

2018

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra KÖSEM



T.C.

YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FUCOİDAN'IN BAŞ BOYUN KANSERİ ÜZERİNDEKİ  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Kübra KÖSEM**

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Ankara, 2018



T.C.  
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FUCOİDAN'IN BAŞ BOYUN KANSERİ ÜZERİNDEKİ  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Kübra KÖSEM**

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**Bu araştırma; TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma  
Projelerini Destekleme Programı tarafından 114S331 nolu proje ile  
desteklenmiştir.**

Ankara, 2018

**T.C.**  
**YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FUCOİDAN'IN BAŞ BOYUN KANSERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Kübra KÖSEM**

**Yüksek Lisans Tezi**

**22.02.2018**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Gülay Güleç CEYLAN**

**Jüri Üyeleri**

**Prof. Dr. C. Nur Semerci Gündüz**

**Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün**

**Doç. Dr. Gülay Güleç CEYLAN**

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

**Dr. Öğretim Üyesi Ender ŞİMŞEK**

**Enstitü Müdür Vekili**

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

## BEYAN

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

22.02.2018

Kübra KÖSEM



## TEŞEKKÜR

Okumak, okumak ve yine okumak dünyanın en güzel yolu olsa gerek... Bilim yolunun basamaklarından birini daha tamamlarken tüm samimiyetleri ile yanımda olan, beni yalnız bırakmayanlara sonsuz teşekkürümü etmek için bu satırlardayım... Genetik ile birlikte hayata bakış perspektifim daha da anlam kazandı. Tabii böyle dediysem zorluklar olmadı değil, lakin hayat dediğimiz karşılaşılan zorluklara karşı mücadele değil miydi? Bu yolda bir damla olabildiysem, olabileceğim ne mutlu bana...

Tarifi olmayan fedakarlıkları ile her daim yanımda olan haklarını hiç ödeyemeyeceğimi bilsemde desteklerini, sevgilerini esirgemeyen, eğitimin değerini öğreten aileme sonsuz teşekkür ederim.

Her daim tüm kalbiyle yanımda olan Sevgili Eşim, Hayat Arkadaşım M. Mustafa KÖSEM'e sonsuz sevgilerim ile.

Bu uzun yoğun, öğretici süreçte yanımda olan tüm hocalarıma, arkadaşlarıma, Danışman Hocam Doç. Dr. Gülay Güleç CEYLAN'a, Tıbbi Genetik Anabilimdalı Başkanı Prof. Dr. C. Nur SEMERCİ GÜNDÜZ hocama ve diğer tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

Bu çalışmamın uygulama kısmında 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı 114S331 nolu proje ile beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürü borç bilirim.

Farklı deneysel çalışmalar sonucu hazırladığım tezimin, diğer çalışmalar için de bir basamak oluşturmasını ve bir gün tedaviye yönelik bir yol olmasını temenni ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Kanser.....	3
2.2. Baş Boyun Kanseri.....	4
2.2.1. Genel Özellikleri .....	4
2.2.2. Baş Boyun Kanserinin Nedenleri .....	4
2.2.3. Baş Boyun Kanseri Evreleri .....	5
2.2.4. Baş Boyun Kanseri Çeşitleri .....	7
2.2.5. Baş Boyun Kanserlerinin Moleküler Biyolojisi .....	8
2.2.6. Tedavi Yöntemleri .....	8
2.3. Fucus Vesiculosus (Fucoïdan) Yapısı ve Özellikleri .....	11
2.3.1. Tarihçesi.....	12
2.3.2. Uygulama Alanları ve Kanslerle İlişkisi.....	13
2.4. Apoptoz ile Bax, Bcl -2, Caspase -3, Caspase -9, Caspase -8, Cytochrome -c, VEGF, Erk (Mapk1), Survivin Genlerinin Yapısı ve Özellikleri.....	14
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>24</b>
3.1. Materyal .....	24
3.1.1. Kullanılan Hücre Hattı ve Özellikleri.....	24

3.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar .....	24
3.1.3. Hücre Kültürü Donanımları.....	26
3.2. Yöntemler.....	26
3.2.1. Hücre Kültürü.....	26
3.2.1.1. Hücre Ekim İşlemleri.....	27
3.2.1.2. Medyum Değişimi .....	28
3.2.1.3. Harvest İşlemi.....	28
3.2.1.4. Tryphan Blue ile Hücre Sayımı ve Hücre Canlılık Analizi.....	29
3.2.2. xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi) 30	
3.2.3. Fucus Vesiculosus (Fucoïdan) Muamelesi .....	31
3.2.4. Hücre Titrasyon Testi RTCA (xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi).....	32
3.2.5. Hücre Sitotoksosite Testi RTCA (xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi).....	32
3.2.6. mRNA İfadesinin Belirlenmesi .....	33
3.2.6.1. Trizol ile Hücreden RNA İzolasyonu .....	33
3.2.6.2. cDNA Protokolü .....	34
3.2.6.3. Beta Aktin, Bax, Bcl -2, Kaspaz -3, Kaspaz -9, Kaspaz -8, Cytochrome -c, Erk (Mapk1), Survivin ve VEGF- b Primerlerin Hazırlanması.....	35
3.2.6.4. Gradyent PZR.....	36
3.2.6.5. Agaroz Jel Elektforezi .....	37
3.2.6.6. PZR- Clean up (Gel Ekstraksiyon).....	39
3.2.6.7. Real -Time PZR için Standartların Hazırlanması.....	40



3.2.6.8. Real-Time PZR.....	41
3.2.7. xCELLigence Hücre Migrasyon Analizi .....	42
3.2.7.1. xCELLigence CIM-PLAKA Titrasyon Analizi .....	43
3.2.7.2. Fucus Vesiculosus (Fucoidan) Muamelesi.....	44
3.2.8. Apoptoz Deneyi (CASPASE -3 ACTIVITY ASSAY).....	45
3.2.8.1. Örnek Hazırlığı .....	45
3.2.8.2. Solüsyonların Hazırlanması.....	46
3.2.8.3. MTP'i Kaplama (MTP: Microtiter Plate).....	46
3.2.8.4. Proteaz Aktivitesi Analizi .....	47
3.2.8.5. Kaspaz -3 Aktivite Analiz.....	47
3.2.9. Protein İfadesinin Belirlenmesi .....	49
3.2.9.1. Hücreden Protein İzolasyonu.....	49
3.2.9.2. Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini.....	50
3.2.9.3. SDS-PAGE Jel Hazırlanması.....	50
3.2.9.4. Protein Örneklerin Hazırlanması .....	52
3.2.9.5. SDS -PAGE Jelin Yürümesi ve PVDF Membrana Transfer .....	52
3.2.9.6. İmmunoblotlama için Birincil Antikorla Muamele ...	54
3.2.9.7. Yıkama.....	56
3.2.9.8. İkincil Antikorla Muamele .....	56
3.2.9.9. Yıkama ve Görüntüleme .....	56
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>57</b>
4.1. 6A Hücre Hattının Titrasyon Grafiği.....	57
4.1.1. 6A Hücresinin xCELLigence E-Plaka Titrasyon Grafiği .....	57
4.1.2. 6A Hücresinin xCELLigence CIM -Plaka Titrasyon Grafiği ...	58

4.2. 6A Hücre Proliferasyonu Üzerinde Fucus Vesiculosus (Fucoïdan) Etkisinin Sonucu.....	60
4.2.1. IC <sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi.....	61
4.3. 6A Hücre Migrasyonu Üzerinde Fucus Vesiculosus (Fucoïdan)'un Etkisinin Sonucu .....	62
4.4. Fucus Vesiculosus (Fucoïdan)'un 6A Hüresine Uygulanması Ardından Morfolojisinin Gözlemlenmesi .....	63
4.5. Fucus Vesiculosus (Fucoïdan)'un 6A Hüresine Uygulanması Ardından RT-PZR ile Bax, Bcl -2, Kaspaz -3, Kaspaz -9, Kaspaz -8, Cytochrome -c, Erk (Mapk1), Survivin ve VEGF Genlerinin Ekspresyon Düzey Sonuçları .....	64
4.6. 6A Hücre Hattına Fucus Vesiculosus (Fucoïdan)'un Uygulama Sonrası Apoptoz Assay (Caspase 3 Activity Assay) Sonucu.....	66
4.7. Fucus Vesiculosus (Fucoïdan)'un 6A Hüresine Uygulanması Ardından Western Blot Sonuçları.....	68
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>70</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>75</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>77</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>88</b>
<b>EK 1. Özgeçmiş .....</b>	<b>88</b>

## ÖZET

### **Fucoidan'ın Baş Boyun Kanseri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması**

Bilim ve teknolojik gelişmelerin yüksek bir hızla ilerlediği günümüzde hastalıkları moleküler düzeyde anlayabilmek ve yeni tedavi yöntemleri ortaya koyabilmek için yapılan genetik çalışmalar artmıştır. Baş boyun kanserinde bu soruları aydınlatabilmek ve tedavi yöntemi geliştirebilmek adına çalışmamızı gerçekleştirdik.

Mozuku, Japonya Okinawa, Tayvan bölgesinde yetiştirilen kahverengi bir yosun türü olup latince ismi *Cladosiphon okamuranus*'dur. Çalışmamızda Mozuku'nun önemli bir etken maddesi olan Fucoidan'ın baş - boyun kanseri üzerinde moleküler etkileri araştırılmıştır. Hücre proliferasyonuna ve migrasyonuna olan etkisi ile apoptotik yolda hangi genleri nasıl etkilediği sorularına cevap bulmak hedef alınan temel basamakları oluşturmuştur.

Sonuç olarak baş -boyun kanseri üzerinde hücre proliferasyon çalışmamızı xCELLigence E-plaka sistemi kullanarak yaptıktan sonra Fucoidan'ın hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini gördük, sonrasında da analiz yaparak IC<sub>50</sub> dozunu belirledik. xCELLigence CIM-plaka sistemi ile yaptığımız migrasyon deney sonucunda IC<sub>50</sub> dozunda hücre migrasyonunu inhibe etti. Yaptığımız bu çalışmalardan sonra Fucoidan'ın apoptoz üzerine etkisini araştırdık ve gördük ki apoptoz ile ilgili genlerde mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonlarında anlamlı bir artış ya da azalma olmamaktadır ve Kaspaz -3 aktivitesi deneyine de bağlı anlamlı bir artış olmaması bize Fucoidan'ın apoptozu uyarmadığını göstermektedir. Bu sonuç hücre proliferasyon inhibisyonunun farklı yollar üzerinden olabileceğini işaret etmektedir. Yapılan çalışmalar Fucoidan'ın kanser hücreleri üzerine etkisinin apoptoz üzerinden olabileceği gibi, otofaji veya hücre döngüsünü durdurma şeklinde olabileceğini de göstermektedir. Baş -boyun kanseri tedavisinde Fucoidan'ın etki mekanizmasının çözümü önemli bir çalışma olup, elde edilen ilk sonuçlar, Fucoidan'ın potansiyel bir tedavi yöntemi olabileceği göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, Baş ve Boyun Kanseri, Fucoidan, Migrasyon, Proliferasyon

## ABSTRACT

### Investigation of the Effect of Fucoidan on Head and Neck Cancer

With the fast pace of scientific and technological advances, genetics research has increased towards the understanding of diseases at the molecular level and development of new treatment methods. Our study was carried out with the intention of both answering some of these questions and developing a new treatment method for head and neck cancer.

Mozuku (latin name: *Cladosiphon okamuranus*) is a type of brown seaweed grown in Okinawa Japan and Taiwan. In this study, the molecular effects of Fucoidan in head and neck cancer, a common cancer in Turkey, was studied. The research aimed to answer the basic questions of Fucoidan's effect on cell proliferation and migration as well as to determine which genes in the apoptotic pathway are affected and in what manner they are affected.

To determine its effect on cell proliferation, the xCELLigence E-plate system was used. After observing that Fucoidan inhibited cell proliferation, its IC<sub>50</sub> dose was determined. Using the xCELLigence CIM-plate system, we also show that the IC<sub>50</sub> dose inhibits cell migration. We found that Fucoidan did not have a significant effect on expression of genes associated with apoptosis at either the mRNA or protein level. We also show that there is no increase in caspase-3 activity. Together, these data suggest that Fuocidan did not induce apoptosis and that the inhibition of cell proliferation that we observed is due to its effect on some other pathway. Just as other studies have shown Fucoidan to have an effect on apoptosis, some other studies have shown it to affect autophagy and cause cell cycle arrest. This is an important study into the mechanism of action of Fucoidan in head neck cancer therapy and initial results show that it may be a potential therapeutic method.

**Keywords:** Apoptosis, Fucoidan, Head and Neck Cancer, Migration, Proliferation

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APAF 1	:Apoptotik Aktivatör Faktör 1
BAX	:BCL -2-Associated X Protein
BCL-2	:B-cell CLL/lymphoma 2
CASPASE (KASPAZ)	:Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE
cDNA	:Complementer DNA
CIM plaka	:Cell Invasion and Migration
DNA	:Deoksiribonucleic acid
DMSO	:Dimethyl sulfoxide
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle Medium
ERK (MAPK1)	:Mitogen-activated protein kinase 1
Fucoidan	:Fucoidan From Fucus Vesiculocus
HNSCCs	:Head and neck squamous cell carcinomas
PVDF	:Polyvinylidene flüoride or polyvinylidene difluoride
RNA	:Ribonucleic acid
RTCA	:Real Time Cell Analysis
SDS	:Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	:Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
TEMED	:Tetramethylethylenediamine
TBS-T	:Tris-Buffered Saline and Tween
UT-SCC	:Squamous Cell Carcinoma
VEGFB	:Vascular Endothelial Growth Factor B
IAP	:Inhibitors of Apoptosis Proteins
IC <sub>50</sub>	:The half maximal inhibitory concentration
RIPA	: Liziz tampon (Radioimmunoprecipitation assay)
PZR	: Polimer zincir reaksiyonu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal hücre ve kanser hücresinin proliferasyon kıyaslaması (2) .....	3
Şekil 2.2. Baş -boyun kanserinin görüldüğü bölgelerin anatomisi (21) .....	7
Şekil 2.3. Hücre döngüsü kontrol noktaları (36).....	10
Şekil 2.4. Çalışmada uygulanan Mozuku'nun ekstraktı Fucoidan (Sigma, F5631) ..	11
Şekil 2.5. Fucoidan'ın ortalama yapısı için Pankter model (45) .....	12
Şekil 2.6. Apoptozda intrinsik ve ekstrinsik yolak (76) .....	17
Şekil 2.7. Apoptozda intrinsik yolak (83).....	19
Şekil 2.8. Tümör anjiyogenezin gösterimi (89) .....	20
Şekil 2.9. Tümörögenез olarak Survivin'in moleküler mekanizmaları (99) .....	22
Şekil 3.1. Hücre sayım aşamaları.....	29
Şekil 3.2. Hücre sayımı ardından hücre/kuyu hesaplamasının gösterimi.....	30
Şekil 3.3. xCELLigence Cihazı, E-Plaka ve CIM-Plaka aparatları .....	31
Şekil 3.4. Gradyent PZR sonrası Agaroz Jel Elektroforez görüntüleri.....	38
Şekil 3.5. Real Time PZR için standartların hazırlanması.....	41
Şekil 3.6. Hücre migrasyon analizi için kullanılan xCELLigence CIM -Plaka aparatları .....	44
Şekil 3.7. Kaspaz -3 aktivite deneyi için plaka dizaynı. ....	48
Şekil 3.8. Jel döküm işleminden sonra tanka aktarılma işleminin genel gösterimi ...	52
Şekil 3.9. Proteinlerin yürütme tampon çözeltisinde yürütülmesinden, transfer aşamasına kadar genel gösterimi.....	54
Şekil 4.1. 6A hücre hattı için E -Plaka ile yapılan titrasyon deney grafiği.....	57
Şekil 4.2. 6A hücre hattı için CIM -Plaka ile yapılan titrasyon deney grafiği.....	58
Şekil 4.3. 6A hücre hattı için CIM -Plaka ile yapılan titrasyon deney grafiği.....	59
Şekil 4.4. 6A hücre hattı için E -Plaka ile yapılan proliferasyon deney grafiği .....	60
Şekil 4.5. xCELLigence cihazı ile IC <sub>50</sub> değerinin hesaplanması .....	61
Şekil 4.6. 6A hücre hattı için CIM -Plaka ile yapılan migrasyon deney grafiği.....	62
Şekil 4.7. Fucoidan uygulama sonrası 6A hücre hattı morfoloji görüntüsü .....	63
Şekil 4.8. 6A Hücre hattı için yapılan Real Time PZR analiz sonucu.....	64
Şekil 4.9. Kaspaz -3 deneyi standart grafiği .....	66
Şekil 4.10. 6A hücre hattı için yapılan Kaspaz -3 aktivite deney sonucu.....	67

**Şekil 4.11.** 6A hücre hattı Fucoidan uygulama sonrasında Western Blot sonuçları.. 68  
**Şekil 4.12.** 6A Hücre hattı için yapılan Western Blot analizi \*p<0.05..... 69



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Tümörün T sınıflandırılması. ....	6
<b>Tablo 2.2.</b> Tümörün N sınıflandırılması. ....	6
<b>Tablo 2.3.</b> Tümörün M sınıflandırılması. ....	6
<b>Tablo 3.1.</b> UT-SCC-6A hücre hattının özellikleri (110). ....	24
<b>Tablo 3.2.</b> Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi. ....	24
<b>Tablo 3.3.</b> xCELLigence E -plaka çalışmamızda uygulanan Fucoidan dozları ..... 31	31
<b>Tablo 3.4.</b> Tez çalışmasında kullanılan primerlerin sekansları ..... 36	36
<b>Tablo 3.5.</b> Gradient PZR için kullanılan solüsyonlar ve miktarları ..... 36	36
<b>Tablo 3.6.</b> Gradient PZR için program koşulları (34-38 cycle) ..... 37	37
<b>Tablo 3.7.</b> Gradyent PZR sonrası alınan Agaroz Jel Elektroforez görüntüleri sonucunda, genlerde çalışılan sıcaklık dereceleri. .... 39	39
<b>Tablo 3.8.</b> Real Time PZR için kullanılan solüsyonlar ve miktarları. .... 41	41
<b>Tablo 3.9.</b> Western Blot jeli için gerekli solüsyonların hazırlanması. .... 50	50
<b>Tablo 3.10.</b> Yürütme (Running) jel oranları. .... 51	51
<b>Tablo 3.11.</b> Hizalama (Stacking) jel oranları. .... 52	52
<b>Tablo 3.12.</b> Çalışmada kullanılan birincil antikolar. .... 55	55
<b>Tablo 4.1.</b> 6A hücre hattında Real Time PZR student's t -test değerleri. .... 65	65
<b>Tablo 4.2.</b> 6A hücre hattında Western Blot student's t-test değerleri. .... 69	69



# 1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 'nün istatistiklerine dayanarak her yıl 12 milyon kişiye kanser teşhisi konulmakta olup bu oranlar her geçen gün dünya çapında giderek artmaktadır. Her yıl yaklaşık sekiz milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Baş -boyun kanserlerinin başlıca nedenleri; sigara ve alkol kullanımı, kötü beslenme, Human papilloma virüs (HPV), onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin yapısındaki genetik ve epigenetik değişikliklerdir.

Günümüzde kanser tanısı konulan hastaların tedavilerinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemler bulunmaktadır, lakin çok başarılı sonuçlar elde edilememekte, hastalık ve tedavi, yaşam kalitesini düşürücü önemli fonksiyonların bozulmasına sebebiyet vermektedir.

Baş -boyun kanserinin tedavisinde çoğunlukla kemoterapi kullanılmakta ve bu tedavi yönteminin kanser hücrelerinin yanı sıra normal hücrelere de zarar vermekte olduğundan sitotoksitesi az olan alternatif yollar aranmaktadır. Bu sebepten ötürü çeşitli bitkilerin prostat, meme, serviks, akciğer vb. kanser türleri üzerine etkileri araştırılmaktadır. Sitotoksitesi az olan maddelerden biri Fucoidan olup, antitümör özelliği farklı çalışmalar yapılarak araştırılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak literatürde daha önce Fucoidan ile ilgili baş- boyun kanseri üzerine yapılmış bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışmadaki amacımız Mozuku yosunundan ekstrakte edilen Fucoidan maddesinin, baş-boyun kanseri hücre hattı üzerindeki antikanserojen etkisini göstermektir. Hedefimiz ise; baş- boyun kanseri hücre hattında Fucoidan uygulanması sonucunda hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunda meydana gelen değişikliklerini ve bu değişikliklerin moleküler mekanizmasını tespit etmektir. Bu amaçla proapoptotik ve antiapoptotik, genlerin ekspresyonu mRNA ve protein düzeyinde araştırılmıştır.

Elde ettiğimiz bilgiler ışığında, baş -boyun kanseri üzerinde uygulanan Fucoidan'ın %50 öldüren dozu (IC<sub>50</sub>) ve IC<sub>50</sub> dozunun iki katında ki hücre proliferasyon ve hücre migrasyon deneyinde, kontrole oranla ikisinde inhibe ettiğini ama IC<sub>50</sub> dozunda daha iyi inhibe ettiğini gözlemledik.

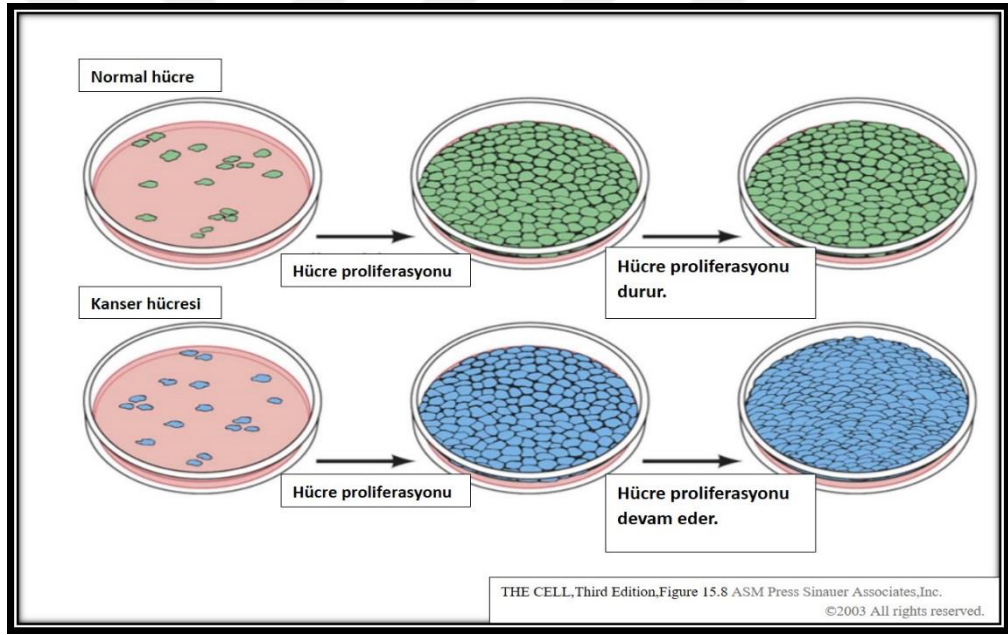
Yaptığımız proliferasyon ve migrasyon çalışmalarından sonra Fucoidan'ın apoptoz üzerine etkisini araştırdığımızda ise apoptoz ile ilgili genlerde mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonlarında anlamlı bir artış ya da azalma olmamaktadır ve Kaspaz -3 aktivitesi deneyine de bağlı anlamlı bir artış gözlememiş olmamız bize Fucoidan'ın apoptozu uyarmadığını göstermektedir. Bunun sonucunda gözlemlediğimiz hücre proliferasyon inhibisyonunun farklı yollar üzerinden olabileceğini işaret etmektedir. Yapılan çalışmalar Fucoidan'ın kanser hücreleri üzerine etkisinin apoptoz üzerinden olabileceği gibi, otofaji veya hücre döngüsünü durdurma, şeklinde olabileceğini de göstermektedir.

Sonuç olarak baş -boyun kanseri tedavisinde Fucoidan ile hastaları en az sitotoksositeyle tedavi edebilmek için bu konuda gerekli araştırmanın yapılmasını hedeflediğimiz çalışmamızın bundan sonraki basamaklara ışık tutacağını düşünmekte olup, Fucoidan'ın potansiyel bir tedavi yöntemi olabileceğini düşünmekteyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Hücreler vücudumuzun en küçük yapıtaşlarıdır. Vücudumuzdaki organlar hücrelerden oluşmaktadır. Sağlıklı vücut hücrelerimizden kas ve sinir hücreleri hariç, diğer hücreler bölünebilme yetisine sahiptirler. Ölen hücrelerin rejenerasyonu ve vücut içi ve dışı dokuların onarılması amacı ile bu kabiliyetlerini kullanırlar. Ama bu kabiliyetleri de bir yere kadardır. Sonsuza dek bölünemezler (Şekil 2.1.). Her hücrenin yaşamı boyunca belirli bir bölünebilme sayısı bulunmaktadır. Sağlıklı bir hücrenin ne zaman ve ne kadar sayıda bölüneceği programlanmıştır (1).



Şekil 2.1. Normal hücre ve kanser hücresinin proliferasyon kıyaslaması (2).

