for Cancer Therapy, *Expert Opin Ther Targets*, 17: 61-75, (2013).
117. LOW, I.C., KANG, J., PERVAIZ, S., Bcl-2: A Prime Regulator of Mitochondrial Redox Metabolism In Cancer Cells, *Antioxid Redox Signal*, 15: 2975-2987, (2011).
118. GUTHEILA, W., REEDB, G., RAYC, A., ANANTD, S., DHAR, A., Crocetin: an Agent Derived from Saffron for Prevention and Therapy for Cancer, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13;173-179, (2012).