Kanser ise vücudun herhangi bir dokusundaki bir hücrenin çeşitli sebeplerle oluşan kümülatif mutasyonlarının düzeltilebilir eşik değerini aşıp çoğalarak bulunduğu organın işlevselliğini negatif yönde etkileyecek ve başka dokulara metastaz ile yayılacak duruma gelmesi ile ölümcül bir hal almasıdır. Günümüzdeki ölüm sebepleri arasında ilk sıralarda yer alan geniş kapsamlı hastalıklar bütünüdür (3).

## **2.2. Baş Boyun Kanseri**

### **2.2.1. Genel Özellikleri**

Baş -boyun kanseri dünyada yaygın olarak 6. sırada malign (kötü huylu tümör) kanser olarak görölmektedir ve sağkalım oranı düşük olan bir kanser türüdür (4). Saptanan baş -boyun kanseri, yassı hücreli kanserlerden ve varyantlarından oluşmaktadır. American Kanser Topluluğu (ACS) 2012'de 52 000'den fazla bireyde baş ve boyun kanserinden birinin tanısı konacağı belirtilmiştir (5, 6).

Ağız boşluğu, dudaklar, diş eti, damak, dil, ağız tabanı, burun delikleri, yüz kemikleri ve çevresi, orofarinks, hipofarinks, larinks, kulak kepçesi, tükürük bezleri, burun delikleri, gırtlak, yutak ve çevresi gibi bölgelerde oluşan kanserlerin her biri baş -boyun kanserlerine dahildir (7).

### **2.2.2. Baş Boyun Kanserinin Nedenleri**

Baş -boyun kanserlerinin ortaya çıkmasında birçok sebep olabilir, en önemli risk faktörleri alkol ve tütün kullanılmasıdır. Özellikle ağız boşluğu, orofarenks, hipofarenks ve larenks kanserlerinin oluşumunda bu iki etmen oldukça önemli bir yer tutmaktadır (6, 8).

Yapılan çalışmalarda baş-boyun kanserlerinin %75'inin temel sebebinin tütün içme (sigara, pipo, tütün çiğneme, dumansız tütün, vb.) olduğu görölmektedir (9). Tütün ve alkolü birlikte kullanan kişiler de ise kanserin gelişme riskini arttırmaktadır (10).

İnsan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu (11), özellikle HPV -16, dil, bademcikler, baş -boyun kanser çeşitlerinden orofarinks kanseri için ciddi risk faktörüdür (12, 13). Kötü ağız hijyeni ve eksik dişler, ağız boşluğu kanseri için zayıf risk faktörüdür (9, 14).

Epstein Barr Virus (EBV) enfeksiyonu, yaş, cinsiyet, meslek, ilaçlar, radyasyon, genetik faktörler, immünolojik etkenler, kimyasal ajanlar, travma, kronik irritasyon (sıvılar, yemekler, duman, buhar, toz vb.) gibi çeşitli faktörler baş-boyun kanser oluşumunda etkindir (15).

Bu risk faktörlerinin dünyaya farklı dağılımından dolayı baş-boyun kanserinin çeşitli alt tipleri bulunmaktadır (16).

### **2.2.3. Baş Boyun Kanseri Evreleri**

Kanser tedavisinde tümörün vaziyeti tutumunun belirlenmesi ve hastanın durumunun değerlendirilmesi önemli bir yer tutmaktadır. En yaygın kullanılan ve aşağıda detaylı olarak anlatılan TNM evrelendirilmesi, kanserin anatomik dağılımı ve seçilmiş, anatomik olmayan etkenlerin toplamına dayanır. Anatomik etkenlerin tanımlanmış olması her hastalık için lokal ve özeldir (17).

T, N, M belirlenmesi ve evrelendirilmesi bilgisinin zamanlaması; tümörün (T) (Tablo 2.1.), lokal lenf nodlarının (N) (Tablo 2.2.) ve metastazların (M) bilgisi (Tablo 2.3.) ve benzer prognozdeki hastaların gruplanması ile tanımlanmaktadır. TNM evreleme sistemi, kanserleri öncelik olarak primer tümörün anatomik uzantısı, lokal lenf nodlarının durumu ve uzak metastazın varlığı veya yokluğu ile kümelendirerek sınıflandırmaktadır (18).

T T komponenti, primer tümörün boyut/çevreye yayılımını gösteren uzantısı olarak tanımlanır. Her kanser bölgesi için, T'yi ifade etmek için kullanılan tümörün boyut komponenti, bölgesel lenf nodlarındaki kanserin vaziyeti, varlığı ya da yokluğu şeklinde tanımlanır. Nodal tutulum pozitif lenf nodlarının sayısı ve bazı kanser tipleri için özel bölge nodal kümelerin tutulumu ile sınıflandırılabilir (19).

M komponenti, genellikle kanserin vasküler kanallar ile genişleyebileceği bölgeler veya lokal olarak tanımlanan lenf nodlarından daha uzaktaki bölge diye, tanımlanan lenf nodlarında, uzak yayılım veya metastazın varlığı veya yokluğu olarak tanımlanabilmektedir. İleri de gösterileceği gibi, T, N, M'den rastgele birinde artmış değerler, kanserin ilerleyiciliğini ifade etmektedir (19).

Her kanser tipi için özel tanımlamalarda kullanılabilir. Bununla birlikte sınıflama için, klasik fiziksel muayene ve endoskopik incelemeden sonra için, klasik fizik muayene ve endoskopik inceleme sonrasında Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve/veya Manyetik Rezonans (MR) gibi ileri radyolojik tetkikler de gerekebilir (20).

**Tablo 2.1.** Tümörün T sınıflandırılması.

<b>Primer Tümör (T)</b>	
N <sub>0</sub>	Hiç primer tümör kanıtı olmayan
Tis	Karsinoma in situ
T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub>	Artan boyut ve/veya primer tümörün özel dağılımı
T <sub>x</sub>	Primer tümörü değerlendirilememiş olan

**Tablo 2.2.** Tümörün N sınıflandırılması.

<b>Bölgesel Lenf Nodları (N)</b>	
N <sub>0</sub>	Lenf nodu tutulumu yok
N <sub>1</sub> , N <sub>2</sub> , N <sub>3</sub>	Artan sayıda veya bölgesel lenf nodu tutulumunun vaziyeti
N <sub>2</sub>	4 ya da daha fazla lenf noduna metastaz
N <sub>x</sub>	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemeyen

**Tablo 2.3.** Tümörün M sınıflandırılması.

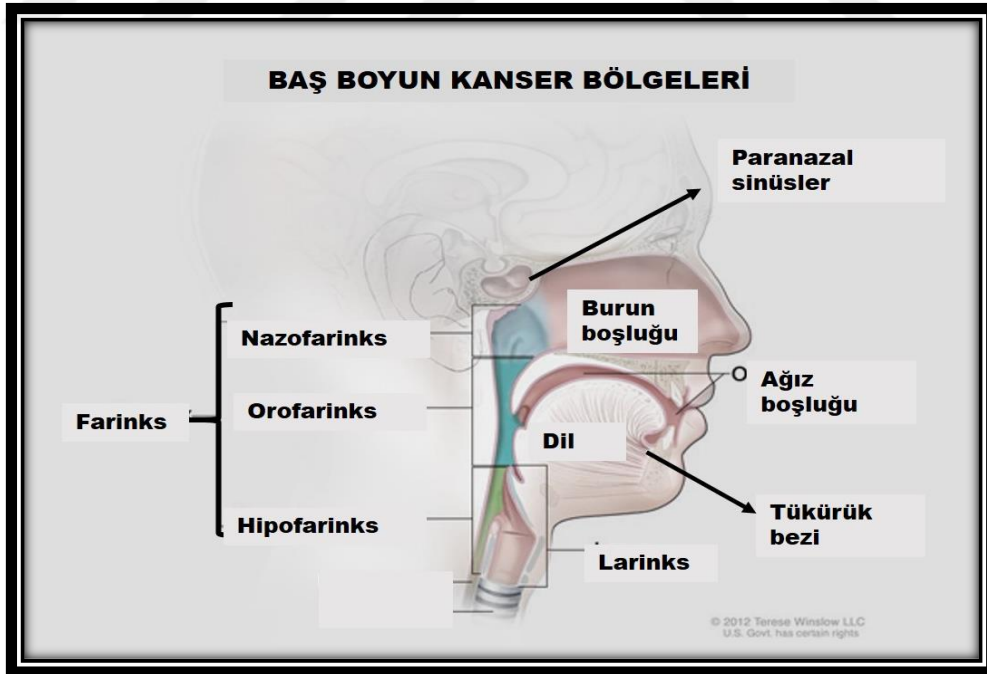
<b>Uzak Metastaz (M)</b>	
M <sub>0</sub>	Uzak metastaz yok
M <sub>1</sub>	Uzak metastaz var

Not: Bu TNM sistemi (AJCC/UICC) TNM alınmış olup M<sub>x</sub> ifadesi çıkarılmıştır (19).

#### 2.2.4. Baş Boyun Kanseri eşitleri

Baş -boyun kanserlerinin farklı türleri vardır, bunlar ortaya çıktığı vücut bölgesine göre sınıflandırılmaktadır (şekil 2.2.). Temelde beş başlık altında toplanır; Oral kavite, nazal kavite, larinks, hipofarenks ve tükürük bezleri bölgelerinde gelişen tümörlerdir. Tükürük bezlerinden; parotis, submandibüler, sublingual, st solunum ve sindirim yolu mukozasından: oral kavite, nazo, oro ve hipofarenks, nazal kavite ve paranasal sinüsler, larenks vetrakea, servikal özafagus, tiroidden, temporal kemik ve kulaktan, baş -boyun cildinden ve kafa tabanından malignitelerinden oluşur (16).

Baş -boyun kanserleri farklı faktörlerin etkisiyle oluşabilmektedir. Baş -boyun skuamöz hücreli karsinomların %3 kadarının bilinmeyen bir baş-boyun primer odağında oluşup boyuna metastaz yaptığı gözlemlenmektedir. Vücudun her tarafında görülebilen mukoz membranları da kapsayan bu tür baş -boyun kanserleri dünyada en sık görülen 6. kanser türü olarak belirtilmiştir (4).



şekil 2.2. Baş -boyun kanserinin görüldüğü bölgelerin anatomisi (21).

### 2.2.5. Baş Boyun Kanserlerinin Moleküler Biyolojisi

Diğer tümör türleri ile karşılaştırıldığında, baş -boyun kanserlerinin daha homojen bir hastalık olduğunu görmekteyiz. Baş -boyun kanserlerinin %95'i skuamöz hücreli karsinomdur. Ancak, son araştırmalara göre baş- boyun skuamoz hücre karsinomu (BBSHK), aslında beklenmedik bir şekilde heterojenlik göstermekte olup, tedavi planlaması ve biyolojik açıdan, tanımlanmasının güç olduğu ortaya konulmuştur. BBSHK'u dünya çapında her yıl 600 bin hastayı etkilemektedir (22).

Baş -boyun kanserlerinde sıklıa çalışılan moleküler belirteç, p53 genidir (23). Baş -boyun kanser hastalarının patogenezinde baktığımızda p53 mutasyonu ve protein ekspresyonu karşımıza çıkmaktadır. Baş -boyun kanser hücre hattı ve tümör dokuları üzerinde yaptıkları çalışmalarda p53 genine ait delesyon ve mutasyonlar grlmektedir (24, 25). BBSHK'u çeşitli alt histolojik aşamada (26) ayırt edilebilir, ama özellikle RNA ve DNA profillemeye yöntemleri hastalığın moleküler farklılığına dikkat çeker, ifade profillemeye Chung ve arkadaşlarının sisteminden (27) yararlanılarak yapılabilmektedir.

İnsan papilloma virüsü ile ilişkili tümörü bağlantılı PIK3CA onkogen mutasyonları, TRAF3 geninde yeni mutant varyantlar, E2F1 geninin hücre döngüsünde amplifikasyonu çalışmalarda gösterilmiştir (28, 29).

### 2.2.6. Tedavi Yöntemleri

Bu kanser türü için ilk olarak radyoterapi ve cerrahi yöntemler kullanılmaktadır, ama bununla birlikte moleküler hedefli tedaviler kullanılmaya başlandığı belirtilmiştir (20). Yüksek tümör aşamasında kombine cerrahi+/- radyoterapi+/-kemoterapi uygulanabilir. Günümüzde ek olarak Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi Teknolojisi (IMRT) de kullanılmaya başlanmıştır. IMRT, birçok kanser türünün tedavisinde de kullanılmaktadır (30).

Yeni tedavi stratejileri geliştirilmektedir. Adenovirusler geliştirilmesine bağlı olarak p53 veya p16 aktivitesi özellikle p53 eksik olan hücrelerde ekspresyonu artırılmasına bağlı hücre büyümesi azaltılabilmektedir (31).



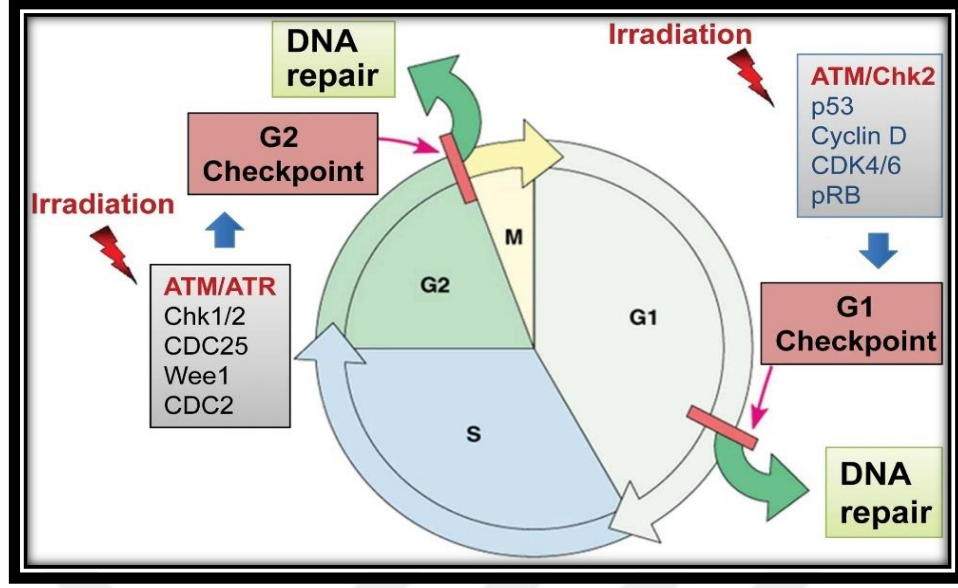
Baş -boyun kanseri hücre kültürüne, p16 geni yüksek seviyede üretebilecek biçimde dizayn edilip adenovirus (Ad5-p16) ile *in vitro* şekilde uygulandığında hücre büyümesini %96'ya varan etkinlikte ekspresyonunu azaltabileceği bildirilmiştir (32).

Tümör baskılayıcı genler inaktive olurken aynı zamanda onkogenler de aktive olurlar. Ancak bu durum tümör baskılayıcı genlere göre daha az oranda görülür. Örneğin; Baş- boyun kanserinde Myc, Ras, Ncu, Bcl ve Int gibi onkogenlerin ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir (33).

Baş -boyun kanserlerinin bir türü olan larenks kanserinde cyclin D1'de %25-35 oranında, EGFR'de ise %25-35 oranlarında amplifikasyon olduğu belirlenmiştir. Siklin D1 adı verilen proto-onkogen hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemlidir. Tümörlü dokuda ve etrafında bu genin amplifikasyonu %70 düzeyindedir (34).

Bunlara ek olarak gen tedavi yöntemi ile baş -boyun kanserlerinde klinik tedavi stratejilerinde artış görülmektedir. Şimdiye kadar kullanılmakta olan klasik yöntemlerde (cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi) karşılaşılan sorunlara karşılık genetik ve moleküler biyoloji alanında yapılan bilimsel çalışmalar sonucu son zamanlarda getirilen yenilikler, kanserleşme süreci ve tümör oluşumundaki yolların aydınlatılmasını sağlamıştır. Ayrıca bu çalışmalar sonucu elde edilen teorik bilgiler klinik uygulamalara aktarılmıştır (35).

Normal şartlarda hücre döngüsü kontrol noktaları olan ve işleyişi kontrol altında tutulan bir sistemdir (Şekil 2.3.). Bu kontrol noktalarında bulunan genler sayesinde hücre herhangi bir hasara uğramadan sağlıklı hücreler meydana getirir. Kontrol noktalarında oluşan herhangi bir bozukluk, hasarlı DNA'ya sahip hücrenin kontrolden kaçmasına ve kanserleşme sürecinin oluşmasına sebebiyet vermektedir (36).



Şekil 2.3. Hücre döngüsü kontrol noktaları (36).

Gen tedavisi yaklaşımında amaç, ortaya çıkmış olan hastalığın genetik temelindeki problemin düzeltilmesidir; yani kısaca normal şartlarda olması gereken yabani tipden elde edilen DNA'nın herhangi bir hastalığa neden olan mutasyona uğramış olan alleli taşıyan hücrelere verilerek tedavi edilmesi yani bozuk olan fonksiyonu düzeltmek için normal gen aktarımıdır (37). Bu yöntemle yapılan tedaviler ile hayvan deneylerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. İnsanda ise ilk defa 1990'da gen tedavisi uygulanmış (38) ve günümüzde de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olup, günümüzdeki verilere bakıldığında 5 000'in üzerinde hastada 400'den fazla gen tedavisi temelli protokol uygulanmıştır (39).

Bilim dünyasında gerçekleştirilen çalışmalar sonucu gen tedavisinde en üst seviyede etkinliğe sahip olan tedavi stratejileri vardır. Bu tedavi stratejileri temel olarak dört ana başlıkta toplanmıştır;

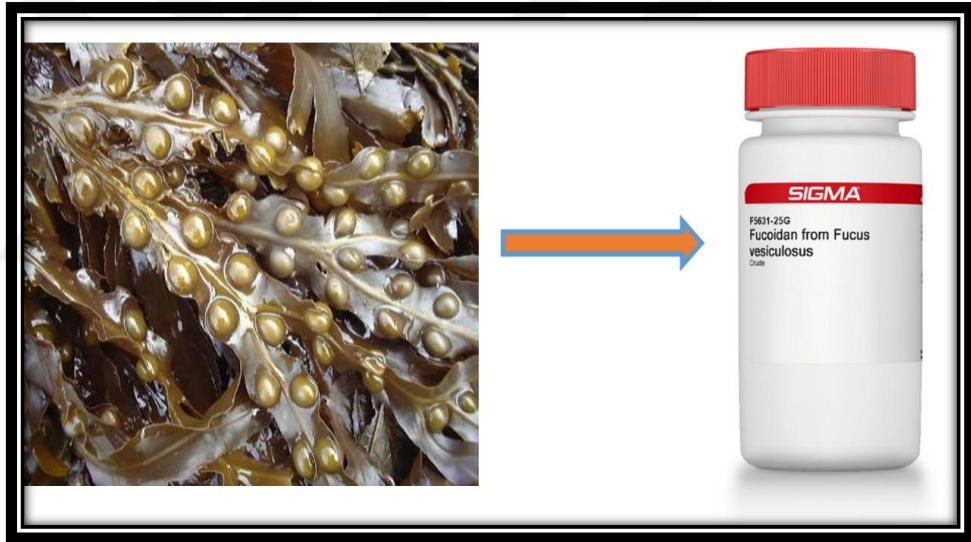
- 1) Replasman gen tedavisi: Onkojen aktivitesinin inhibasyonu, Tümör baskılayıcı gen aktivitesi (40),
- 2) İntihar gen tedavisi (Genetik ön-ilaç aktivite tedavisi) (41),
- 3) Tümörde yeni damar oluşumunun inhibasyonu (42),
- 4) İmmünoterapi'dir (43).

Hastalığın özellik ve şartlarına göre hangi yöntemin tedaviye uygun olacağına karar verilir ve bu yöntemlerden biri seçilerek tedaviye başlanılır.

Sitotoksik etkisi az olan bitkisel ajanlar kullanılarak farklı kanser tiplerinde çalışmalar sürdürülmektedir. Fucoidan da baş -boyun kanser hücre hattı üzerinde çalışmamızda kullanılmış bir ajandır.

### 2.3. Fucus Vesiculosus (Fucoidan) Yapısı ve Özellikleri

Mozuku yosunun latince ismi *Cladosiphon okamuranus* olup Japonya, Okinawa ve Tayvan bölgesinde yetiştirilmektedir. *C. okamuranus* yapısında bulunan Fucoidan sayesinde diğer su yosunları arasında öne çıkar (Şekil 2.4.) (44).

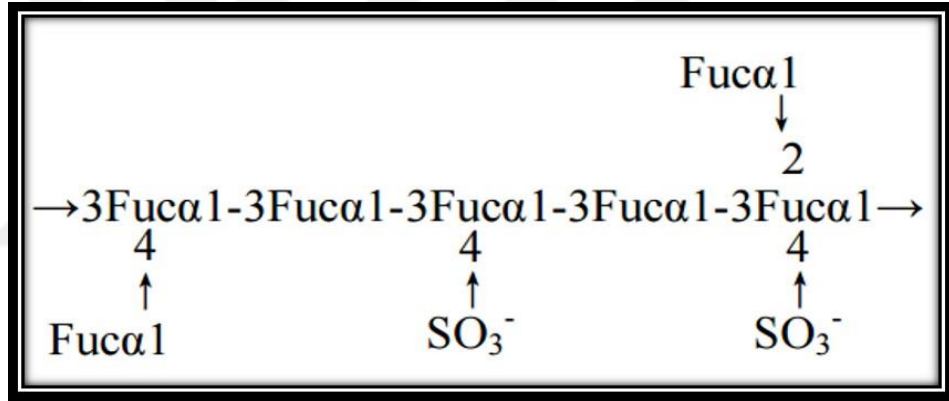


Şekil 2.4. Çalışmada uygulanan Mozuku'nun ekstraktı Fucoidan (Sigma, F5631).

Özellikleri arasında 10 cm uzunluğu, 1 mm genişliği, dallara ayrılmış vaziyette dışı sümüksü bir yapıya sahip olması gösterilir. Japonya' da yiyecek maddesi olarak tüketilen mozukunun yapısında bulunan etken maddeleri arasında alginik asit, karetenoid, C vitamini, K vitamini, amino asitler, demir, fosfor, kalsiyum gibi mineral kaynağı olarak oldukça zengindir (45). Son olarak da bizimde üzerinde çalışmamızı sürdüreceğimiz Fucoidan etken maddeleri arasında önemli bir yere sahip olup aşağıda detaylı bir biçimde anlatılmaktadır.

Kanser gibi birçok hastalığın iyileşme sürecinde oluşan yetersizliklerden dolayı doğal kaynaklardan geliştirilen yeni ilaçlar son zamanlarda yaygınlaşmaktadır. Bu doğal kaynaklar arasında deniz ortamı, farmakolojik ve tıbbi araştırmalarda önemli yer tutar. Kanser alanında son zamanlarda yapılan çalışmalar ile doğal kaynaklardan izole edilen anti kanser özelliği kanıtlanmış birçok ümit verici bileşik ortaya çıkarılmıştır. Algler bu anlamda ciddi bir potansiyel barındırır (46, 47).

Fucoidan'lar kahverengi alglerin hücre dışı matriksi içinde bulunan, fukoza zengin, sülfatlanmış polisakkarit sınıfıdır (Şekil 2.5.) (45). Algler antiviral, antifungal ve antibakteriyel özelliklerinin yanında biyoaktif maddelerden protein, yağ ve polifenolü yapısında barındırır. Dolayısıyla yeni farmokolojik ajanların geliştirilmesinde kullanılırlar (48).



Şekil 2.5. Fucoidan'ın ortalama yapısı için Pankter model (45).

### 2.3.1. Tarihçesi

Fucoidan mukopolisakkarit ailesine ait bir polisakkarittir (49). İlk defa 1913 yılında profesör H.Z.Kylin tarafından bulunmuş (50) ama 1996'da Japon Kanser Kongresinde kanser üzerine etkisi rapor edilmesiyle gösterilen ilgi artmıştır. Fucoidan ile yapılan çalışmalar, hücreler üzerinde proliferasyona olan etkide kalmış *in vivo* çalışmaların henüz ötesine geçilememiştir. Kanser hücrelerine inhibisyon etkisinin yanı sıra enflamasyon, immünolojik, lipid mekanizması ve anjiyogeneze olan etkileri de çalışılmıştır (51).

Bu etkilerden Fucoidan'ın anti tümör aktivitesi hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamlarda gösterilmiştir. Özellikle Fucoidan'ın antitümör aktivitesini apoptozu uyarıp, neovaskülerizasyonu baskılayıp hücreye bağlı bağışıklığı aktifleştirerek yaptığını rapor etmişlerdir (52).

### 2.3.2. Uygulama Alanları ve Kansere İlişkisi

Fucoidan'ın ana yapısı yüksek moleküler polisakkarit olan fukoz sülfattır. Fucoidan'lar, *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Birçok tümör hücre hattında antitümör etkisi görülmüştür. Fucoidan ile ilgili yapılan çalışmalardan bazılarını inceleyecek olursak;

- 1) Fucoidan'ın 1mg/ml konsatrasyonda,
- 2) Hepatokarsinom hücre hattında,
- 3) G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> evresinde S evresine göre çok fazla olduğu ve Fucoidan'ın hücre döngüsünü G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> evresinde durdurduğu rapor edilmiştir (53).

Üzerine ilave çalışmalar yapıldığında ise Fucoidan ilave edip 72 saat inkübasyona bırakıldığında ise G<sub>2</sub>/M fazında hepatokarsinom hücrelerinin arttığı gösterilmiştir (54).

Fucoidan'ın etki mekanizmaları içinde apoptoz en çok çalışılmış olanıdır (55). Fucoidan'ın bu yollarda etkisi üzerine çalışmalar sürdürülmüş ve MCF7 hücrelerinde Kaspaz -3'ün aktivasyonunu artırarak apoptotik hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir (56). Yine bu çalışmalara örnek olarak Fucoidan'ın proapoptotik protein olan Bax ve Bad proteinlerini artırdığı, anti-apoptotik protein olan Bcl -2 ve Bcl -xL anti-apoptotik protein olan Bcl -2 ve Bcl -xl proteinlerinin etkinliğini azaltmasına ek olarak MCF7 hücre hattında mitokondriyal depolarizasyonu artırdığı da bulunmuştur (57). Ayrıca bu çalışmaların devamında Fucoidan'ın kolon kanserinde mitokondriden sitokrom c ve Smac/Diablo salınımını artırarak mitokondri membranının permeabilitesini artırdığı bulunmuştur. Başka bir çalışmada hücre döngüsünü durduğu ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (58).

Fucoidan'ın hücre döngüsünü G<sub>1</sub>-fazında durduran, p21 (WAF1) -siklin -CDK mekanizma katılımını gösteren ilk sistematik araştırmayı yapmışlardır. Bu beklenmeyen sonuçlarda Fucoidan'ın HT29 kolon kanser hücrelerinde Akt aktivasyonu yoluyla hücre çoğalmasını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Sonuç olarak, Fucoidan'ın, *in vitro* ve *in vivo* olarak, kolon kanserinin büyümesini ve anjiyogenezini inhibe ettiği görülmüştür (52).

Fucoidan hücre döngüsünü durdurma, apoptozu uyarma ve bağışıklık sistemi aktivasyonu gibi çeşitli mekanizmaların uyarımına aracılık eder. Fucoidan'ın aktivitelerine ek olarak kök hücre mobilizasyonu, oksidatif stres, bağışıklık sistemi aracılığıyla inflamasyonun uyarımı dahil anti-kanser özellikleri rapor edilmiştir (59).

Park ve Kim'in arkadaşlarının yaptığı çalışmada Fucoidan'ın insan gastrik adenokarsinom hücrelerin (AGS) kültüründe antiproliferatif etki mekanizmaları araştırılmıştır. Fucoidan tedavisi ile antiapoptotik Bcl -2 ve Bcl -X1 ekspresyonlarında azalmaya, mitokondrial membran potansiyel kaybına, kaspaz aktivasyonuna ve poly - (ADP -ribose) polimeraz aktivite düşüklüğüne bağlı apoptoz gitmektedir. Buna ek olarak Fucoidan tedavisine bağlı AGS hücrelerindeki morfolojik çalışmada otofagozom formasyonu gibi morfolojilerinde karakteristik bulgulara rastlanılmıştır. Yapılan bu çalışmada Fucoidan'ın kanser hücreleri üzerine etkisinin apoptoz üzerinden olabileceği gibi, otofaji üzerindende olabileceğini göstermişlerdir (60).

#### **2.4. Apoptoz ile Bax, Bcl -2, Caspase -3, Caspase -9, Caspase -8, Cytochrome -c, VEGF, Erk (Mapk1), Survivin Genlerinin Yapısı ve Özellikleri**

Organizmada görevini tamamlamış olan veya hasarlı hücrelerin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldıran, genetik kontrollü programlı ölümüne apoptoz denilir. Hücre tarafından programlanmış mekanizma ile gerçekleşen apoptoz, genetik faktörler veya hücre dışı lezyonlar ile aktive edilerek hayatın farklı evrelerinde büyük öneme sahiptir (61). Fizyolojik bir olay olan apoptoz normal gelişim aşamasında ve olgun organizmadaki farklı hücre tiplerinin tahribatı sırasında spesifik hücrelerin yok olmasından mesuldür. Apoptozda fonksiyonel mekanizma denge unsurudur. Bu sebepten ötürü apoptoz oranının azalması ile hücre sayısının artması ve

bunun tersi olan apoptoz oranının artmasına bağlı olarak hücre sayısının azalmasıdır (62).

Nekrozdan farklı olarak gerçekleşen bu ölüm şekli apoptoz olup bu terim başlangıç olarak 1972’de J.F.K.Kerr tarafından tanımlanmış, fizyolojik hücre intihar şeklidir (63). Apoptoz tanımı ise ilk olarak 1842 yılında Vogt tarafından yapılmıştır; Yunanca’da apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinden oluşan terim, hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm şeklidir (64).

Birçok kanser tipi için yapılan araştırmalara baktığımızda apoptotik hücre ölümü sinyal yolağı üzerinden hedef alındığını görülmektedir. Fiziksel bir süreç olan apoptotik hücre ölümü morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sebebiyle oluşmaktadır; proliferasyon, değişim ve matürasyon süreçleri ile tehlike arz eden hücrelerin organizmadan uzaklaştırılmasıdır. Apoptozda en önemli enzimlerin yapısal ve fonksiyonel proteinleri hidrolizasyonunu sağlayan yapılar kaspazlardır. Kaspazların aktivasyonu iki yolak tarafından etkilenmektedir: Membran reseptörleri ve ligandları ile ilişkili dış yolak, ikincisi ise mitokondri ile bağlantılı olan iç yolaktır (65). Bu sebeplerden ötürü moleküler çalışmaların çoğunda genelde kaspaz yolağı araştırılmaktadır.

Apoptozun öncesinde hücre replikasyon durur ve DNA tamiri olur, eğer bu döngüde DNA tamir mekanizması gerçekleşmezse hücre apoptoza gitmektedir. *In vitro* çalışmalarda, apoptoz sürecinin hızlı bir olay olduğu, uyarıyla birlikte hücrenin hızla ortamdan uzaklaştığı, yuvarlaklaşma meydana gelirken sitoplazmasının da büzüldüğü bildirilmiştir. Büzülme ve kabarma sırasında şiddetli olarak bu durum aktivitelere yansımaktadır; protoplazma zardan uzaklaşır, apoptotik cisim meydana gelir ve tüm bu olaylar birkaç dakika içinde tamamlanır. Apoptotik hücrelerin fagositozu için de 12-18 saat gibi uzun bir zaman gerekmektedir (66).

Apoptozun karakteristik özellikleri hücre büzülmesi, tomurcuklanma, kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu olarak belirtilmektedir (67). DNA çözülmesi, kromatin yığılması apoptozun önemli basamakları olup apoptoz aktif olduktan bir saat ya da daha uzun zaman sonra DNA’da tek iplikte bir çentik ile başlayan spesifik ve geri dönüşümü olmayan bir yıkım meydana gelir. DNA

yarıklanmasına bağlı olarak DNA'yı parçalayan enzim olan endonükleaz aktivitesi artmaktadır. Bu enzimin artmasındaki sebep kalsiyum (Ca)/ magnezyum (Mg) oranının 1 ya da daha fazla olmasına bağlanmıştır (68).

Apoptoz alışmalarında DNA fragmentasyonu DNA cetveli, floresan boyama (4-6 diamidino- phenylindole (DAPI)) boyama gibi yöntemlerle incelenebilmektedir (69). Hücrede meydana gelen kalsiyum iyon değişimine bağlı olarak aktifleşen enzimler hücre iskeletinin yıkımında önemli unsurdur. Apoptoz da rol alan ve sistein-proteaz grubundan bu enzimlerin en önemlilerinden biri Kaspazlar (Cysteine Aspartate Specific ProteASEs -CASPASE)'dır. Başlangıçta inaktif olan proteinler çeşitli yollarla aktivasyon kazanırlar (70).

Apoptoz esnasında oluşan pek çok şekilsel ve hücresel değişimler, bu enzimlerin görevli olduğu zaman diliminde meydana gelir. Apoptozun aktivasyonunda kaspaz aracağıyla üç ayrı yol olduğu bilinmektedir;

- 1) Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptoz (71),
- 2) Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile oluşan apoptoz (72),
- 3) Endoplazmik retikulum aracılı apoptoz şeklidir (73).

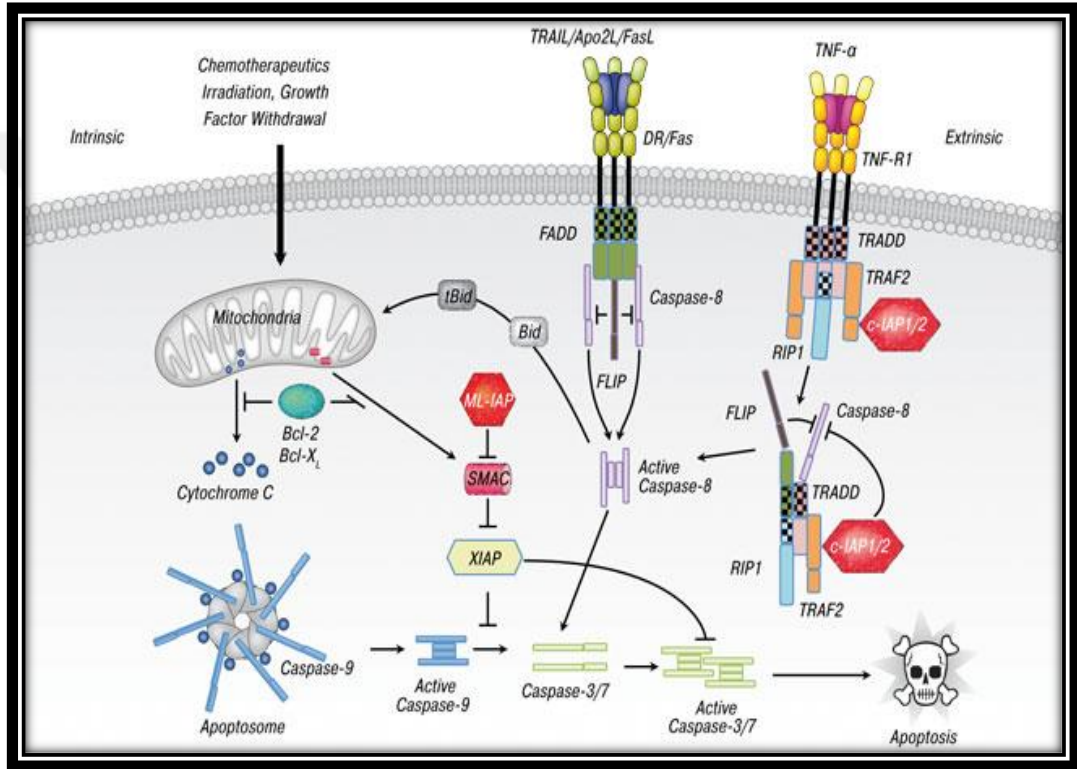
Memelilerde en az 14 kaspaz tanımlandığı ve işlevlerine göre üç gruba ayrıldığı belirtilmektedir;

- 1) Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz- 2, 8, 9, 10),
- 2) Etkili (Efektör) kaspazlar (Kaspaz-3, 6, 7) ve
- 3) Enflamatuvar kaspazlar (Kaspaz- 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14)'dır (74).

Ekstrinsik yolak hücre yüzey reseptörlerine bağlı apoptoz tipidir. Tümör nekroz faktörü (TNF), Fas ligand gibi ölüm faktörü reseptörüne bağlanmaktadır. Fas ligand, hücrelerin plazma membranına bağlıdır. Ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı anda yapısında değişiklik meydana gelir ve birkaç reseptörün etkisiyle oligomerizasyon meydana gelir. Sonunda hücrenin dışından gelen moleküllere bağlanarak Kaspaz-8'i aktifleştirme sinyalleri yayılır (75).



Ekstrinsik yolda Kaspaz-8 başlatıcı kaspaz olup reseptör ile apoptotik proteazlar arasındaki ilk bağlantıyı oluşturmaktadır. Aktive olan Kaspaz-8, diğer kaspazları (Kaspaz -3, 6, 7) aktive etmektedir. Sonuç olarak kaspaz kaskadı özel hedef proteini kırarak apoptozu oluşturur (Şekil 2.6.) (76). Kaspaz kaskadının amaçladığı proteinlerin proteolizi, hücre yıkımını oluşturur. Hedef proteinler arasında hücre iskeleti proteinleri: aktin, nükleusun büzülmesine sebep olan laminler ve DNA'yı nükleozomlar arasından kırarak, DNA fragmanı oluşturan DNAaz'dır.



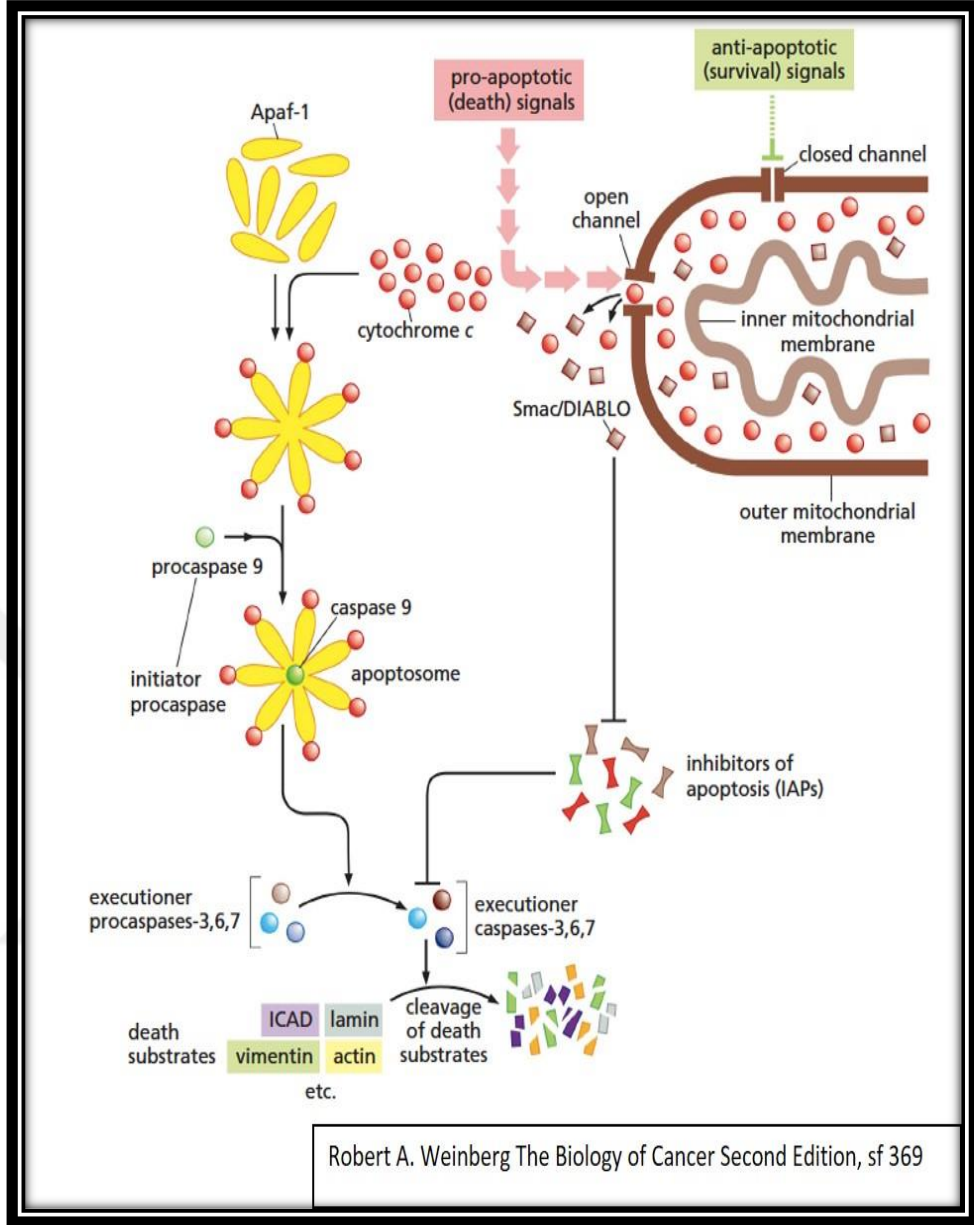
Şekil 2.6. Apoptozda intrinsik ve ekstrinsik yolak (76).

İntrinsik yolak da, mitokondrinin dış membranını, hücrenin yaşamını ya da ölümünü belirleyen önemli bir kapıdır. Mitokondri/sitokrom c aracılı olan bu apoptoz tipi DNA hasarı ve oksidatif stres gibi hücre içinden gelen uyarı ile mitokondrinin dış membranını etkileyen Bcl -2 ailesi proteinleri vasıtası ile uyarılır. Apotozun intrinsik yolağı dıştan gelen uyarılara (FAS, TNF) duyarsızdır (77).

Pro -apoptotik ve Anti -apoptotik Bcl -2 aile üyeleri, Bcl -2 ailesinin yaklaşık 20 üyesi olduğu ve hepsinin en az bir protein-protein ilişkisine aracılık eden Bcl -2 homoloji (BH) alan adı (domain) içerdiği bilinmektedir. Aile üyelerinin çoğu ya üç ya da dört BH alan adı paylaşmaktadır. Bcl -2 proteinleri alt gruplara ayrılır; hücreyi apoptoza götüren gruba pro-apoptotik, apoptozu inhibe etmekte olan gruba anti-apoptotik denilmektedir. Pro-apoptotik üyeler; Bax, Bak, Bid, Diva, Bix, Bim, Bcl-Xs, Egl-1; Anti-apoptotik üyeler; Bcl -2, Bcl -xl, Mc1, Bcl -w, Bfl -1, Bcl -2 şeklinde ifade edilirler (78).

Çesitli anti -apoptotik (Bcl -2) sinyaller dış mitokondriyal membran kanallarını kapalı tutmaya çalışırken, tersine pro-apoptotik (Bax) ölüm sinyalleri bu kanalları açmak için çalışır. Sitosol içine serbest bırakılabilir mitokondriyal molekülleri arasında önemlileri sitokrom c ve Smac\DIABLO'dur.

Prokaspaz -9 ve Sitokrom -c sitoplazmaya serbestlenip (79) sitokrom -c molekülleri, yedi kollu apoptozom oluşturmak üzere Apaf -1 ile bir araya gelir. Yedi kollu apoptozom Prokaspaz -9'u etkileyerek aktif Kaspaz -9'a çevirir ve pro-kaspaz-3, 6, 7'yi sırayla böler ve aktifleştirir (80, 81). Böylece bunları öldürücü kaspazlar haline getirir. Daha sonra, ürünleri apoptotik hücre fenotipi oluşturan çeşitli "ölüm substratlarını" ayırır. Normal olarak, çok sayıda apoptoz inhibitörleri (IAPs), kaspazlara yapışır ve onları inaktif yapar. Fakat yine mitokondriden salınan Smac/DIABLO bu IAP'lara zıt çalışarak kaspazları IAP inhibisyonundan korur (Şekil 2.7.) (82).



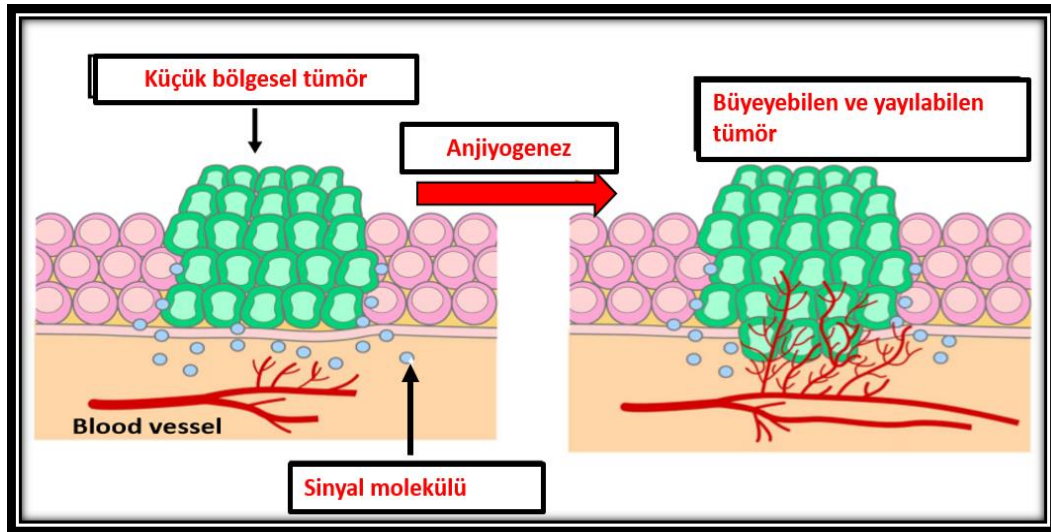
Şekil 2.7. Apoptozda intrinsik yolak (83).

Vücutta yeni kan damarları ağı oluşumuna anjiyogenez denir. Kanser in yayılmasında kritik önem taşıyan yeni kan damarları oluşumu ve gelişimi (anjiyogenez) üzerine kanser çalışmaları son yıllarda artmıştır. Tümör anjiyogenezi kanser oluşumunun içinde ilerleyerek, oksijen ve besin sağlayan, atıkları uzaklaştıran yeni kan damarlarının oluşumudur (84, 85).

Tümör anjiyogenezi, kanserli hücrelerin kendilerini çevreleyen normal dokuya sinyaller yayan moleküller salgılamasıyla başlar. Bu sinyaller çevre anjiyogenez dokularında yeni kan damar ağlarının oluşumunu sağlayacak proteinlerin sentezlenmesini sağlar. Tümörün anjiyogenez neticesinde genişleyen kan damar ağları aracılığı ile beslendiği ortaya konulmuştur (85, 86).

Kanser ile ilgili gen bozukluklarının yanı sıra pek çok kanser hücresi kendi büyümesini uyaran büyüme faktörleri üretmektedir. Bu da kanserin ilerlemesine sebep olur. Yeni damar gelişimi olmayan tümörler asemptomatik lezyonlar olarak kalır (85, 86).

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), tümörlerin salgıladıkları büyüme faktörleri içinde anjiyogenez oluşumunu sağlayan primer sitokindir. VEGF, tümör damar oluşumunda rol oynayan, 45 kDa homodimerik yapılı, özel olarak vasküler endotelyum üzerinde etkili bir glikoproteindir. Vasküler endotelyal hücrelerin gelişiminden, sağkalımından ve hücre çoğalmasından mesuldür (87). 1996 yılında faredeki tek bir VEGF allelinin susturulması (knock-out) embriyogenik ölümle sonuçlanması, VEGF'ün tümör damarlaşmasındaki gibi patolojik damarlaşmanın yanı sıra normal embriyonik gelişim için gerekli olduğu ortaya konulmuştur (88).



Şekil 2.8. Tümör anjiyogenezin gösterimi (89)

Map kinazlar, mitojen aktive protein kinazlar süper ailesindedir (Şekil 2.8.) (90). Ökaryotik hücrelerin tümünde bulunan bu proteinler hücre membranından çekirdeğine bilgi aktarılmasındaki önemi büyüktür. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenez, yaşama, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz işlevlerinin düzenlenmesinde rol almaktadır. MAP kinazlar üç ana gruba ayrılır (91) ;

- 1) p38 MAP kinaz ailesi,
- 2) Hücre dışı sinyal düzenleyen kinaz (Extracellular signal regulated kinase (ERKs)) ailesi,
- 3) c-Jun NH2- uç kinaz (c-Jun NH2 -terminal kinase (JNK)) ailesidir (91).

MAP kinaz yolu, reseptör vasıtalı uyarının hücre içine sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Kaskad sistemi hem sinyalin amplifikasyonu hem de düzenleyici etkileşimler (sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önem taşır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAP kinaz kinaz kinaz (MAPKKK)'ın aktivasyonundan sonra sırası ile MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktifleşir. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskelet elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yolu ile aktive eder ve hücrenin biyoloji cevabı oluşur (92).

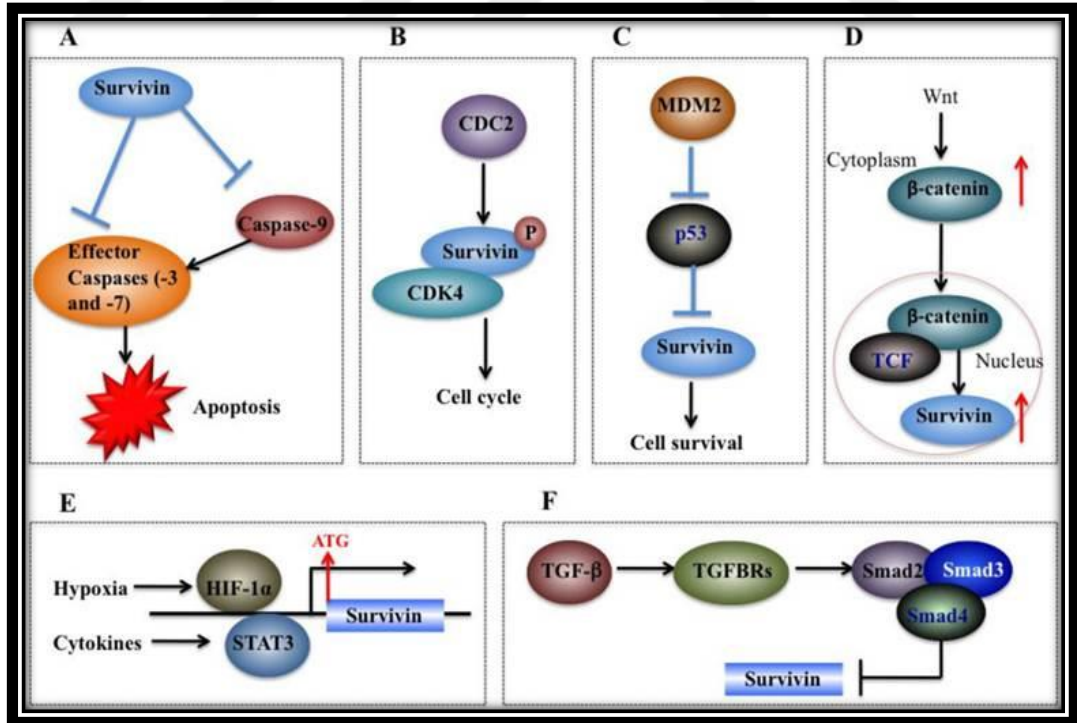
Survivin geni insanlarda üç intron ve dört ekzondan meydana gelmiş olup kromozomun 17q25 bölgesinde yer alan, 14.7 kb uzunluğunda, 142 aminoasitlik, 16.5 kilo dalton ağırlığında proteini kodlayan bir genidir. 1997 yılında Ambrosini G. ve arkadaşları tarafından insan genomunun hibritlemesi ile Yale Üniversitesi'nde yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur (93, 94).

Apoptozu inhibe eden proteinler (IAPs) orijinal olarak bakülovirüsler olarak tanımlanmış olup, türler arasındaki korunmuşlukları, viral proteinlere benzerliklerinin olduğu bilinmektedir. Bcl -2 apoptozu inhibe ederek hücrenin uzun süre hayatta kalmasına neden olan ilk protein olarak gösterilmiştir. Survivin (BIRC5) apoptozu düzenleyen önemli bir protein ailesi olan IAPs olarak bulunan ilk inhibitörlerden biridir ve özellikle kanser hücrelerinde belirgin bir şekilde ifade olmaktadır (95).

Survivin'in iki farklı deneysel kanıt yoluyla apoptoz inhibisyonundaki rolü gösterilmiştir. Birincisi, ekstrinsik ya da intrinsik yolla hücre kültür sistemlerinde rekombinant Survivin ifadesinin hücre ölümünü baskıladığı gösterilmiştir. İkincisi, Survivin'in genetik olarak düzenlenen hayvanların kullanılması ile *in vivo* olarak antiapoptotik fonksiyonu gösterilmiştir. Survivin hem apoptozu baskılayıcı hem de hücre bölünmesini düzenleyici özelliğe sahip iki fonksiyonlu, iyi bilinen bir apoptoz inhibitörüdür (96, 97).

Survivin'in aşırı ifade edilmesi, mitoz aracılığıyla hücre çoğalmasını zorlamak için G<sub>2</sub>/M fazındaki kontrol noktasının üstesinden gelebilecek kadar onkogenik potansiyele sahiptir ve neoplastik klonların gelişmesini başlatabilir (98).

Apoptoz inhibitör ailesinin üyesi olan bu gen akciğer, böbrek, cilt, endometriyum, mide, kolon, meme, baş- boyun kanseri gibi farklı kanser türlerinde fazla eksprese olması, histopatolojisi ve promotör bölgesindeki polimorfizmler nedeniyle birçok araştırmacının çalışma alanına girmiştir.



Şekil 2.9. Tümörögenez olarak Survivin'in moleküler mekanizmaları (99).

Survivin'in aşırı ifadesi ile apoptotik yollar olan ekstrinsik ya da intrinsik hücre ölüm inhibisyonu ilişkilidir (Şekil 2.9.A) (100). Hücre regülasyonunda, fosforilasyon, kinazlar için anahtar rol üstlenmektedir (Şekil 2.9.B) (101) Caspase-3/Mouse double minute 2 homolog (MDM2) kompleks aracılığıyla Survivin p53 genini regülasyonunu ve degradasyonunda görev almaktadır (Şekil 2.9.C) (102). Survivin'in yüksek ekspresyonu hücre sayısını artırır ve hücreyi apoptozdan korur (Şekil 2.9.D) (103). Hipoksik koşullar tümörlerde yaygındır (104) ve çalışmalara baktığımızda Survivin geninin aktivitesine bağlı olarak, promotör bölgesine direkt olarak Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) bağlanabilmektedir (Şekil 2.9.E) (105). Genellikle Survivin CDE/CHR elementleri ve Smad 2 ve 3 üzerine bağlı mekanizma yoluyla TGF- $\beta$  sinyal yolağı Survivin ekspresyonunu baskılar (Şekil 2.9.F) (106). Bunlara ilaveten, Survivin geni fetal ve kanserli dokularda bulunmasına karşın normal yetişkin bir insanın plasenta ve timüsü dışında hiçbir dokuda bulunmaz (98, 107). Survivin'in kötü huylu tümörlerin çoğunda prognostik bir markır olarak gelecekteki kanser tedavisinde ümit verici bir gen olduğu bulunmuştur (108, 109).

Bu çalışmada amaç, baş -boyun kanseri üzerinde moleküler etkilerin araştırılmasıdır. Hücre proliferasyonuna ve migrasyonuna olan etkisi ile apoptotik yolda hangi genleri nasıl etkilediği sorularına cevap bulmak hedef alınmıştır.

Fucoidan ile yapılan önceki çalışmalar, incelediğinde, farklı kanser hücre hatlarında apoptotik yolağı kullanarak ölüme götürdüğü tespit edilmiştir. Bu çalışmada, daha önce çalışılmamış olan baş- boyun kanseri hücre hattında Fucoidan çalışmalarını yapmak amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Kullanılan Hücre Hattı ve Özellikleri

**Tablo 3.1.** UT-SCC-6A hücre hattının özellikleri (110).

Hücre Hattı	Cinsiyet	Yaş	Tip	TNM	Alınan Bölge	Grade
UT-SCC-6A	Kadın	51	Primer rekürrens	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	supraglottik larinks	G <sub>1</sub>

Baş -boyun skuamoz hücreli karsinomun (UT-SCC) farklı türleri mevcut olup, çalışmamızda Finlandiya’da Turku Üniversitesinden alınan UT-SCC-6A (6A) primer tümörü kullanılmıştır. Tablo 3.1.’de sunulan, 6A hücre hattı 51 yaşındaki kadının supraglottik larinks bölgesinde, SCC olan G<sub>1</sub> evresinden elde edilmiş olup, TNM sistemine göre sınıflandırılması T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> şeklindedir (110).

##### 3.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

**Tablo 3.2.** Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi.

Thermo BioSafety Cabinet Class II (Steril Hücre Kültürü Kabini)
BioRad Cell Counter (Hücre Sayım Cihazı)
Thermo scientific (Pipet Tabancası)
Hettich Rotina 380R santrifüj (Germany)
Qiagen RT-PCR cihazı
Nüve Bench Top santrifüj (Nüve-Turkey)
Techne TC-5000 PCR cihazı, Biorad (Gradient PCR-USA)
Thermo Varioskan (Multiplate Okuyucu)
Memmert Benmari – (Su Banyosu WNB-14 - Germany)
Shimadzu AUW220D (Hassas terazi - Japan)



**Tablo 3.2.** Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi (devam).

Herolab UV Transilluminator (Germany)
VWR International Vortex (Germany)
Sanyo CO <sub>2</sub> inkübatörü
Roche xCELLigence (Canlı hücre proliferasyon analiz cihazı)
Nüve Steamart (Katı ve sıvı otoklav) Mini and Midi Format
Electrophoresis Systems (BioRad) (Running)
Sanyo -80°C (Dondurucu)
Scotsman AF80 Buz makinesi (IL, USA)
VWR Galaxy Ministar spin arttırıcı (Korea)
The ChemiDoc MP system (Bio-Rad) (Görüntü)
The Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) (Transfer)
Leica DM IL LED Mikroskop
Manyetik karıştırıcı - ısıtıcı (MTOPS MS300)
Thermo Scientific OWL EASYCAST™ B2 Jel elektroforez sistemi (USASchimadzu)
UV-Pharmaspec 1700 spektrofotometre (Japan)
Schimadzu Biotech Biospec-nano spektrofotometre (Japan)
Thermo Scientific Barnstead Easypure II ultra saf su cihazı (54)
Techne Dri-Block DB-2D heatblock (UK)
Consort EV265 elektroforez güçkaynağı (Belgium)
Cleaver Scientific MSCHOICE elektroforez tankı
Western Görüntüleme Cihazı (The ChemiDoc MP system- Bio-Rad)
VWR advanced VMS-C7
-20°C Dondurucu (Bosch- Germany)
Mikrodalga fırın (Samsung MV71E- Korea)
Ultra Distile su cihazı (Thermo scientific barnstead Easypure II-USA)
Nikon AIR- NİS Elements (Işık Mikroskop)

Tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi Tablo 3.2.'de sunulmuştur.

### 3.1.3. Hücre Kültürü Donanımları

12 kuyucuklu petri, 6 kuyucuklu petri, 25, 75, 175 cm<sup>2</sup> hücre büyütme kapları, UT-SCC-6A hücre hattı, Fetal Bovine Serum, Tripsin -EDTA, kriyovial tüp, Penisilin/Streptomisin, L -Glutamin, DMEM, Penisilin, steril pipetler (5, 10, 25, 50 ml), şırınga filtreleri (0.22 µm).

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda Finlandiya'da Turku Üniversitesinden alınan UT-SCC-6A (6A) primer tümörü kullanılmıştır. 6A hücre hattı 51 yaşındaki kadının supraglottik larinks bölgesinde, SCC olan G<sub>1</sub> evresinden elde edilmiş olup, TNM sistemine göre sınıflandırılması T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub> şeklindedir (110).

Hücrelerin kültür edilmesi süresince DMEM/High Glukoz medyumu kullanıldı. %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli 37°C'lik inkübatörde büyütüldü. Hücre yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara göre her 2-3 günde bir pasajları gerçekleştirildi.

Çalışmamızda kullanılan 6A hücre hattının medyumu şu şekilde hazırlandı;

#### **500 ml DMEM (HyClone Cat. No.: BE12-604F) besiyeri içerisine:**

- 50 ml FBS (HyClone Cat. No.: SV30180.03),
- 5 ml penisilin / streptomysin (Lonza Cat. No.: DE17-602E),
- 4 m L-Glutamin (Lonza Cat. No.: BE17-605E),
- 50 µl Plasmocin (InvivoGen Cat. No.: MPT-36-03A) eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

Çalışmamızda hücre kültürü çalışma kuralları titizlikle yerine getirilerek, çalışmalar sürdürüldü. Her çalışmadan yarım saat önce, kabinin U.V. ışığı açılarak kabin sterilize edildi. Kabin, çalışma öncesinde %70'lik alkol ile temizlendi. Önce bunzen beki yakıldı daha sonra da havalandırma açıldı.

### 3.2.1.1. Hücre Ekim İşlemleri

#### Hücrelerin Stoklanması:

6A hücre hattının stok şartına bağlı olarak %10 DMSO (900 ul FBS+100 ul DMSO) kullanılarak yapıldı.

- Hücre kaldırma işlemlerine başlamadan önce stok solüsyonu hazırlandı ve soğuk olması için buzdolabının +4 kısmında buz içerisinde bekletildi.
- Flask içerisindeki hücreler 10 ml 1XPBS (Fisher Cat. No.: BMA51226) ile yıkandı.
- 4 ml %0.25 Trypsin-EDTA solüsyonu (Biological Industries Cat. No.: 03-052-1B) ile hücreler kaldırıldı.
- Trypsin- EDTA muamelesinden sonra kalkan hücreler 15 ml medyumu falkon içerisine toplandı.
- 1 100 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Hücre sayısı ile orantılı şekilde stok çözelti eklenerek hücre pelleti çözüldü.
- 1ml olacak şekilde krovial (cryovial) tüplere dağıtıldı.
- Krovial tüpler 15 dk. +4°'de, 30 dk -20°'de sonra da -80°'de bir gün bekletildi ya da BICELL (Bio Freezing) ile direkt -80°'ye kaldırıldı. İkinci günde hücreler sıvı azot tankına alındı.

#### Stoktan Hücre Ekimi:

Hücreler çalışma boyunca 37°C'de inkübe edildiğinden çalışmada kullanılacak solüsyonlarında ısısının aynı olması gerektiğinden solüsyonlar her zaman çalışma öncesinde 37°C'de ısıtıldı.

- -196°C'de sıvı azot tankından alınan hücre, 37°C'deki benmari içerisinde 1-2 dk. bekletildi.
- Falkon içerisine 7 ml medyum eklendi ve krovial tüplerin etrafı %70 alkol ile temizlenip, titiz bir şekilde açılarak falkon tüpünün içine stok solüsyonu içindeki hücreler aktarıldı.
- 25°C'de 1 100 rpm'de 3 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı.

- Hücrelerin üzerine pelletin yoğunluğuna göre gerekli miktarda medyum konulup, ekim yapılacak flaskın boyutuna göre hücrelerin üzerine medyum eklendi
- Pastör pipeti ile pipetaj yapılarak hücreler çözdürüldü ve medyum bulunan flask içerisine hücreler eklendi, flaska yayılacak şekilde sallandı ve 37°C %5 CO<sub>2</sub>'lik inkübatöre konuldu.

### **3.2.1.2. Medyum Değişimi**

- Medyum 37 °C'de ısıtıldı.
- 25'lik, 75'lik veya 175'lik flasktaki medyum uzaklaştırıldı.
- Flask büyüklüğüne göre sırasıyla 8, 15, 20 ml medyum eklendi ve etüve kaldırıldı.
- Medyum hücre tipi ve yoğunluğuna göre sürekli kontrol edilip gerektiğçe değiştirildi. Bu süreçte pasaj gerektiğinde hücreler pasajlandı.

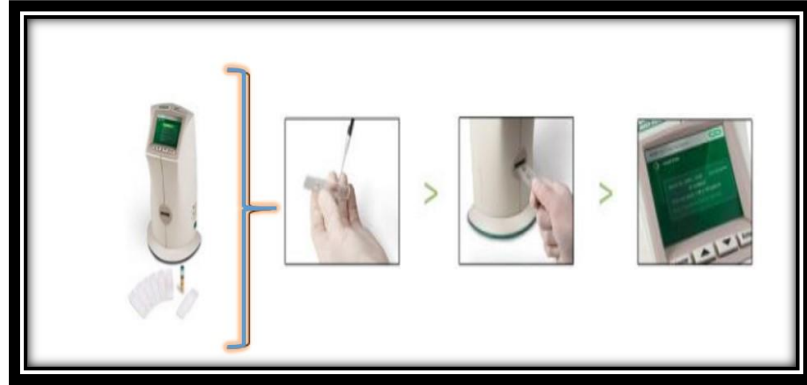
### **3.2.1.3. Harvest İşlemi**

- Flasktaki medyum boşaltıldı.
- Flaska 10 ml 1xPBS (Lonza, 51226) ilave edilerek varsa ölü hücreler ve medyum kalıntıları uzaklaştırıldı ve böylece flaskta tutunan canlı hücreler kaldı.
- Flaskın büyüklüğüne göre 0.5 ml-2 ml, 0.25 tripsin (Biological Industries, 03-052-1B) eklenip, etüve (inkübatöre) konuldu 2-5 dk. arasında hücrelerin kalkması sağlandı (Tripsin-EDTA 37°C'de aktivite olan bir kimyasaldır, bundan dolayı 37°C'de inkübe edildi).
- 5-10 ml medyum eklenip, pipetaj yapılarak falkon tüpe aktarıldı.
- 25°C'de 1 100 rpm'de 3 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atıldı.
- Medyumun tamamı hücrelere zarar vermeden dikkatlice çekildi.
- Medyumda hücreler çözülp eşit bir şekilde hücre kültür tabaklarına (well=kuyucuk) tekrar ekildi. Bu ekim sırasında kullanılacak kuyu-plakaların boyutları önemlidir. Her plate için uygun sayıda hücre ekimi gerçekleştirildi.

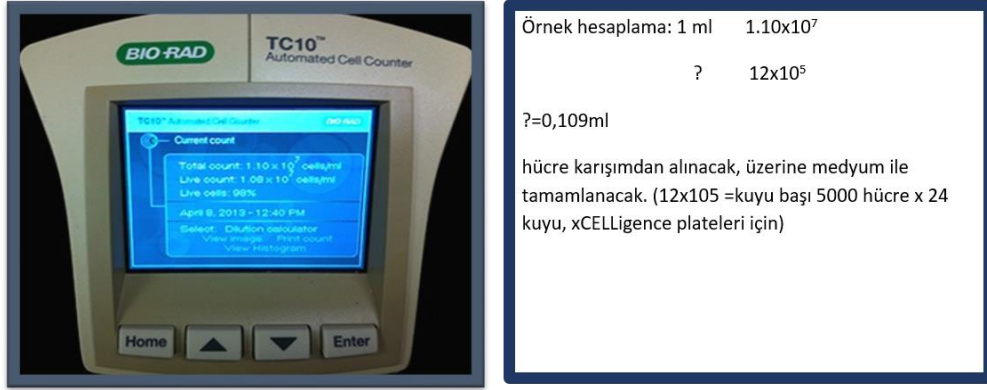
### 3.2.1.4. Tryphan Blue ile Hücre Sayımı ve Hücre Canlılık Analizi

Hücre kültürü aşamalarında kuyucuklara hücrelerin eşit dağıtılması için hücreler sayılarak ekim yapıldı. Bunun için hücre sayımı şu şekilde yapıldı;

- Flasktan yukarıda belirtildiği gibi kaldırılan hücreler medyumda çözündürülüp karışım homojenize edildi, hücre sayımı için; 10 µl Tryphan Blue, 10 µl hücre örneği ile karıştırıldı.
- Bu karışımdan 10 µl alınıp, Bio-Rad's New TC10tm Automated Cell Counter cihazının slaytına eklenip, bu cihazda hücre sayımı yapıldı (Şekil 3.1.).
- Konsantrasyon (hücre/ml)=canlı hücre sayısı ve canlılık oranı belirlenir. Ekim yapılacak plakaya uygun hesap yapıp ekim gerçekleştirildi (Şekil 3.2.).
- 16 kuyu E -plaka, CIM -Plaka için her kuyucuğa belirlenen hücre sayısında hücre ekildi. Bu hücre sayısı hücre hattından hücre hattına değişiklik göstermektedir. Bundan dolayı öncelikle bu kuyucuklara farklı sayılarda hücre ekildi, ardından uygun hücre sayısı belirlendi. Diğer deney aşamalarında da kuyucuklara buna uygun hücre sayısında ekim yapıldı. RNA, protein izolasyonu için 6'lık kuyu (well) platelere ekim yapıldı.



Şekil 3.1. Hücre sayım aşamaları.

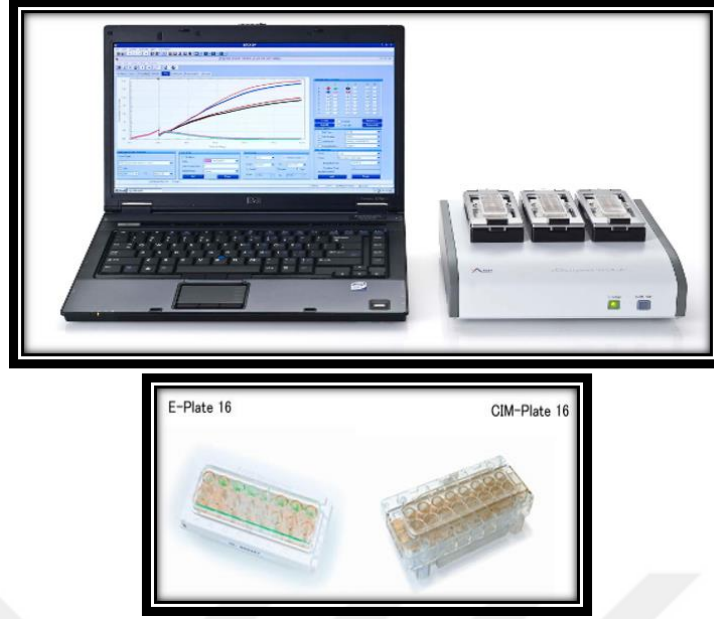


Şekil 3.2. Hücre sayımı ardından hücre/kuyu hesaplamasının gösterimi.

### 3.2.2. xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi)

Hücresel döngüler, xCELLigence sistemi sayesinde hiçbir gösterge kullanmadan gerçek zamanlı olarak analiz edilebilmektedir (ROCHE, xCELLigence RTCA DP ANALYZER). Mekanizma hücre kültürü E-Plaka'ların tabanına koyulmuş mikro- elektrodlar sayesinde elektriksel direnç (empedans) ölçer (Şekil 3.3.). Direnç ölçümü hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil hücrelerin vaziyeti hakkında kantitatif bilgi (data) verir. Biz de Fucoidan uygulaması ardından hücre sayısındaki değişimi tespit amacıyla bu analizi gerçekleştirdik. Bu metodun basamakları aşağıda belirtildiği gibidir;

- xCELLigence özel E -plakalara medyumdan 100 µl her kuyucuğa eklenip, cihaza okutulup background ölçümü yapıldı.
- Pasajdan elde edilen hücreler hücre sayımı yapıldıktan sonra xCELLigence E-plakalara hücre tipine özgün olarak belirlenen sayıda ekildi.
- Ekim ardından 30 dakika oda sıcaklığında bu plakalar bekletildi.
- Cihaza plakalar yerleştirildi ve cihaz program ayarlandıktan sonra çalıştırıldı.



Şekil 3.3. xCELLigence Cihazı, E-Plaka ve CIM -plaka aparatları.

### 3.2.3. Fucus Vesiculosus (Fucoïdan) Muamelesi

Ticari olarak satın alınan *Fucoïdan from fucus vesiculosus* (Fucoïdan) (Sigma, F5631) 2 mg tartılıp 0.5 ml medyum (DMEM) içinde çözdürüldü Tablo 3.3.'de gösterilen doz aralığının belirlenmesinde ki etkili faktör, geniş aralıkta Fucoïdan uygulaması ile en yüksek dozdan, en düşük doza kadar verilen Fucoïdan'ın hücre hatları üzerindeki değişimlerinin tespiti amaçlıdır.

Tablo 3.3. xCELLigence E -plaka çalışmamızda uygulanan Fucoïdan dozları

Madde adı	+	Medyum (DMEM)	=	Oluşan Madde	Son konsantrasyon	(1/4)	E-Plakaya Uygulanan doz
2 mg Fucoïdan	+	0.5 ml	=	A	4 000 µg/ml	=	1 000 ug/ml
0.25 ml A	+	0.25 ml	=	B	2 000 µg/ml	=	500 ug/ml
0.25 ml B	+	0.25 ml	=	C	1 000 ug/ml	=	250 ug/ml
0.25 ml C	+	0.25 ml	=	D	500 ug/ml	=	125 ug/ml
0.25 ml D	+	0.25 ml	=	E	250 ug/ml	=	62.5 ug/ml
0.25 ml E	+	0.25 ml	=	F	125 ug/ml	=	31 ug/ml
0.25 ml F	+	0.25 ml	=	G	62.5 ug/ml	=	16 ug/ml
0.25ml G	+	0.25 ml	=	H	31 ug/ml	=	8 ug/ml
0.25ml H	+	0.25 ml	=	I	16 ug/ml	=	4 ug/ml

### **3.2.4. Hücre Titrasyon Testi RTCA (xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi)**

Bu analiz xCELLigence’da yapılacak madde uygulaması öncesinde E-plakalara ekilecek hücre sayısını belirleme amacıyla yapılmıştır. Her hücre hattının çoğalma süresi farklı olduğundan yapılacak ekimler hücrelerin çoğalma sürelerine bağlı belirlenmiştir. E -plakalara hızlı büyüyen hücre hattından çok fazla ekim yapılırsa daha madde uygulaması yapılmadan hücre ölümleri olacağından o kuyucuk için en uygun sayının kaç olduğu belirlenmesi hedeflenmiştir. Bundan dolayı farklı sayıda hücreler E -plakalara ekilmiş zamana bağlı değişimleri izlenmiştir.

#### **Deneyin basamakları aşağıda belirtildiği gibidir:**

- Hücreye harvest işlemindeki ilk basamaklar uygulanarak hücreler kaldırıldı.
- Hücre sayımı gerçekleştirildi.
- xCELLigence E -plakalara medyundan 100 µl her kuyucuğa eklenip, background ölçümü yapıldı.
- 16 kuyu-plaka (well-plate) xCELLigence E -plakalara dörtlü tekrar olacak şekilde hücreler ekildi.
- Ekimin ardından 30 dakika oda sıcaklığında bu E -plakalar bekletildi.
- Cihaza E -plakalar yerleştirilir ve cihaz program ayarlandıktan sonra çalıştırıldı.
- Ekim ardından hücrelerin proliferasyonlarındaki farklılıklar, zamana ve sayısına bağlı bu platelere ekim için en uygun sayı belirlendi.

### **3.2.5. Hücre Sitotoksosite Testi RTCA (xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi)**

- Hücreye harvest işlemindeki ilk basamaklar uygulanarak hücreler kaldırıldı. Hücre sayımı gerçekleştirildi.
- xCELLigence özel platelerine DMEM’den 100 µl her kuyucuğa eklenip, cihaza okutuldu.
- Hücre titrasyon (Cell titration) deneyi sonucunda belirlenen hücre sayısı 16’lık kuyu plakalara ekildi.
- Cihaza plateler yerleştirildi ve cihaz program ayarlandıktan sonra çalıştırıldı.



- 24 saat sonrasında yukarıda belirtilen dozlarda Fucoidan dörder tekrarlı uygulandı.
- İlerleyen saatlerde hücrelerin çoğalma eğrileri takip edildi. IC<sub>50</sub> değeri tespit edildi.

### **3.2.6. mRNA İfadesinin Belirlenmesi**

Her hücre hattı için xCELLigence kullanılarak dozlar belirlendikten sonra hücreler 6'lık kuyulara her doz için dörder tekrarlı ekildi, inkabatörde inkübe edildi. 24 saat sonra farklı dozlarda Fucoidan uygulandı ve 24 saat sonra aşağıdaki protokol takip edilerek RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyondan önce invert mikroskopuyla hücrelerin fotoğrafları çekildi. Fucoidan uygulanan hücrelerin şekilleriyle kontrol grupları kıyaslandı. Hücrelerin şekillerinde değişiklik gözlemlenmedi.

#### **3.2.6.1. Trizol ile Hücreden RNA İzolasyonu**

Hücreler 6'lık kuyulara belirlenen sayıda ekildikten, 24 saat sonra IC<sub>50</sub> ve IC<sub>50</sub> dozunun iki katı şeklinde Fucoidan maddesi verildi ve 48. Saatte Hücreden RNA izolasyonu Real Time PZR için yapıldı.

- 6'lık kuyulardaki medyum boşaltıldı.
- Soğuk 1XPBS'le (1 ml) iki kez yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 1 ml TRİZOL (Invitrogen, 15596-026) ilave edildi ve kuyucuklar iyice yıkandı, pipet ucuyla da iyice kazındı.
- Her kuyucuktaki hücreler 1.6 ml'lik ependorf tüplere alındı.
- 200 µl kloroform (Merck, 102431) eklendi ve renk değişene kadar 2-3 dk. sallandı.
- 12 000 x rpm'de 15 dk. +4 °C'de santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrasında üç faz oluştu, üstteki şeffaf kısım (süpernatant) yeni ependorf tüpe aktarıldı.
- 500 µl 2 -propanol (Merck, 100995) eklenip, sallanarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi.
- 12 000 x rpm'de 10 dk. +4 °C'de santrifüj yapıldı.

- Süpernatant RNA'ya zarar vermeden dikkatlice atıldı. %75'lik etanolden (Merck, 100993) 1 000 µl eklendi ve hafifçe sallandı (Bu aşama sonrası işlemler buz üzerinde yapıldı).
- 12 000 x rpm'de 5 dk. +4 °C'de santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atıldı ve alkolün uzaklaşması için 10-15 dk. oda sıcaklığında kapakları açık olarak bekletildi.
- 40 µl PZR -grade DEPC (Invitrogen, 46-2224) su eklenerek RNA pipetejla çözdürüldü.
- RNA'lar nanodropta ölçüldü, konsantrasyonları ve 260/230 saflık (OD) değerleri belirlendi.
- RNA diğer deneyler kullanılmak üzere etiketlenerek -80°C'de saklandı.

### 3.2.6.2. cDNA Protokolü

Real Time PZR için hücreden izole ettiğimiz RNA'ları cDNA sentez kiti (Kat. No: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit k1621) ile cDNA'ya çevirdik. Bunun için öncelikli olarak da RNA'ları sabit bir sayıya eşitledik (RNA konsantrasyonuna göre 1 veya 2 µg gibi).

#### Hesaplama işlemi aşağıdaki gibi yapıldı;

Örneğin izole ettiğimiz RNA değeri  $X=424.2$  ng/µl olsun. Bunu 1 µg'ma eşitlemek istiyorsak;

$$424.2 \text{ ng} = 0.424 \text{ µg}$$

(0.424'ü neyle çarparsam 1'e eşitlenir diye hesap yapılır)

$$0.424 \times 2,35 \approx 1.0001 \text{ µg}$$

$$2.35 \text{ µl} = \text{alınacak RNA miktarı}$$

Hesaplamaları yaptıktan sonra çalışmaya geçildi.

(Not: RNA ve kitin içinde bulunan malzemeler her zaman buzda bekletilmelidir.)

- Örnek sayısı kadar 0.2 ml'lik pzs tüp çıkartıldı.
- Her bir örnek için hesaplanan miktarda RNA sırasıyla pzs tüplere konuldu.

- Her bir örnek için hesaplanan miktarda su (kitin içinde mevcut) sırasıyla ependorf tüplere konuldu (örneğin RNA 2 µl ise 11 µl'ye tamamlayacak şekilde yani 9 µl su tüplere konur).
- Ayır bir temiz ependorf tüpün içinde aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı.

**Bir örnek için hazırlanacak miktarlar;**

- 5X Reaction Buffer = 4ul
- Ribolock™ RNAase İnhibitor (20u/ul)= 1ul
- 100 mM DNTP Mix= 2ul
- RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcritase (200u/ul) = 1ul
- Oligo (dT) 18 Primer = 1µl
- Hazırlanan mix örnek tüplerinin üstüne 9 µl olacak şekilde dağıtıldı.
- Toplam hacim 20 µl olacak (11 önceden vardı 9 µl mix ekledik toplam 20 µl oldu).
- 42 °C 60 dk. inkübasyona bırakıldı, Sonra 70°C de 5 dk. bekletildi. Spin atırıldı.
- Elde edilen cDNA'lar -80°C de saklandı. (cDNA'lar RT -PZR için 1/10 dilüe edildi).

**3.2.6.3. Beta Aktin, Bax, Bcl -2, Kaspaz -3, Kaspaz -9, Kaspaz -8, Cytochrome -c, Erk (Mapk1), Survivin ve VEGF- b Primerlerin Hazırlanması**

RT -PZR'da kullanılacak olan mRNA primerleri öncelikli olarak her gene özel olarak NCBI Primer Blast arayüzden tasarlandı (Tablo 3.4.) ve sonrasında ticari olarak temin edilerek aşağıda belirtilen şekliyle hazırlandı;

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

**Tablo 3.4.** Tez çalışmasında kullanılan primerlerin sekansları

Gen İsmi	NCBI Referans Sekans	Forward Primer (5' ->3')	Reverse Primer (5' ->3')
Beta actin (ACTB)	NM_001101.3	TTCCTGGGCATGGAGTCCT	AGGAGGAGCAATGATCTTGC
Bax	NM_001291428.1	GTCCAATGTCCAGCCCATGA	AGCTGAGCGAGTGTCTCAAG
Bcl -2	NM_000633.2	CGGGAGATGTCGCCCTGGT	GCATGCTGGGGCCGTACAGT
Cytochrome-c	NM_018947.5	GGAGCGAGTTTGGTTGCAC	GCTTGCCTCCCTTTTCAACG
ERK (MAPK1)	NM_002745.4	CAGGCTGTCCCAAATGCTG	ACACCGATGTCTGAGCACG
Survivin	NM_001012271.1	ATTCGTCCGGTTGCGCTTTC	GAAGTGGTGCAGCCACTCTG
VEGF- B	NM_003377.4	ATGGCCTGGAGTGTGTGC	GTGATGTCAGCTGGGGAGG
Kaspaz -3	NM_004346.3	AGTTTCGTGAGTGCTCGCAG	CTGAGGTTTGCTGCATCGAC
Kaspaz - 8	NM_001080124.1	CTGGGTGCGTCCACTTCTG	TGCTGGTGTCTGAAGTTCC
Kaspaz - 9	NM_001229.4	GGAGTCTTAGTTGGCTACTC GC	TCGACAACTTTGCTGCTTGC

### 3.2.6.4. Gradyent PZR

Real Time PZR'da kullanılacak olan primerlerimizin, uygun çalışma sıcaklığını bulmak için (Tablo 3.5.), aşağıdaki solüsyonlar (Tablo 3.6.) ve program (Tablo 3.7.) kullanılarak gradyent PZR yapıldı.

**Tablo 3.5.** Gradient PZR için kullanılan solüsyonlar ve miktarları

SOLÜSYONLAR (1 örnek için)	MİKTAR
NH4 SOLÜSYON (BUFFER)	2.5µl
MgCl	2.5µl
dNTP	0.5µl
FORWARD PRİMER	0.5µl
REVERSE PRİMER	0.5 µl
TAQPOLİMERAZ	0.2µl
SAF SU (NFW)	16.3µl
<b>Toplam Solüsyon</b>	<b>25 µl</b>

**Tablo 3.6.** Gradient PZR için program koşulları (34-38 cycle)

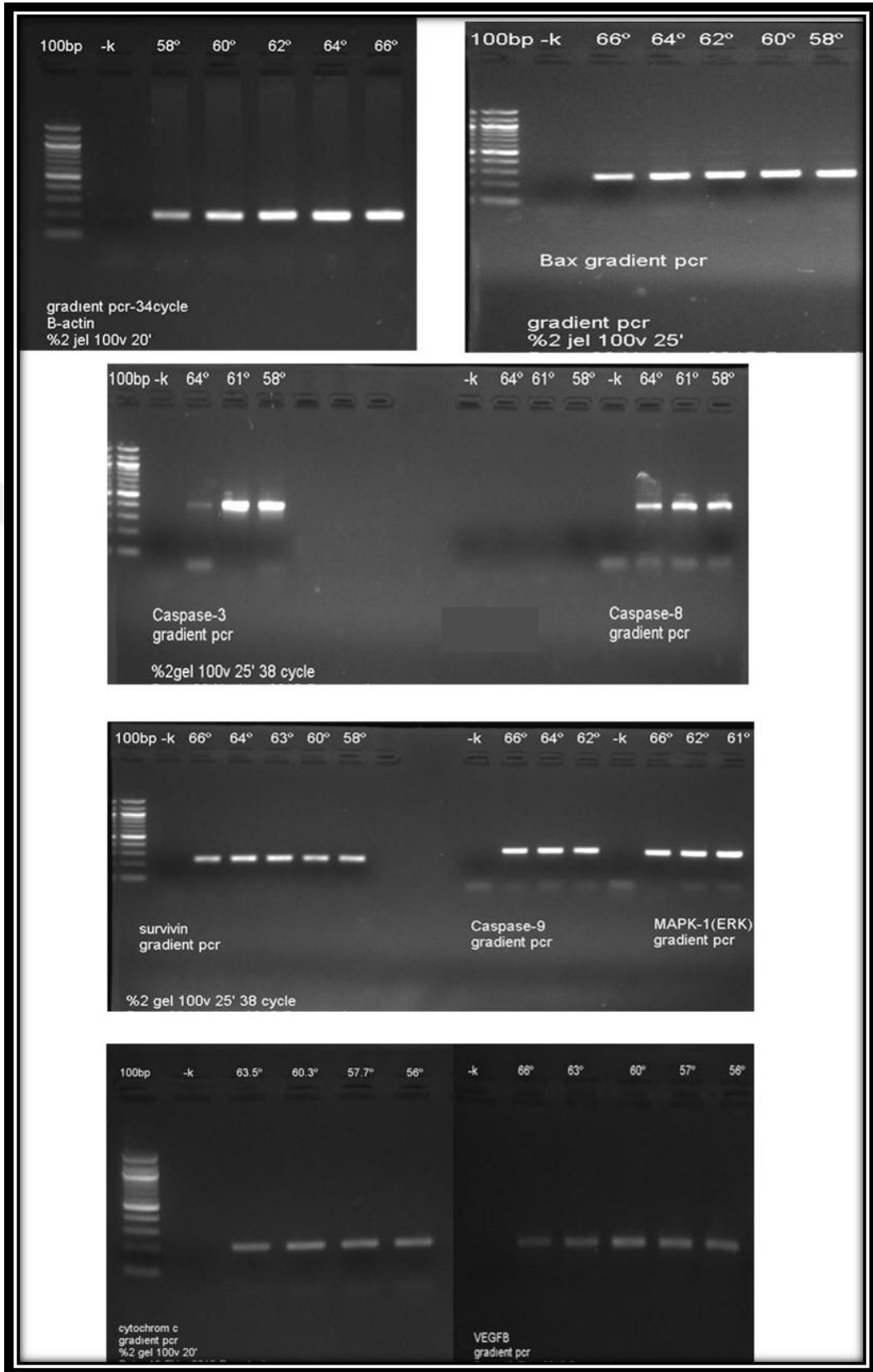
BAŞLANGIÇ (INITIAL)	95°C	5dk.
BOZULMA (DENATURATION)	95°C	30sn.
PRİMERLERİN BAĞLANMASI (ANNEALING OF PRİMERS)	58-66°C	1dk.
UZAMA (EXTENSION)	72°C	1dk.
SON UZAMA (FINAL EXTENSION)	72°C	5dk.

### 3.2.6.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR sonrası istenen bölgenin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için %2'lik agaroz jelde PZR ürünleri yürütüldü (Şekil 3.4.).

#### %2'lik Agaroz jel hazırlanması;

- 100 ml 1xTAE (Tris/Asetik Asit/EDTA) veya 1xTBE (Tris/Borik Asit/EDTA) tamponunun içine 2 gr agaroz (Invitrogen, 16500 -100g) konuldu.
- Mikrodalga fırında homojen olana kadar tutuldu.
- 2 µl ethidium bromide (Merck, 11608.0030) ilave edildikten sonra jel kalıba dökülerek donmaya bırakıldı.
- PZR ürünlerinden 5 µl alınarak 1 µl 3xLoading dye (Thermo, #R0611) ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi.
- Jel, 100 V'da yaklaşık 15-30 dk. yürütüldükten sonra U.V. transillüminatörde görüntülendi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Gradyent PZR sonrası AgaroZ Jel Elektroforez görüntüleri.

**Tablo 3.7.** Gradyent PZR sonrası alınan AgaroZ Jel Elektroforez görüntüleri sonucunda, genlerde çalışılan sıcaklık dereceleri.

RT -PZR için çalışılan genler	Gradient PZR sonucunda çalışılan sıcaklık dereceleri
Beta actin (ACTB)	58°
Bax	58°
Bcl -2	58°
Cytochrome -c	58°
Erk (MAPK1)	62°
Survivin	62°
VEGF-b	58°
VEGF -c	62°
Kaspaz -3 (Caspase -3)	58°
Kaspaz -8 (Caspase -8)	58°
Kaspaz -9 (Caspase -9)	62°

### 3.2.6.6. PZR- Clean up (Gel Ekstraksiyon)

Elektroforez sonrasında doğru yerlerde olan genlerimiz Macherey-Nagel™ 740609.50 jel ekstraksiyon kiti kullanılarak saf olarak jelden DNA izole edildi.

#### **Jel ekstraksiyon Protokolü:**

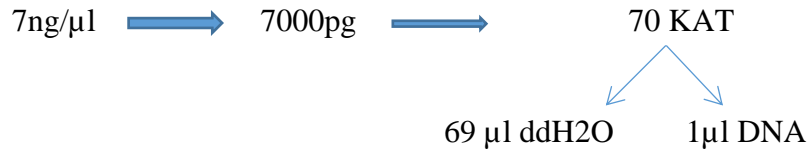
- Her tüpe 1 jel parçası için 200 ul binding buffer eklenir, vortekslenip, ısıtıcıda (heat blok) 50°'de 5-10 dk. beklendi.
- 11 000 g'de 30 sn. santrifüj yapıldı.
- Örnekler spin klona aktarıldı.
- Toplama tüpü boşaltıldı.
- 700 µI wash buffer eklendi.
- 11 000 g'de 30 sn. santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpü boşaltıldı.

- 700 µl wash buffer eklendi.
- 11 000 g'de 30 sn santrifüj yapıldı.
- Toplama tüpü boşaltıldı.
- 11 000 g'de 1 dk. santrifüj yapıldı.
- Kolon yeni tüpe aktarılıp 70°'de ısıtılmış Elution Bufferdan 15 µl spin kolonun ortasına eklendi. 5 dk. bekletildi.
- 11 000 g'de 3 dk. santrifüj yapıldı.
- Nanodropta ölçüldü.

### 3.2.6.7. Real -Time PZR için Standartların Hazırlanması

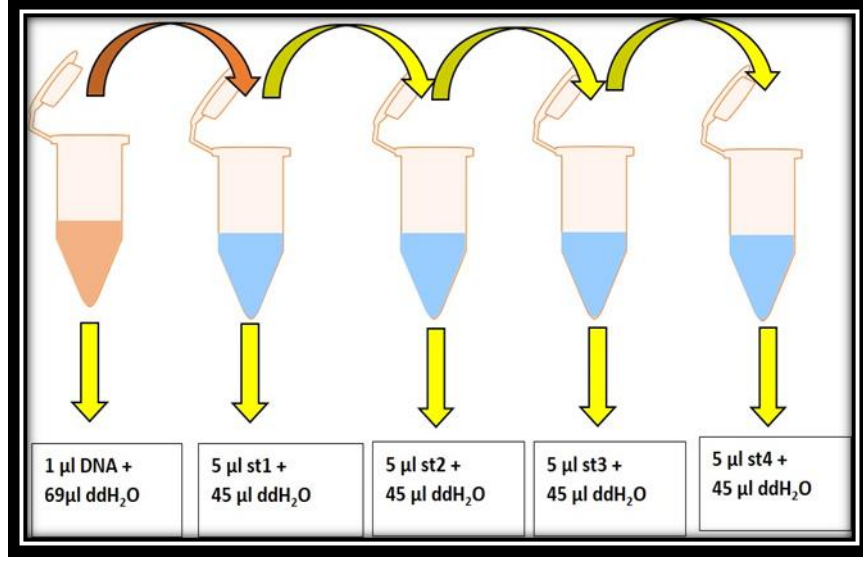
Jel ekstraksiyonu yapılan DNA'lardan standart hazırlanır. Primere ait jel ekstraksiyonu yaptıktan sonra spektrofotometrede konsantrasyon ve kalite ölçümü yapıldı.

#### Örnek: BETA -AKTİN geninin jel ekstraksiyon sonucu:



Şeklinde hesaplama ile sulandırma katsayısı bulundu. Sonrasında 1:10 miktarında seri dilüsyon yapıldı. Birinci standart hazırlandıktan sonra sırayla seyreltilerek oluşturulan dört standart, çalışmaya hazır hale getirildi (Şekil 3.5.).





Şekil 3.5. Real Time PZR için standartların hazırlanması.

### 3.2.6.8. Real-Time PZR

Real Time PZR’da kullanılan syber green ışıktan etkilendiği için çalışma alanı karanlık olmalı, buz metal bloklarda ve aşağıdaki miktarlarda (bir örnek için) çalışılmalıdır (Tablo 3.8.).

Tablo 3.8. Real Time PZR için kullanılan solüsyonlar ve miktarları.

SOLÜSYONLAR	MİKTAR
FORWARD PRİMER	0.5 ul
REVERSE PRİMER	0.5 ul
SYBR GREEN MASTER MİX	12.5µl
NUCLEASE FREE WATER	9 µl
cDNA	2.5 µl
TOPLAM	25 µl

**Real Time PZR'da, cihazda (Rotor-Gene Q (Green 1)) çalışılan gene göre program girildi;**

- Bozulma (Denatürasyon) için 15' 95 °C,
- Bağlanma (Annealing) 30',
- Uzama (Extention) 30' 72 °C, 45 döngüde (cycle) çalışıldı.

Aynı şekilde housekeeping gen olan Beta -aktin ile normalize edildi. Analizde okunan genlerin değerleri excel programında yerleştirilip oranlamaları, ortalama değerleri hesaplanıp varsa ekspresyon değişimine bakıldı.

### **3.2.7. xCELLigence Hücre Migrasyon Analizi**

Fuoidan ile muamele edilmiş olan 6A hücre hattının xCELLigence DP ile migrasyonu gözlemlendi. Proliferasyon deneyi sonrası uygun doz ve etki süresi için 16'lık CIM -plakalara ekim yapılarak uygulama sağlandı. Böylece Fuoidan'ın hücre migrasyonuna olan etki ölçümü gerçekleştirildi. Migrasyon (hücre göçü) testi öncesinde CIM -plakalara ekilecek hücre sayısını belirleme amacıyla öncesinde titrasyon analizi yapılmıştı. 6A hücre hattının titrasyon sonucuna bağlı deney yapıldı, Fuoidan dozları ise IC<sub>50</sub> ve IC<sub>50</sub> dozunun iki katı şeklinde hücrelere uygulanarak migrasyon analizi yapıldı. CIM -plakalara ekilmiş zamana ve Fuoidan dozlarına bağlı değişimleri izlenmiştir.

### **Deneyin basamakları aşağıda belirtildiği gibidir;**

- Hücreye harvest işlemindeki ilk basamaklar uygulanarak hücreler kaldırıldı. Hücre sayımı gerçekleştirildi.
- xCELLigence CIM -plaka'nın alt kısmına DMEM'den ( FBS'li ve FBS'siz) 160 µl her kuyucuğa eklenip, Plakanın üst kısmı alt kısmına eklenip üst kısmına 50 ul serumsuz medyum koyuldu ve 1 saat inkübatörde bekletildi.
- Sonrasında cihaza okutularak background alındı.
- Her hücre hattı için yapılan titrasyon sonucu belirlenen hücre sayısına göre, hücreler 50 µl içinde serumsuz medyumda ekildi.

- Her hücre hattı için E -plaka deney sonuçlarımızda tespit ettiğimiz IC<sub>50</sub> dozu ve IC<sub>50</sub> Fucoidan dozunun iki katı şeklinde madde 50 ul içinde serumsuz medyumda verildi.
- Ekimin ardından 30 dakika oda sıcaklığında bu CIM -plakalar bekletildi.
- Cihaza CIM -plakalar yerleştirildi ve cihaz program ayarlandıktan sonra çalıştırıldı.
- Ekim ardından hücrelerin zamana ve sayısına bağlı migrasyon analizi yapıldı.

Belirtilen dozların her biri 4'erli tekrar olacak şekilde analiz yapıldı. FBS'siz olan kuyular negatif kontrol olarak deneye dahil edilmiştir.

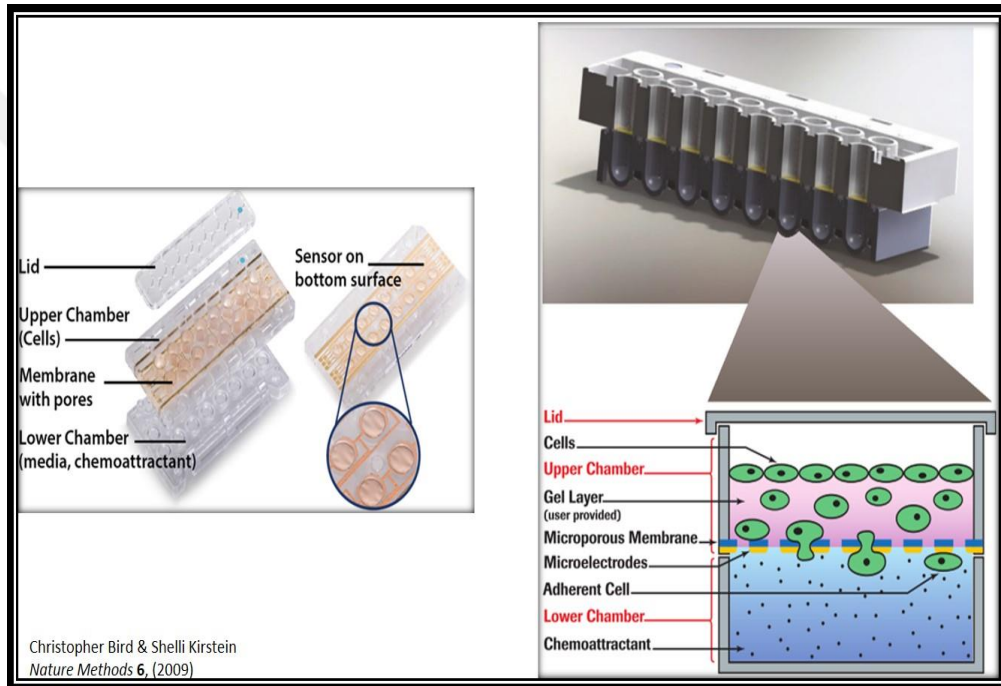
### **3.2.7.1. xCELLigence CIM-PLAKA Titrasyon Analizi**

Fucoidan ile muamele edilen hücreleri xCELLigence DP ile migrasyonunu gözlemledik. Proliferasyon deneyi sonrası uygun doz ve etki süresi için 16'lık CIM plakalara ekim yapılarak uygulama sağlandı (Şekil 6.). Böylece Fucoidan'ın hücre migrasyonuna olan etkisi ölçüldü. Migrasyon (hücre göçü) testi öncesinde CIM plakalara ekilecek hücre sayısını belirleme amacıyla titrasyon analizi yapıldı. Her hücre hattının çoğalma süresi farklı olduğundan 6A hücre hattı için yapılacak ekimler hücrelerin çoğalma sürelerine bağlı belirlendi. CIM -plakalara hızlı büyüyen hücre hattından çok fazla ekim yapılırsa daha madde uygulaması yapılmadan hücre ölümleri olacağından o kuyucu için en uygun sayının kaç olduğu belirlenmesi hedeflendi. Bundan dolayı farklı sayıda hücreler CIM -plakalara ekilerek zamana bağlı değişimlerini izledik.

#### **Deneyin basamakları aşağıda belirtildiği gibidir:**

- Hücreye harvest işlemindeki ilk basamaklar uygulanarak hücreler kaldırıldı ve hücre sayımı gerçekleştirildi.
- xCELLigence CIM -plaka'nın alt plakaya DMEM'den ( FBS'li ve FBS'siz) 160 µl, her kuyucuğa eklenip, plakanın üst kısmı alt kısmına eklenip üst kısmına 50 ul serumsuz medyum koyuldu ve 1 saat inkübatörde bekletildi sonrasında cihaza okutularak arka plan (background) alındı.

- 16 kuyulu xCELLigence CIM-plaka'lara ikişer tekrarlı hem FBS'li medyum hem de FBS'siz medyum için 80 000, 40 000, 20 000 ve 10 000 sayısında hücreler ekildi.
- Ekimin ardından 30 dakika oda sıcaklığında bu CIM -plakalar bekletildi.
- Cihaza CIM -plakalar yerleştirildi ve cihaz programı ayarlandıktan sonra çalıştırıldı.
- Deneyin bitiminde hücrelerin proliferasyonlarındaki farklılıklarına bağlı olarak bir sonraki deney için en uygun hücre sayısı belirlendi.



Şekil 3.6. Hücre migrasyon analizi için kullanılan xCELLigence CIM -Plaka aparatları.

### 3.2.7.2. Fucus Vesiculosus (Fucoïdan) Muamelesi

Ticari olarak satın alınan *Fucoïdan from fucus vesiculosus* (Sigma, F5631) 2 mg tartılıp 0.5 ml medyum (DMEM) içinde çözdürüldü. Doz aralığının belirlenmesinde ki etkili faktör, geniş aralıkta *Fucus vesiculosus* (Fucoïdan) uygulaması ile en yüksek dozdan, en düşük doza kadar verilen Fucoïdan'ın, 6A hücre hattı üzerindeki değişimin tespiti yapıldı (Bkz. Tablo 3.3.).

### 3.2.8. Apoptoz Deneyi (CASPASE -3 ACTIVITY ASSAY)

Kaspaz -3 aktivitesi apoptozu doğrudan ilgilendirir. Bu nedenle Caspase -3 activity Assay Kit (Roche, 120129522001)' de bulunan, protokol uygulanarak 6A hücre hattında ki apoptoz oranı gözlemlendi. Analiz ise aşağıda verilen protokol basamakları uygulandıktan sonra yapıldı.

#### 3.2.8.1. Örnek Hazırlığı

- Apoptoz analizi için yaklaşık 2 milyon hücre gerekmektedir.
- 6' lık kuyuda bulunan hücreler öncelikle 2 kez 1 ml 1X PBS ile yıkandı.
- Daha sonra 500 ul tripsin eklenip 37°C'de inkübatöre kaldırıldı.
- 5 dakika sonra hücrelerin kalktığı mikroskopta bakılarak gözlemlendi.
- Kalkan hücreler, her kuyu için 1 ml medyum ile 1.6 ependorf tüplere toplandı.
- 1 100 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılır. Pellette hücreler kaldı.
- Üzerine 1 ml soğuk 1X PBS eklendi ve hücreler pipetajla yıkandı.
- 300 g'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Pellette hücreler kaldı.
- 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.
- İstenirse direkt analize geçilir veya 6 ay -20°C'de saklanabilir. Biz çalışmamızı direkt analiz yaparak gerçekleştirdik.

### 3.2.8.2. Solüsyonların Hazırlanması

- **Coating Buffer (10x):** 1x yapmak için 1 ml coating buffer, 9 ml ddH<sub>2</sub>O ile çözüldü.
- **Anti-Caspase-3 (20x):** Kullanmadan hemen önce bu antibody 1:20 oranında coating buffer ile seyreltildi.
- **Blocking buffer:** 25 ml şişesinde kullanıma hazırdır.
- **Incubation buffer (5x):** 1x yapmak için 50 ml incubation buffer, 200 ml ddH<sub>2</sub>O ile sulandırıldı (+4 °C de saklanır).
- **DDT (100x):** 1x yapmak için 10 µl DDT, 990 µl incubation buffer ile çözüldü.
- **Substrat solüsyon (20x):** 1x yapmak için 1:20 oranında DDT ile sulandırıldı.
- **AFC solüsyon:** 1 mM solüsyon, 1x substrat solüsyon ile dilüsyonları hazırlanarak kullanıldı.

### 3.2.8.3. MTP’i Kaplama (MTP: Microtiter Plate)

- Uygulama yapılacak her kuyucuğa 100 ul anti -Caspase -3 Coating solution eklendi.
- MTP (Microtiter Plate) yapışkan bir folyo kapak ile sıkıca kaplandı ve 37°C’de 1 saat inkübe edildi.
- Coating solüsyonu çekildi. Kuyucuklara 200 ul Blocking buffer eklendi. MTP yapışkan kapak ile sıkıca kapatıldı. 15-25°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Blocking buffer tamamen çekildi. Kuyucuklar 3 kez 200 ul 1X Incubation buffer ile yıkandı.

#### 3.2.8.4. Proteaz Aktivite Analizi

- Kuyucuklara 100'er ul örnekler ve pozitif kontrol eklendi. MTP'in üzeri yapışkan folyo ile kaplandı. 1 saat 37°C'de inkübe edildi.
- Örnekler tamamen çekildi. Kuyucuklar 3 kez 200 ul 1X Incubation buffer ile yıkandı.
- Kuyucuklara 100 ul 1X Substrate solüsyon eklendi.
- Florometrik okuma yapıldı. Buna da T0 dendi. Okuma için excitation filter 370-425 nm ve emisyon filter 490-530 nm. (maximaex: 400 em: 505)
- MTP üzeri yapışkan folyo ile sıkıca kapatıldı.
- 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
- 2 saat sonra tekrar ölçüm yapılır. Buna da T1 dendi. T1 deki değişim hesaplandı. Yorum: Eğer değer çok düşükse 1 gece 37°C'de inkübe edilebilir.

#### 3.2.8.5. Kaspaz -3 Aktivite Analiz

- AFC bu bölümde taze olmalıdır.
- Aşağıdaki şekilde Substrate Solution ile dilue edildi.
- 50 mikromolar için; 25ul AFC + 475ul Substrate Solution

#### **Bu karışımdan sonra standartlar hazırlandı:**

- 50 mikromolar standart için: 250 ul AFC
  - 25 mikromolar için: 125 ul AFC + 125 ul Substrate Solution
  - 10 mikromolar için: 50 ul AFC + 200 ul Substrate Solution
  - 1 mikromolar için: 5 ul AFC + 245 ul Substrate Solution
  - 0.5 mikromolar için: 5 ul AFC + 495 ul Substrate Solution
  - 0 mikromolar için: 200 ul Substrate Solution
- Daha sonra bu standartlardan her birinden 2 kuyu olacak şekilde 100 ul eklendi (Şekil 3.7.).
  - Florometrik ölçüm yapıldı. Uyarma filtresi (Excitation filter): 370-425, yayma filtresi (emission filter): 490-530.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bl	Sd	P1									
B	Bl	Sd	P1									
C	Sa	Se	P1									
D	Sa	Se	P1									
E	Sb	Sf										P20
F	Sb	Sf										P20
G	Sc	P0										P20
H	Sc	P0										P20

Şekil 3.7. Kaspaz -3 aktivite deneyi için plaka dizaynı.

**Plaka 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..- P20= örneklerdir.

**3.2.8.6. Sonuçların Analizi**

Florometrik okuma ile alınan sonuçlar olan T0 ve T1 değerleri kullanılarak aşağıda verilen 1. denkleme göre her örnek için ayrı ayrı ΔFU değerleri hesaplandı.

**1. Denklem**

$\Delta FU = (\text{Sample FU at T1} - \text{Blank FU at T1}) - (\text{Sample FU at T0} - \text{Blank FU at T0})$ . Daha sonra standartların florometrik okuma değerleri excele girildi, grafik çizilerek grafiğin eğimi hesaplandı.

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

**2. Denklem**

Kaspaz -3 aktivitesi=  $(\Delta FU/120)/\text{eğim}$



### 3.2.9. Protein İfadesinin Belirlenmesi

#### 3.2.9.1. Hücreden Protein İzolasyonu

Flasklarda yeterli yoğunluğa ulaşmış hücreler gereken protokol ile flasktan kaldırıldı ve hücre sayımı yapıldı. Toplam protein izolasyonu için kuyu başına belirlenen sayıda hücre hücre tipine göre 6'lı kuyu-plakalara (well-plate) ekildi. 24 saat ardından Fucoidan belirli dozlarda uygulandı. 24 saat daha inkübe edildikten sonra izolasyonu yapıldı.

- Hücreler üzerine soğuk 1X PBS (1 ml) ile 2 kez yıkandı, kazıyıcı (cell scrapers Kat. No: 89260-222) yardımıyla petri yüzeyinden hücreler kaldırıldı. Ependorf tüpe alındı.
- Soğuk santrifüjleme işlemiyle +4 derecede 4 000 rpm'de 4 dak. Santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- Hücre pelleti elde edildi. Toplam protein içeriği eldesi için hücre özütleme tamponu (RIPA (150 ul ve Proteinaz inhibitörü (1.5 ul)) içerisine alınan hücreler 2.5 dakika boyunca sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Sonikasyon sonrası berrak olmalıdır (RIPA=Katalog no: SC24948A).
- 15 000 rpm'de +4 derecede 5 dakika santrifüjlenen örneklerin süpernatantı yeni bir tüpe alındı ve protein hazırdır. Saklanma koşulu 20°C'dir.

#### **Proteinlerin Boyanması:**

1 örnek için:

150 ul protein için

50 ul= 4X Sample Buffer

5 ul= 2 -Merkaptoetanol

- Hazırlanan mix içeriği, protein ependorflarına 55 ul olarak dağıtıldı ve vortekslendi.
- 95°C'de 5 dakika bekletildi. Proteinler SDS -PAGE jeli için yüklemeye hazır hale gelmiş oldu.

### 3.2.9.2. Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini

- Protein miktar analizi Bradford yöntemi kullanıldı (Bio-Rad).
- Proteinler Coomassie brilliant blue G250'ye bağlandı ve tayini bu sayede yapıldı. Normalde protone halde kırmızı/kahverengi renkte olan boya protein ile bağlanınca mavi renkte görüldü. Bu değişim Varioskan Flash'da 595 nm'de absorbans ölçülerek belirlendi (Thermo Electron North Ame).
- Bovine Serum Albumin (BSA) 1.5 ug aralığında alınarak standartlar oluşturuldu.
- Daha sonra örneklerde 2 ul olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve üzerlerine 100 ul Bradford solüsyonu eklenip karanlıkta 5 dakika beklendikten sonra 595 nm de ölçüm yapıldı.

### 3.2.9.3. SDS-PAGE Jel Hazırlanması

SDS -PAGE (sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforez (PAGE)) proteinlerin moleküler büyüklüğünü analiz etmek için kullanılmaktadır. Poliakrilamid jellerle yapılan elektroforez, hem moleküler ayırım hem de elektroforetik harekete dayalı olduğundan örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmalarına yol açar (111).

Jel hazırlamak için öncelikle gerekli solüsyonlar hazırlandı. Bu solüsyonların hazırlanması Tablo 3.9.'da ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

**Tablo 3.9.** Western Blot jeli için gerekli solüsyonların hazırlanması.

<b>%30 ACA (bis-akrylamide)</b>	58 gr Acrylamide + 2 gr N,N,metilen Bisacrylamide + 200 ml dW
<b>2M Tris HCL</b>	72 gr Tris + 250 ml dw karışımı hazırlanır ve iyice çözüldükten sonra pH: 8.8'e ayarlanır.
<b>0.5M Tris HCL</b>	6 gr Tris + 80 ml dw karışımı hazırlanır ve iyice çözüldükten sonra pH:6.8'e ayarlanır.
<b>%10 SDS (sodyumdodesilsülfat)</b>	5 gr SDS tartılıp 50 ml'ye dw ile tamamlanır.

**Tablo 3.9.** Western Blot jeli için gerekli solüsyonların hazırlanması (devam).

<b>%10 APS (amonyumpersülfat)</b>	25 mg APS + 250 µl dw karışımı hazırlanır. Bu karışım uzun süre dayanmaz o yüzden hemen hazırlayıp kullanmalıyız.
<b>1xTransfer Buffer</b>	28.8 gr Glycine + 6.04g Tris Base *1.6 Litre DH2O'da çöz + 10ml (%10'luk SDS) + 200ml Methonol + 190ml DH2O =2 Litre.
<b>1xRunning Buffer</b>	28.8 gr Glycine + 6.04g Tris Base *1.6 Litre DH2O'da çöz + 20ml (%10'luk SDS) + 380ml DH2O =2 Litre.
<b>1xTBS - T</b>	8.8 gr Tris Base + 1.2 gr NaCl + 500 ul Tween20 + 700 ml DH2O en son ph: 7.4 olarak sabitlenir ve 1 000ml'ye tamamlanır.

- Solüsyonlar hazırlandıktan sonra yürütme (running) jel için Tablo 3.9.'daki, hizalama (stacking) jel için Tablo 3.10.'daki oranlar ile iki ayrı jel karışımı hazırlandı.
- Jel hazırlanırken %10'luk jel oranları kullanıldı.

**Tablo 3.10.** Yürütme (Running) jel oranları.

<b>Kullanılan Malzemeler</b>	<b>Running Gel (%7.5)</b>	<b>Running Gel (%10)</b>	<b>Running Gel (%12.5)</b>	<b>Running Gel (%15)</b>
<b>Distile Su (dw)</b>	6 500 ul	5 500 ul	4 500 ul	3 500 ul
<b>%30 ACA</b>	3 000 ul	4 000 ul	5 000 ul	6 000 ul
<b>%10 SDS</b>	120 ul	120 ul	120 ul	120 ul
<b>2M Tris(Ph:8.8)</b>	2 250 ul	2 250 ul	2 250 ul	2 250 ul
<b>%10 APS</b>	160 ul	160 ul	160 ul	160 ul
<b>TEMED</b>	16 ul	16 ul	16 ul	16 ul

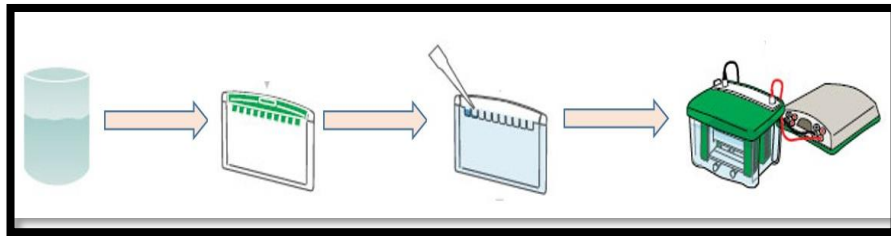
**Tablo 3.11.** Hizalama (Stacking) jel oranları.

<b>Distile Su</b>	2 700 ul
<b>%30 ACA</b>	660 ul
<b>0.5 M Tris (Ph:6.8)</b>	1 000 ul
<b>%10 SDS</b>	40 ul
<b>%10 APS</b>	50 ul
<b>TEMED</b>	10 ul

Not: Tablo 3.10. ve Tablo 3.11.'deki miktarlar 2 jel dökmek istediğinizde geçerlidir. Tek jel veya daha fazla dökmek istediğinizde uygun katsayı ile çarpınız.

Öncelikle yürütme (running) jeli hazırlandı.

- Belirtilen oranlarda çözeltiler birleştirildi, ancak APS ve TEMED polimerleşmeyi sağlayan ajanlar olduklarından dolayı, karışıma en son eklendi.
- Jel karışımı iki camdan oluşan kasetin arasına dikkatlice akıtıldı.
- Üzerine 2 -propanol eklendi.
- Jel kurduktan sonra propanol akıtıldı.
- Hazırlanan hizalama (stacking) jel karışımı donmuş haldeki yürütme (running) jelin üzerine akıtılarak tarak takıldı.
- İyi kurduktan sonra tarak çıkartıldı ve jel yürütme solüsyonu (running buffer) ile doldurulmuş tankın içine alındı (Şekil 3.8.).



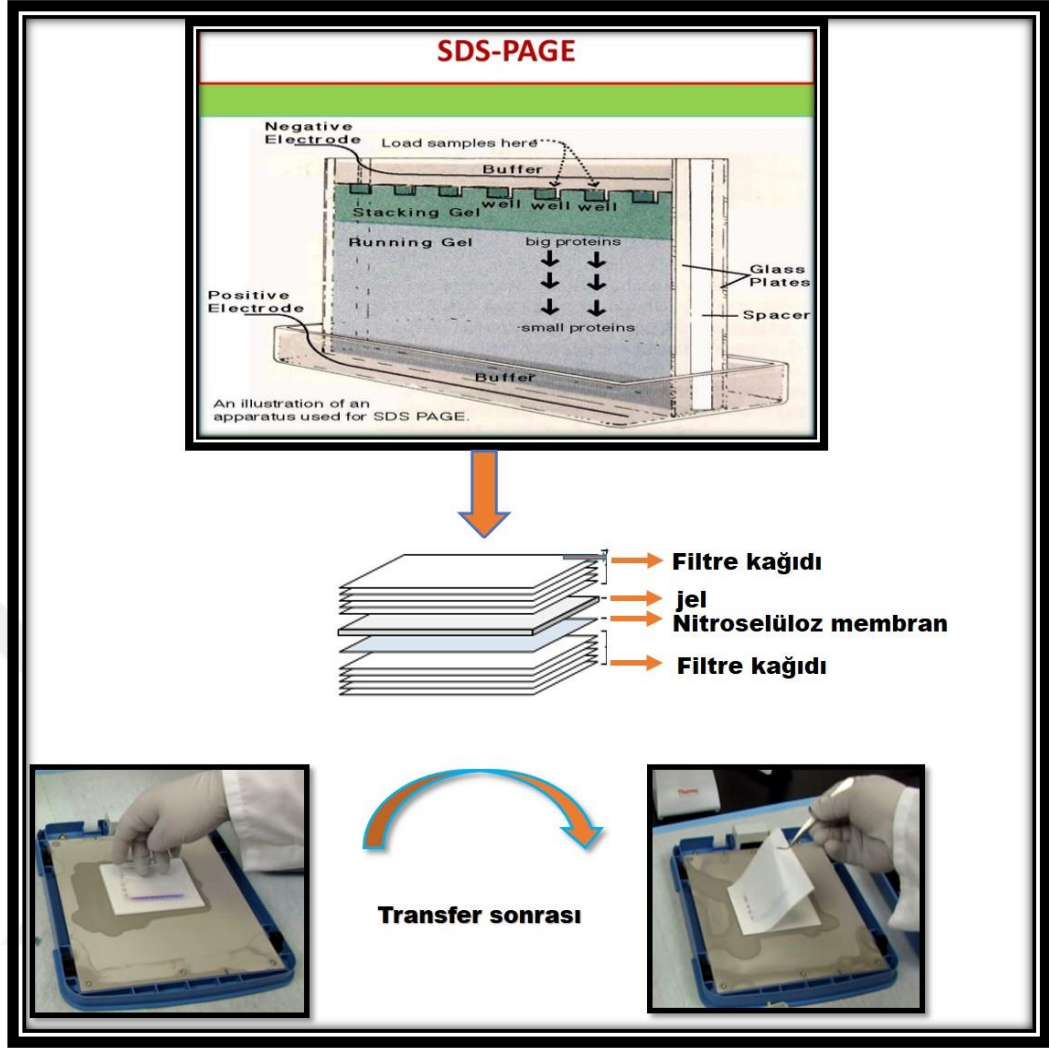
**Şekil 3.8.** Jel döküm işleminden sonra tanka aktarılma işleminin genel gösterimi.

#### **3.2.9.4. Protein Örneklerin Hazırlanması**

- İzole edilen proteinlerin jele yükleneceği miktarı immunoblotlama yöntemi için Bradford sonuçlarına göre standart eğriye bağlı olarak tespit edildi.
- Ardından 1:3 oranında yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95°'de 5 dak. tutuldu ve buza alındı.

#### **3.2.9.5. SDS -PAGE Jelin Yürümesi ve PVDF Membrana Transfer**

- Örnekler protein belirteçler ile birlikte 95 V'da 5', 240 V'da 17 dakika SDS içeren yürütme tamponunda (1XRunning Buffer) yürütüldü.
- Jel üzerinde olan protein örnekleri PVDF membrana transfer (1X Transfer Buffer) edildi (Şekil 3.9.). Sonrasında, yağsız süt tozu ile 30' oda sıcaklığında vortekslendi (50 ml 1XTBS-T içeren Tris Tuz Solüsyonu için 1.25 gr. süt tozu).



Şekil 3.9. Proteinlerin yürütme tampon çözeltisinde yürütülmesinden, transfer aşamasına kadar genel gösterimi.

### 3.2.9.6. İmmunoblotlama için Birincil Antikorla Muamele

- Proteinleri jelden membrana aktardıktan sonra, membran TBS-T'ye konuldu.
- Falkonda 1.25 gr. süttozunun üzerini TBS-T ile 50 ml'ye tamamlayarak süttozu çözeltisi hazırlandı (%2.5'luk).
- Membranı TBS-T'ten alarak süttozu çözeltisi koyduğumuz kutunun içine konuldu.
- Membran süttozu çözeltisinde oda sıcaklığında çalkalayıcıda (shaker) 1 saat bekledi.

- Aynı bir falkonda her antikor (antibody) için Tablo 3.12.'de gösterilen oranlarda olacak şekilde birincil antikor karışımı hazırlandı (%2.5'luk süttözünde).
- 1 saat beklettiğimiz membranımızın kutusundaki süttözu çözeltisini alındı ve 4 ml birincil antikor çözeltisinden eklendi.
- Membran çözeltisiyle birlikte paketlenildi.
- +4C°'de 1 gece (overnight) çalkalayıcıda bekledi. (Bu aşamadaki zaman ve sıcaklık antikor (antibody) göre değişebilir).

**Tablo 3.12.** Çalışmada kullanılan birincil antikorlar.

BİRİNCİL ANTİKOR/ORAN	İKİNCİL ANTİKOR /ORAN	MOLEKÜLER AĞIRLIK	UYGULAMA ALANLARI	KATALOG NO
<b>B-Actin = 1/2 500</b>	Mouse: 1/4 000	43 kDa	WB, IHC, ELISA	B-Actin Antibody (C4):sc-47778- Santa Cruz
<b>Survivin =1/100-1/500</b>	Mouse: 1/4 000	17 kDa	WB, IHC, ELISA	Survivin Antibody (D-8): sc-17779- Santa Cruz
<b>Caspase -3= 1:1 000</b>	Rabbit: 1/4 000	17, 19, 35 kDa	W,IP Endogenous	Caspase-3 (8G10)- Cell Signaling
<b>Phospho- p44/42 MAPK (Erk1/2)=1/1 000</b>	Rabbit: 1/4 000	42, 44 kDa	W, IP, IF-IC, F Endogenous	Phospho-p44/42MAPK (Erk1/2)- Cell Signaling
<b>Bcl-2 = 1/1 000</b>	Rabbit: 1/4 000	26 kDa	W,IP Endogenous	Bcl-2 (50E3)- Cell Signaling
<b>Caspase -8= 1/1 000</b>	Mouse: 1/4 000	18, 43, 57 kDa	W,IP Endogenous	Caspase-8(1C12)- Cell Signaling
<b>Caspase -9= 1/1 000</b>	Mouse: 1/4 000	47,37,35 kDa (H) 51, 39,37 kDa (R,M)	W, Endogenous	Caspase-9(C9)-Cell Signaling
<b>Bax = (starting dilution 1/200, dilution range1:100-1:1 000),</b>	Mouse: 1/4 000	23 kDa.	W, IP, IF-IC,	Bax (P-19): sc-526g- Santa Cruz
<b>VEGF = (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1 000</b>	Rabbit: 1/4 000	monomer:21 kDa. dimer: 42 kDa.	ELISA, IF, IHC, IHC-P, IP, and WB	VEGF (A-20): sc-152-Santa Cruz
<b>Cytochrome-c Antibody=1/1 000</b>	Rabbit: 1/4 000	14kDa	W,IHC-P Endogenous	Cytochrome-c Antibody #4272- Cell Signaling

### **3.2.9.7. Yıkama**

- Paketler açılarak içindeki membran TBS -T ile dolu kaba alındı.
- Çalkalayıcıda 3'er dk. 3 kez TBS -T değiştirerek yıkandı.

### **3.2.9.8. İkincil Antikorla Muamele**

- Stok süttözu çözeltisinden alınıp 1/4 000 oranında ikincil antikor çözeltisi hazırlandı.
- Yıkama işleminden sonra membran 4 ml ikincil antikor çözeltisine (1XTBS-T) konuldu.
- Oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda bekletildi.

### **3.2.9.9. Yıkama ve Görüntüleme**

- Membran 3 defa 3'er dk. TBS-T ile yıkandı.
- Temiz bir yüzeye sera streç yayararak düz zemin oluşturuldu.
- Bu arada ECL (enhanced chemiluminescence) 150:150µl oranında ECL A ve ECL B ile enzim çözeltisi hazırlandı (ECL A Cat No:100003037, ECL B Cat No: 100003038) (İnvitrogen).
- Membranın üzerine karanlık ortamda enzim çözeltisi konularak 1 dk. bekletildi. (Burada kullandığımız enzim çözeltisi ikincil antikorlara bağlanarak ışımaya olmasını sağlar).
- Membranları CD poşeti arasına alınarak görüntülemeye hazır hale getirildi.
- Membranların Görüntülenmesi ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad) cihazında yapıldı.

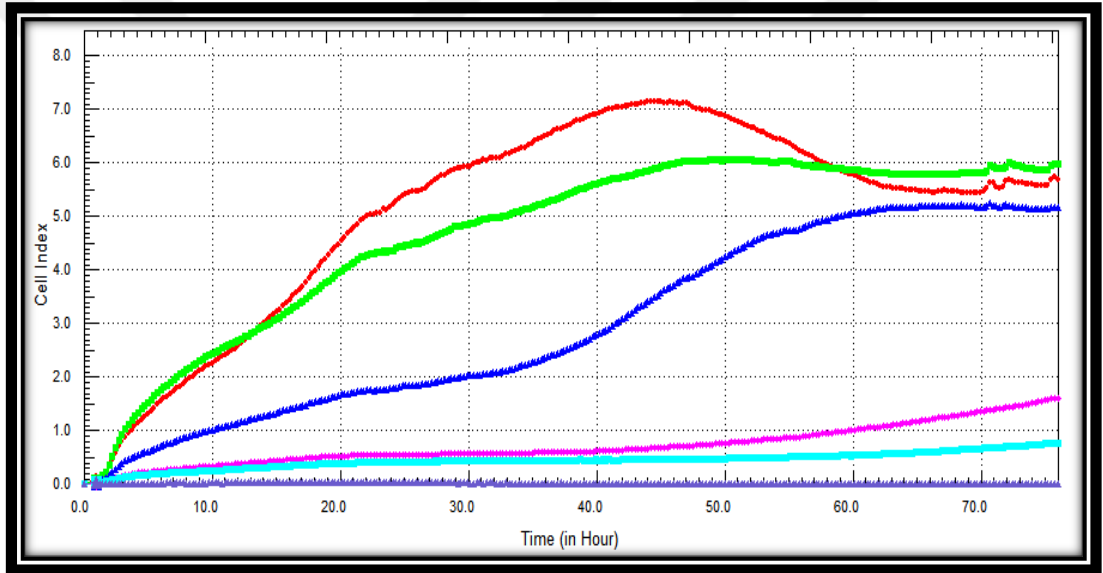


## 4. BULGULAR

### 4.1. 6A Hücre Hattının Titrasyon Grafiği

#### 4.1.1. 6A Hücresinin xCELLigence E -Plaka Titrasyon Grafiği

Öncelikle xCELLigence cihazının platelerinin herbir kuyucuğuna ne kadar hücre ekileceğini tespit etmek için için Fucoidan uygulamaksızın, sadece hücreler ekilerek titrasyon deneyi yapıldı (Şekil 4.1.).



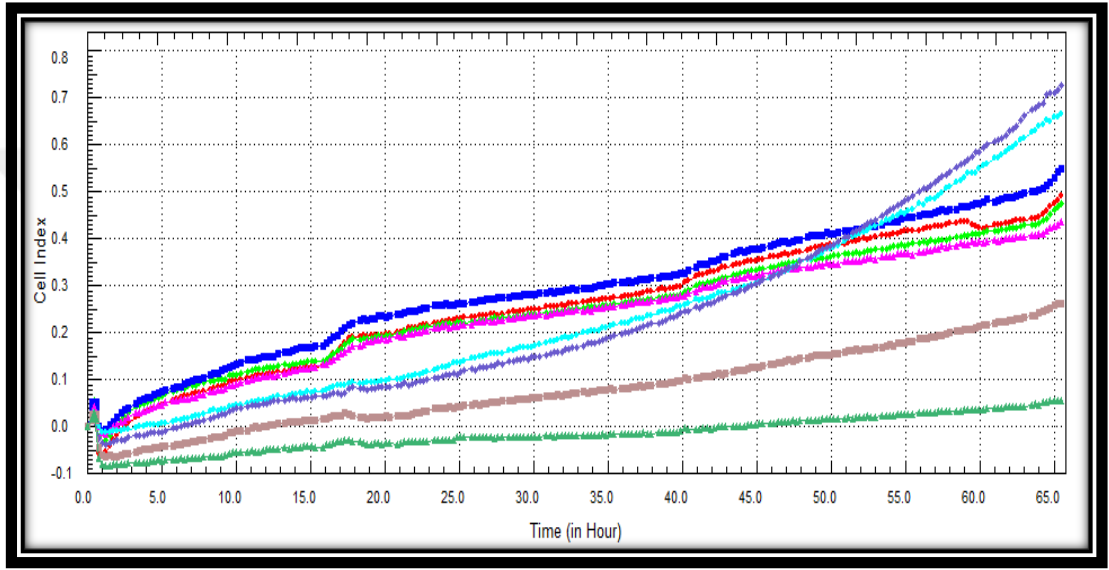
Şekil 4.1. 6A hücre hattı için E -Plaka ile yapılan titrasyon deney grafiği.

6A hücre hattı için E -Plaka ile yapılan titrasyon deney grafiğinde, her renk farklı sayıda hücreyi ifade eder. **Kırmızı:** 20 000, **Yeşil:** 15 000, **Lacivert:** 10 000, **Pembe:** 5 000, **Turkuaz:** 2 500 hücreyi göstermektedir (Şekil 4.1.).

Bu analiz sonucu en iyi büyüme grafiğinin kuyucuk başına, 10 000 -15 000 hücre arası değer olan, 12 500 hücre olacağı belirlendi. Çünkü; 20 000 hücre/kuyucuk ekildiğinde hücre yoğunluğu çok hızlı bir şekilde, 5 000 hücre/kuyucuk ekildiğinde ise çok yavaş arttığı görüldü. Bu deney grafiği sonucunda, Fucoidan uygulama saatinin, 24. saat olduğuna karar verildi.

#### 4.1.2. 6A Hücresinin xCELLigence CIM -Plaka Titrasyon Grafiği

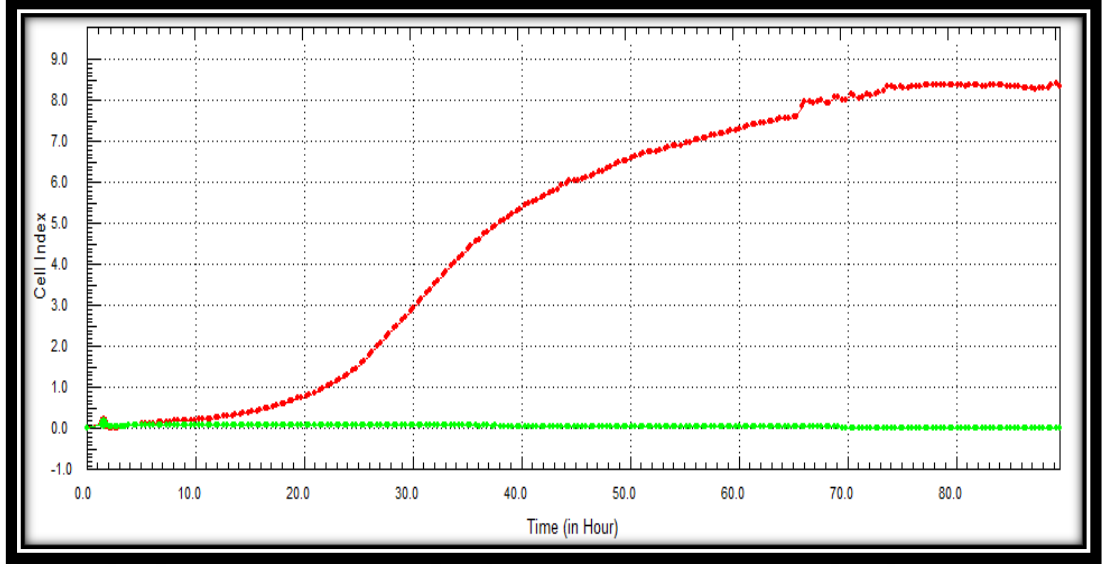
xCELLigence cihazının plakalarının her bir kuyucuğuna ne kadar hücre ekileceğini tespit etmek için Fucoidan uygulamaksızın, sadece hücreler ekilerek hücre titrasyon deneyi yapıldı (Şekil 4.2.). Hücre migrasyonu için FBS'li ve FBS'siz ortama hücre ekimi yaparak, kuyucuk başına ekeceğimiz hücre sayısına bağlı FBS'siz ortamda geçişin olmaması, FBS'li ortamda da geçişin olması beklediğimiz durumdur.



Şekil 4.2. 6A hücre hattı için CIM -Plaka ile yapılan titrasyon deney grafiği.

6A hücre hattı için CIM -plaka ile yapılan, titrasyon deney grafiğinde, her renk farklı sayıda hücreyi ve farklı FBS'li, FBS'siz ortamı ifade eder. **Kırmızı:** 80 000 hücre FBS'siz, **Yeşil:** 40 000 hücre FBS'siz, **Lacivert:** 20 000 hücre FBS'siz, **Pembe:** 10 000 hücre FBS'siz, **Turkuaz:** 80 000 FBS'li, **Koyu mavi:** 40 000 FBS'li **Kahverengi:** 20 000 FBS'li, **Koyu yeşil:** 10 000 FBS'li hücreyi göstermektedir (Şekil 4.2.).

Yaptığımız titrasyon deney sonucunda kuyucuk başına ekeceğimiz hücre sayısının yetersiz olduğunu, 160 000 hücre ekerek deneyi tekrarlamamızın uygun olacağını düşünerek, deneyimizi tekrarladık (Şekil 4.2.).



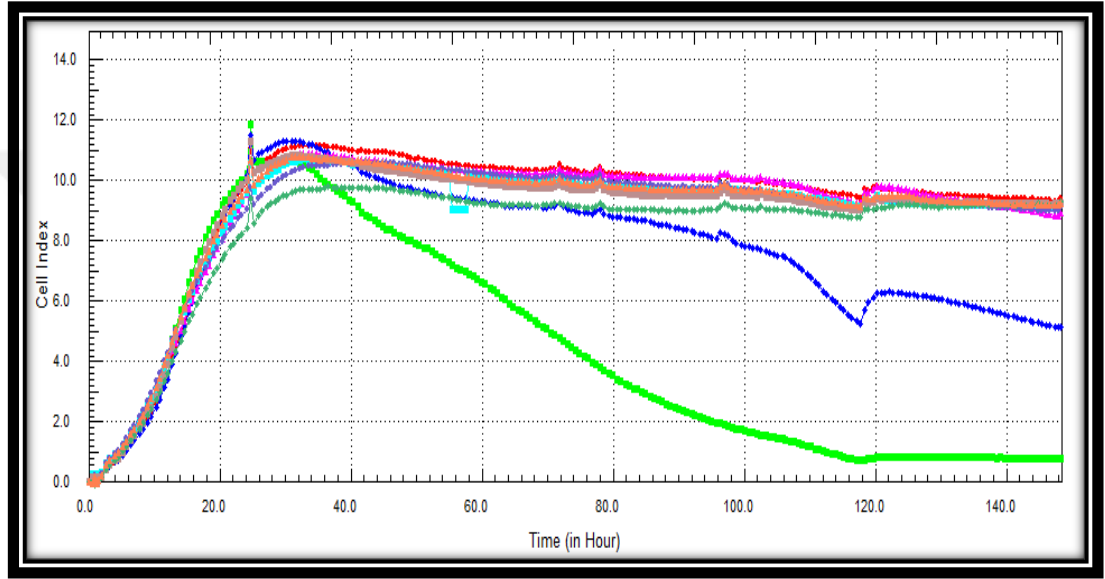
**Şekil 4.3.** 6A hücre hattı için CIM -Plaka ile yapılan titrasyon deney grafiği.

6A hücre hattı için CIM -plaka ile yapılan, titrasyon deney grafiğinde, her renk farklı sayıda hücreyi ve farklı FBS'li, FBS'siz ortamı ifade eder. **Kırmızı:** 160 000 FBS'li, **Yeşil:** 160 000 FBS'siz hücreyi göstermektedir (Şekil 4.3.).

Tekrarladığımız hücre migrasyonu, titrasyon deney sonucunda 160 000 hücre ektiğimizde FBS'siz ortamda geçişin olmadığını, FBS'li ortamda ise hücre geçişi ve zamana bağlı hücre indeks (cell index) seviyesinin optimum düzeyde olduğunu gördük. Bu sebeplerden ötürü 160 000 hücre/kuyucuk ile deneylerimizi gerçekleştirdik (Şekil 4.3.).

## 4.2. 6A Hücre Proliferasyonu Üzerinde Fucus Vesiculosus (Fucoïdan) Etkisinin Sonucu

6A hücre hattı için yapılan titrasyon deney sonucunda, 12 500 sayıda hücre ekimini uygun bulduk (Bkz. Şekil 4.1.). xCELLigence cihazının E -plakalarına 12 500 sayıda hücre ekimi yaptık. 24. saatte Fucoïdan uyguladıktan sonra gerçek zamanlı hücre analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.4.).



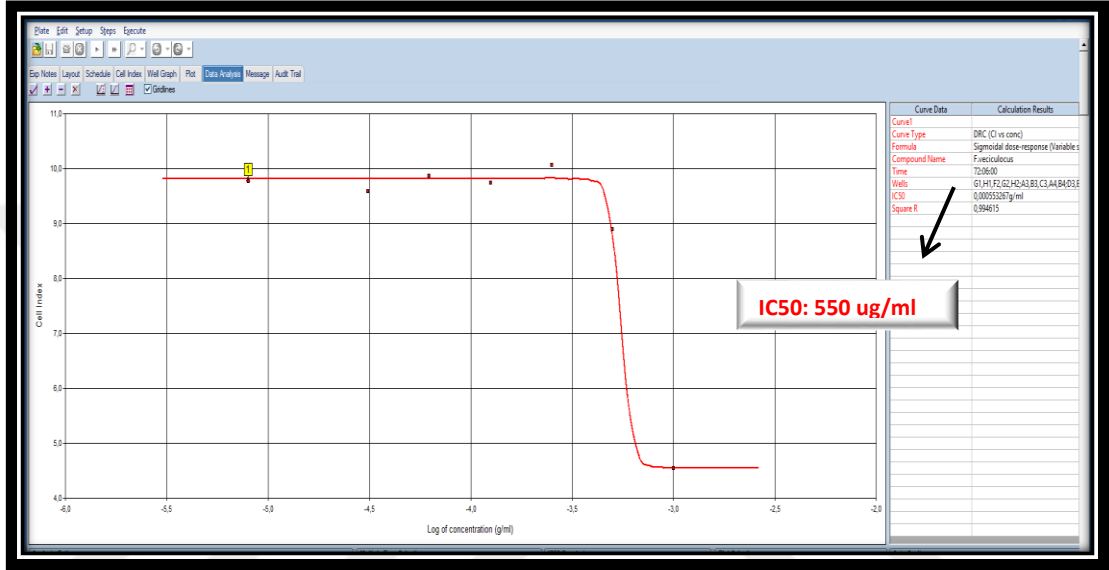
Şekil 4.4. 6A hücre hattı için E -Plaka ile yapılan proliferasyon deney grafiği.

6A hücre hattı için E -Plaka ile yapılan Fucoïdan uygulaması proliferasyon deney grafiğinde, her renk farklı dozda Fucoïdan'ı ifade eder. **Açık yeşil:** 1 000 ug/ml, **Lacivert:** 500 ug/ml, **Pembe:** 250 ug/ml, **Turkuaz:** 125 ug/ml, **Mor:** 62 ug/ml, **Kahverengi:** 31 ug/ml, **Koyu yeşil:** 16 ug/ml **Turuncu:** 8 ug/ml, **Kırmızı:** Kontrol grubu hücreyi göstermektedir (Şekil 4.4.).

6A hücre hattında, Fucoïdan'ın farklı konsantrasyonların da ki etkisi gözlemlenmiştir. Bu deney grafiğine bakıldığında uygulanan Fucoïdan dozu arttıkça, hücre sayısının (proliferasyonun) azaldığı görülmektedir (Şekil 4.4.).

### 4.2.1. IC<sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi

xCELLigence analizlerinin sonucuna göre bundan sonraki Western Blotting ve Real Time PZR aşamalarında kullanmak için Fucoidan'ın etkili olduğu değeri bulmak için Fucoidan'ın hücreleri en çok öldürdüğü değerin yarısı olan IC<sub>50</sub> değeri belirleyerek çalışmalarımıza devam ettik (Şekil 4.5.).

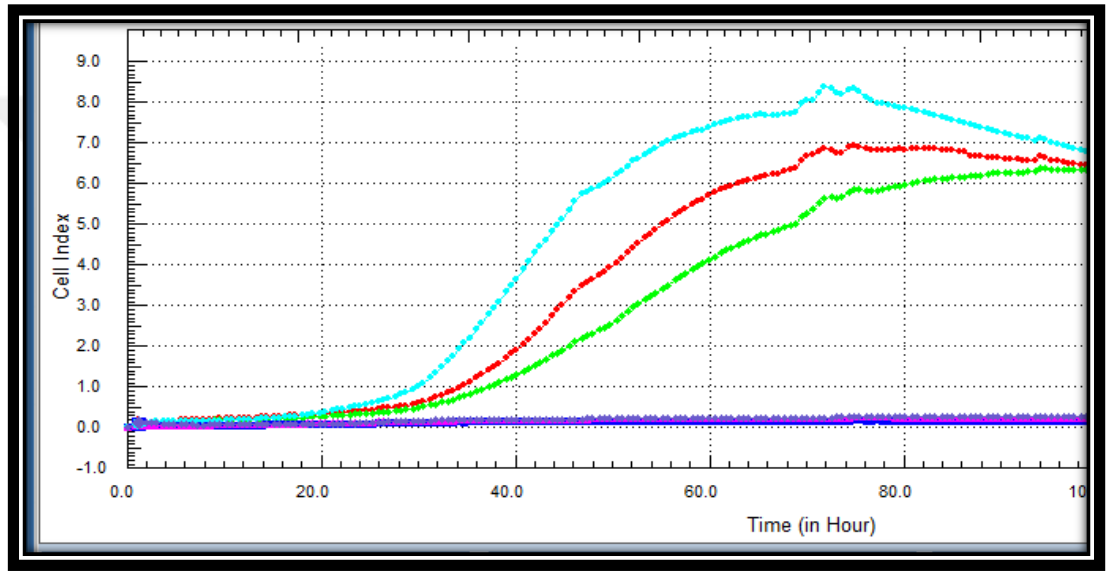


Şekil 4.5. xCELLigence cihazı ile IC<sub>50</sub> değerinin hesaplanması

6A hücre hattı için E -Plaka ile yapılan Fucoidan proliferasyon deney grafiği (Bkz. Şekil 4.1.) sonucu ile xCELLigence cihazının RTCA software sistemi kullanılarak IC<sub>50</sub> değerinin hesaplanması. Oluşturduğumuz bu grafik sonucu IC<sub>50</sub> değeri, 550ug/ml olarak belirlendi.

### 4.3. 6A Hücre Migrasyonu Üzerinde Fucus Vesiculosus (Fucoïdan)'ın Etkisinin Sonucu

Fucoïdan'ın hücre migrasyonuna (hücre göçü) olan etkisini ölçmek için 6A hücre hattı ile xCELLigence cihazı CIM -plakalarına, titrasyon sonucu belirlediğimiz 160 000 sayıdaki hücre ekimini yaptık. Aynı zaman diliminde belirlenen Fucoïdan IC<sub>50</sub> dozu ile IC<sub>50</sub> dozunun iki katını uygulayarak hücre migrasyon deneyimizi gerçekleştirdik (Şekil 4.6.).



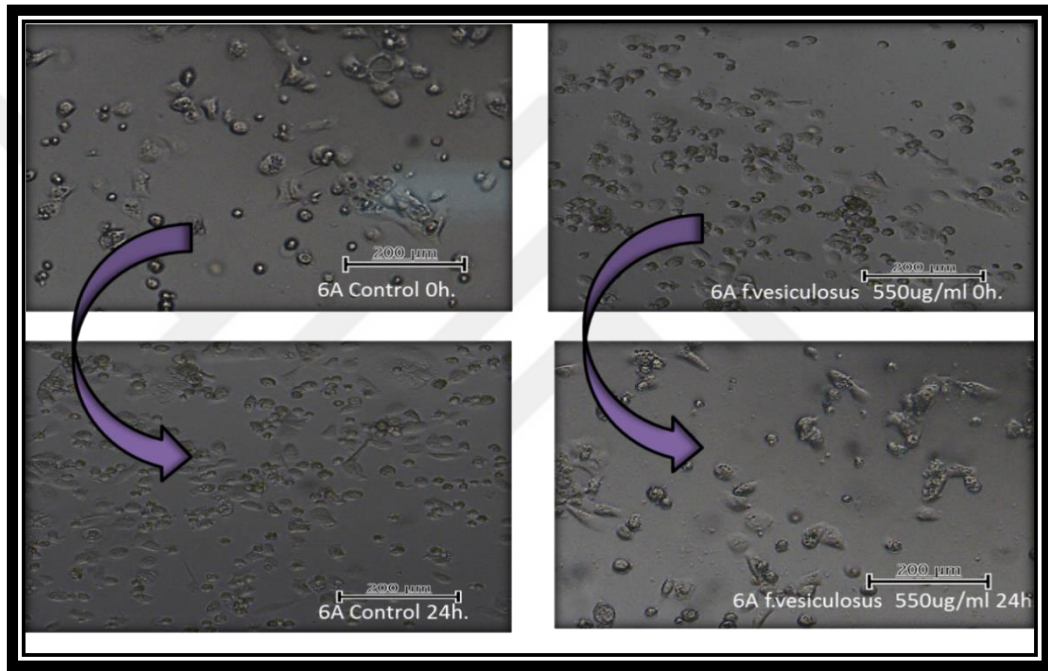
Şekil 4.6. 6A hücre hattı için CIM -Plaka ile yapılan migrasyon deney grafiği.

6A hücre hattı için CIM -Plaka ile yapılan Fucoïdan uygulaması ardından, görülen hücre migrasyon değişimleridir. Her renk farklı dozda Fucoïdan'ı ve farklı FBS'li, FBS'siz ortamı ifade eder. **Turkuaz:** Kontrol (alt çember FBS'li), **Kırmızı:** 1 100 ug/ml (alt çember FBS'li), **Açık yeşil:** 550 000 ug/ml (alt çember FBS'li), **Mor:** Kontrol (alt çember FBS'siz) **Lacivert:** 1 100 ug/ml (alt çember FBS'siz), **Pembe:** 550 000 ug/ml (alt çember FBS'siz) grubu göstermektedir (Şekil 4.6.).

Hücre migrasyon deneyi sonucunda uyguladığımız Fucoïdan IC<sub>50</sub> ve IC<sub>50</sub> dozunun iki katında kontrole oranla ikisinde inhiye ettiğini ama IC<sub>50</sub> dozunda daha iyi inhiye ettiğini gözlemledik (Şekil 4.6.).

#### 4.4. Fucus Vesiculosus (Fucoïdan)'un 6A Hücreğine Uygulanması Ardından Morfolojisinin Gözlemlenmesi

Fucoïdan'ın hücre morfolojisine etkisini gözlemlmek için belirlenen sayıda 6'lık kuyulara hücreler ekildi. Bu sayı hücre titrasyon testi ile belirlenmişti. Hücre ekiminden 24 saat sonra belirlenen IC<sub>50</sub> Fucoïdan dozu hücrelere uygulandı ve 24 saat sonrasında hücre morfolojileri mikroskopta incelendi. Fucoïdan uygulanan grup ile kontrol grubu kıyaslandığında belirgin bir değişimin olmadığı görüldü (Şekil 4.7.).

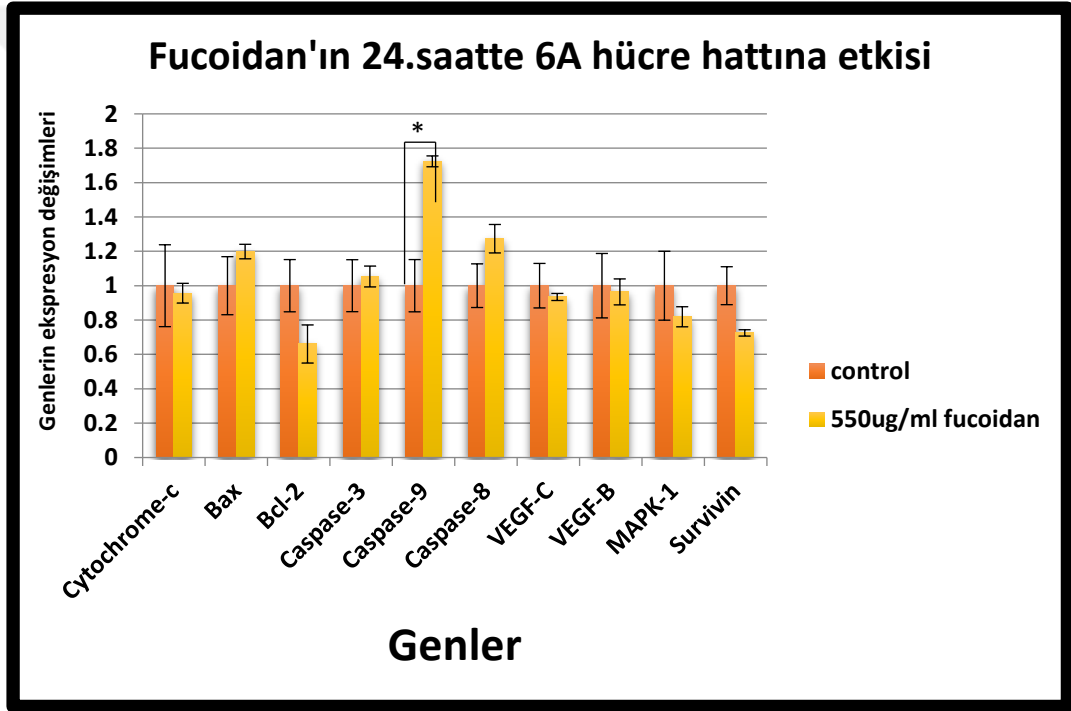


Şekil 4.7. Fucoïdan uygulama sonrası 6A hücre hattı morfoloji görüntüsü

6A hücre hattının 6'lık kuyulara ekiminden 24 saat sonra, Fucoïdan IC<sub>50</sub> dozu (550ug/ml) uygulama sonrası hücre şekilleri (morfoloji) gözlemlendi (Işık mikroskopunda, Nikon AIR- NİS Elements 10x büyütme) (Şekil 4.7.).

#### 4.5. Fucus Vesiculosus (Fucoïdan)'un 6A Hücreğine Uygulanması Ardından RT-PZR ile Bax, Bcl -2, Kaspaz -3, Kaspaz -9, Kaspaz -8, Cytochrome -c, Erk (Mapk1), Survivin ve VEGF Genlerinin Ekspresyon Düzey Sonuçları

Baş -boyun kanseri hücre hattında Fucoïdan uygulamasına bağılı apoptozun tetiklenip tetiklenmediğı gözlemek için, apoptozda önemli rolü olan Bax, Bcl -2, Kaspaz -3, Kaspaz -9, Kaspaz -8, Cytochrome -c genlerine, proliferasyon ve migrasyona etkilerini incelemek için Erkin (Mapk1), Survivin ve VEGF genlerini, RT -PZR (mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri) deneyi yaparak araştırdık.



Şekil 4.8. 6A Hücre hattı için yapılan Real Time PZR analiz sonucu.

6A Hücre hattı için yapılan, Real Time PZR analiz sonucu; istatistiksel olarak student's t -test ile değerlendirilmiştir \* $p < 0,05$  (Caspase -9), diğerk genler için  $p > 0,05$  (Şekil 4.8.).



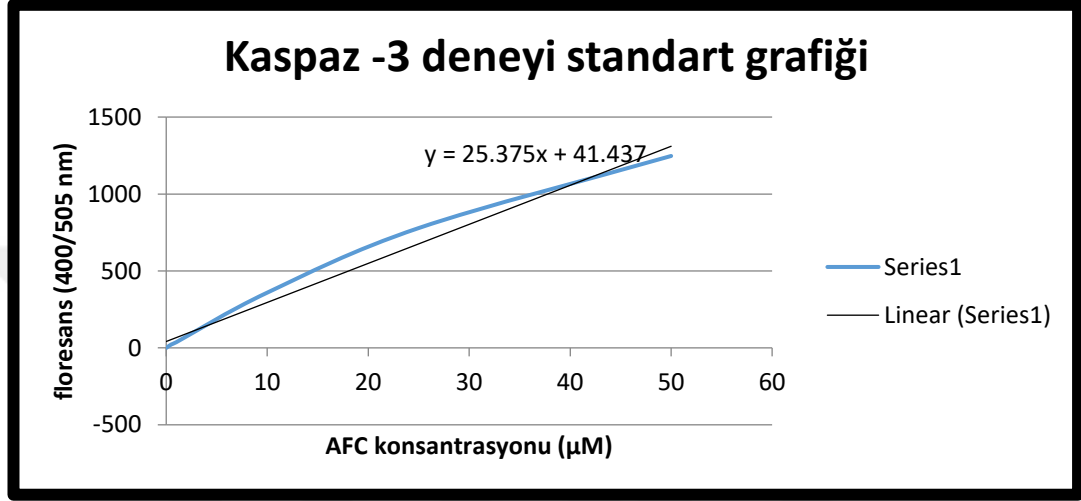
**Tablo 4.1.** 6A hücre hattında Real Time PZR student's t -test değerleri.

<b>6A hücre hattında Real Time PZR student's t-test değerleri</b>		
	<b>550ug/ml/control=p</b>	<b>p değeri</b>
<b>Cytochrome -c</b>	0.823435168	P>0.05
<b>Bax</b>	0.234149454	P>0.05
<b>Bcl-2</b>	0.069028098	P>0.05
<b>Kaspaz -3</b>	0.677918187	P>0.05
<b>Kaspaz -9</b>	0.017981472	<b>P&lt;0.05</b>
<b>Kaspaz -8</b>	0.07325236	P>0.05
<b>Mapk -1</b>	0.329472303	P>0.05
<b>Survivin</b>	0.06848405	P>0.05
<b>VEGF- b</b>	0.677918187	P>0.05
<b>VEGF- c</b>	0.112546865	P>0.05

Yaptığımız Real Time PZR çalışmasında Tablo 4.1.'de 6A hücre hattındaki Kaspaz -9 (**P<0.05**) hariç hiçbir gende Fucoidan uygulamasına bağlı anlamlı bir artış ya da azalma gözlenmemiştir. Kaspaz -9 ekspresyonunda anlamlı bir artış olmasına rağmen Bax/Bcl2 gen ekspresyon oranında ve diğer apoptotik genlerde de belirgin bir değişikliğin olmaması, Fucoidan'ın apoptozu uyarmadığını (indüklemediğini) düşündürdü ve teyit etmek için diğer çalışmalarımızı gerçekleştirdik.

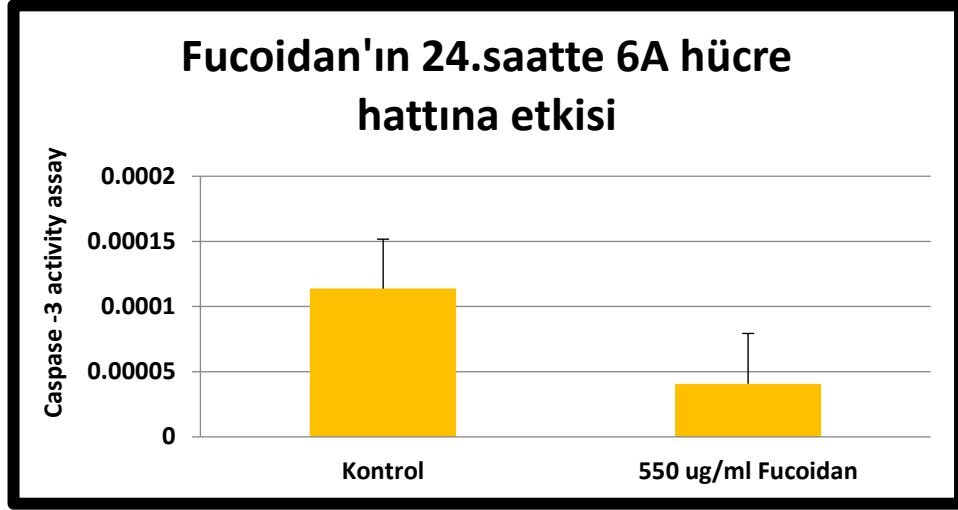
#### 4.6. 6A Hücre Hattına Fucus Vesiculosus (Fucoïdan) Uygulama Sonrası Apoptoz Deney (Caspase -3 Activity Assay) Sonucu

Apoptotik yolak ile ilgili olup olmadığını araştırmak için, farklı bir yol olan ve apoptozu doğrudan ilgilendiren Kaspaz -3 aktivitesini inceledik.



Şekil 4.9. Kaspaz -3 deneyi standart grafiği.

Kaspaz -3 deney sonucunda florometrik ölçüm sonucu elde edilen standartların değerleri kullanılarak standart eğrisi çizildi. Bu grafiğin eğimi Kaspaz -3 aktivitesi hesaplanırken kullanıldı (Şekil 4.9.).

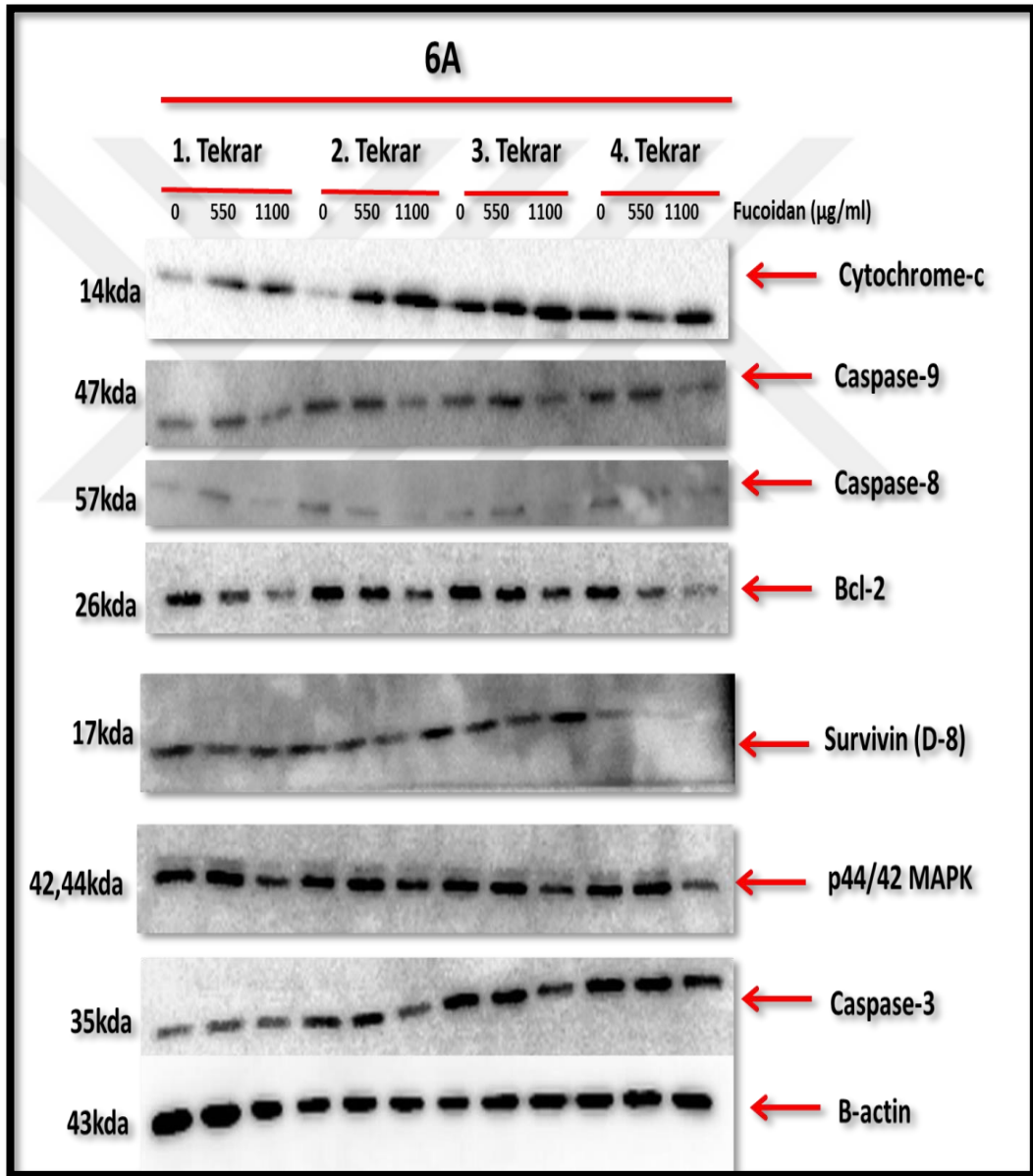


**Şekil 4.10.** 6A hücre hattı için yapılan Kaspaz -3 aktivite sonucu.

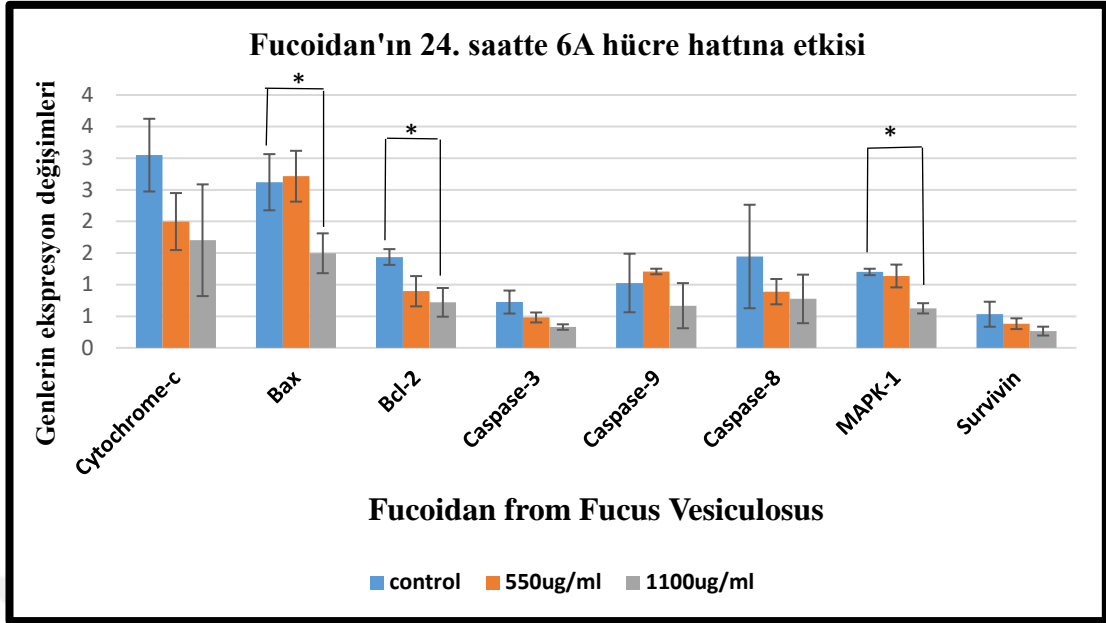
6A hücre hattında yapılan Kaspaz -3 deney sonuçlarının analizi student's t-test ( $p>0.05$ ) ile gerçekleştirildi. Kaspaz -3 aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir değişikliğin olmadığını, bu deneyimizde de teyitlemiş olduk. Baş -boyun kanseri primer tümör hücrelerinin Fucoïdan etkisiyle apoptozu uyarmadığını tespit ettik (Şekil 4.10.).

#### 4.7. Fucus Vesiculosus (Fucoïdan)'un 6A Hücreğine Uygulanması Ardından Western Blot Sonuçları

6A hücre hattı, hücre kültüründe uygun şartlarda büyütülerek, Fucoïdan uygulaması yapıldı sonrasında da Western Blot yapmak üzere proteinleri izole edildi. Fucoïdan'ın Bax, Bcl -2 Kaspaz -3, Kaspaz -9, Kaspaz -8, Cytochrome -c, Erk (Mapk1), Survivin genlerinin protein seviyelerine etkisi gözlemlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. 6A hücre hattı Fucoïdan uygulama sonrasında Western Blot sonuçları.



Şekil 4.12. 6A Hücre hattı için yapılan Western Blot analizi \* $p < 0.05$ .

Tablo 4.2. 6A hücre hattında Western Blot student's t-test değerleri.

6A hücre hattında Western Blot student's t-test değerleri				
Gen İsimleri	550ug/ml/control=p	p değeri	1100ug/ml/control=p	p değeri
Cytochrome-c	0.11578	$p > 0.05$	0.15693	$P > 0.05$
Bax	0.834065	$p > 0.05$	0.049195	<b><math>P &lt; 0.05</math></b>
Bcl -2	0.065671	$p > 0.05$	0.027809	<b><math>P &lt; 0.05</math></b>
Kaspaz -3	0.190007	$p > 0.05$	0.084759	$P > 0.05$
Kaspaz -9	0.635558	$p > 0.05$	0.436957	$P > 0.05$
Kaspaz -8	0.439998	$p > 0.05$	0.37508	$P > 0.05$
Mapk -1	0.672046	$p > 0.05$	0.002194	<b><math>P &lt; 0.05</math></b>
Survivin	0.40523	$p > 0.05$	0.188858	$P > 0.05$

Yaptığımız Western Blot çalışma analizindeki (Şekil 4.12.), istatistiksel değerlendirme student's t-test ile yapılmıştır Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Bu sonuçları incelediğimizde, 6A hücre hattında, Bax ( **$p < 0.05$** ) ve Bcl -2 ( **$p < 0.05$** ) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir fark olmasına rağmen Bax/Bcl -2 gen ekspresyon oranında ve diğer apoptotik genlerde de belirgin bir değişiklik olmadığından, Fuoidan'ın apoptozu uyarmadığını bir kez daha teyit etmiş olduk (Şekil 4.12).

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde kanser henüz çözümlenememiş önemli bir sağlık problemi olup birçok bilim adamının üzerinde çalıştığı bir hastalıktır. Kanserin ortaya çıkışı, gelişimi ve sonucu bir hastadan diğer hastaya çok fazla değişkenlik göstermektedir (112) ve yapılan araştırmalara göre, kanserin en çok karşılaşılan ikinci ölüm sebebi olduğu belirtilmektedir. Hayatları boyunca erkeklerin yarısında, kadınların üçte birinde kanser hastalığının görülebileceği belirtilmektedir (113).

Baş -boyun kanseri dünyada yaygın olarak 6. sırada malign (kötü huylu tümör) kanser olarak görülmektedir ve sağkalım oranı düşük olan bir kanser türüdür (114). Erişkin yaşta daha sık görülen bu kanser baş ve boyundaki yassı hücrelerden mukozal yüzeylerden köken almaktadırlar (115). Aynı zamanda tükürük bezindeki farklı tür hücrelerden de köken alarak oluşabilirler. Köken aldıkları baş -boyun bölgesine göre de sınıflandırılırlar (17).

Kullanılan tedavi yöntemleri arasında ilk olarak radyoterapi ve cerrahi yöntemler ön plandadır. Bu tedavi yöntemleri sağlıklı hücrelere de zarar verdiğiinden ve tamamen çare olmadığından yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Farklı yollar esas alınarak yapılan çalışmalar da dahil olmak üzere bu çalışmaların yetersiz olduğu sitotoksitesisi düşük maddelerin tedavide arandığı bildirilmektedir Bu sebeplerden dolayı kanser üzerine yapılan çalışmaların moleküler seviyede daha da artırılması ve genomik düzeydeki araştırmaların çoğalması oldukça önemlidir (116).

Bilim ve teknolojik gelişmelerin yüksek bir hızla ilerlediği günümüzde hastalıkları moleküler düzeyde anlayabilmek ve yeni tedavi yöntemleri ortaya koyabilmek için yapılan genetik çalışmalar artmıştır. Kanser multifaktoriyel bir hastalıktır (117). Ülkemizde sık görülen kanser türlerinden biri olan baş -boyun kanserinde bu soruları aydınlatılabilmek, aynı zamanda da yeni tedavi yöntemi geliştirebilmek adına çalışmamızı gerçekleştirdik.

Doğal kaynaklar ve sitotoksitesi düşük olan maddeler farmakolojik ve tıbbi araştırmalarda önemli yer tutar. Kanser alanında son zamanlarda yapılan çalışmalar doğal kaynaklardan izole edilen anti kanser özelliği kanıtlanmış birçok ümit verici bileşik ortaya çıkarılmıştır. Algler bu anlamda ciddi bir potansiyel barındırır (118, 119).

Mozuku Japonya Okinawa, Tayvan bölgesinde yetiştirilen kahverengi bir yosun türü olup latince ismi *Cladosiphon okamuranus*'dur (120). Çalışmamızda Mozuku'nun önemli bir etken maddesi olan ve daha öncesinde baş -boyun kanseri üzerine çalışılmamış olan Fucoidan'dan faydalanılmıştır.

Fucoidan ile yapılan çalışmalar hücreler üzerinde proliferasyona olan etkisi ve kanser hücrelerine inhibisyon etkisinin yanı sıra enflamasyon, immünolojik, lipid mekanizması ve anjiyogeneze olan etkileri de çalışılmıştır (51). Bu etkilerden Fucoidan'ın anti tümör aktivitesi hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamlarda gösterilmiştir. Birçok tümör hücre hattında antitümör etkisi görülmüştür (121). Fucoidan'ın etki mekanizmaları içinde apoptoz en çok çalışılmış olanıdır (55).

Fucoidan'ın bu yollarda etkisi üzerine çalışmalar sürdürülmüş ve MCF7 hücrelerinde Kaspaz -3'ün aktivasyonunu artırarak apoptotik hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir (56). Yine bu çalışmalara örnek olarak Fucoidan'ın proapoptotik protein olan Bax ve Bad proteinlerini artırdığı, anti-apoptotik protein olan Bcl -2 ve Bcl -xL proteinlerinin etkinliğini azaltmasına ek olarak MCF7 hücre hattında mitokondriyal depolarizasyonu artırdığı da bulunmuştur (57). Ayrıca bu çalışmaların devamında Fucoidan'ın kolon kanserinde mitokondriden sitokrom c ve Smac/Diablo salınımını artırarak mitokondri membranının permeabilitesini artırdığı bulunmuştur. Başka bir çalışmada hücre döngüsünü durduğu ve apoptozu uyardığını göstermişlerdir (58).

Fucoidan'ın anti proliferasyon etkisi üzerinde de durulmuş ve MKN45 mide kanseri hücrelerinde yatan mekanizması incelenmiştir. Fucoidan yaklaşık %50 oranında MKN45 hücrelerinde hücre döngüsünü engellediği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Sonuç olarak Fucoidan fosforlu ASK1 seviyelerinin azalması ile MKN45 hücrelerini ASK1-p38 sinyal yolu ile baskılayarak hücre proliferasyonuna baskılayabilir olduğunu rapor etmişlerdir (122).

Fucoidan'ın anti proliferasyon etkisi üzerinde de durulmuş ve MKN45 mide kanseri hücrelerinde yatan mekanizması incelenmiştir. Fucoidan yaklaşık %50 oranında MKN45 hücrelerinde hücre döngüsünü engellediği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Sonuç olarak Fucoidan fosforlu ASK1 seviyelerinin azalması ile MKN45 hücrelerini ASK1-p38 sinyal yolu ile baskılayarak hücre proliferasyonuna baskılayabilir olduğunu rapor etmişlerdir (122).

Diğer bir çalışmada Fucoidan'ın Endoplazmik Retikulum üzerindeki etkisine bakılmıştır. Meme kanserinin metastaz yapan, glikoz metaabolizmasını regüle eden grup proteini (GRP78), metastaz yapan kolon kanseri hücrelerin ERp29 ekspresyonunu azaltmıştır. Fucoidan tedavisinin meme kanserinde CaMKII'nin fosforilasyonunu düzenlediği, Bcl -2, Bax, Kaspaz kaskadını eksprese ettiğini görülmüştür. Her iki kanser türünde de p-eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonunu aktive etmekte olduğu proapoptotik kaskadı da aktive ederek apoptoza götürmekte olduğunu rapor etmişlerdir (123).

Yapılan başka bir çalışmada Fucoidan'ın anti-metastatik özellik sergilediğini A549 akciğer kanser hücreleri üzerinde tespit edilmiştir. NF-kB sinyal yolağının yanı sıra Akt-mTOR ve ERK1/2 sinyal yolunda ekspresyon seviyesini azaltarak yaptığını görmüşlerdir. Bu sonuç Fucoidan invaziv insan akciğer kanser hücrelerine karşı potansiyel bir terapötik etkisi olduğu düşündürmüştür (124).

Farklı bir çalışmada Fucoidan ve  $\beta$ -catenin arasında ilişki kurularak Wnt sinyal yolunda ki etkisine bakılmıştır. Çalışmada hücre döngüsünde G<sub>1</sub> evresinde durduğu, hücre ölümünü artırdığı, hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca  $\beta$ -catenin ekspresyonunu azaltmaktadır. Hedeflediği alt genler c-myc, cyclin D1 ve survivindir. *In vivo*'da intraperitoneal olarak enjekte edilen Fucoidan, tümör kitlesi ve ağırlığında azalma göstermiştir. Fucoidan verildikten sonra apoptoza gidiş artmıştır (121).



Başka bir çalışmada Fucoidan'ın düşük moleküler ağırlıklı etkisi (DMAE) östrojen reseptör negatif insan meme kanser hücreleri MDA-MB-231 üzerinde apoptoza etkisi incelenmiştir. DMAE tedavisi bulunmuş ve MDA-MB-231 hücrelerinin antiapoptotik Bcl -2 ailesi ekspresyonunu düşürdüğü, cytochrome c salınımını sağlaması, Ca<sup>+2</sup> homeostazın değişimi, mitokondriyal disfonksiyon aktivasyonu ( $\Delta\Psi_m$ ) ile ilişkilendirilmiştir. Çalışma sonucunda DMAE kaynaklı MDA-MB-231 kanser hücrelerinin ölümünün gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (125).

Fucoidan tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskılamaktadır ve bu etkiyi tümör kitlesinin küçülmesinde de gösterir (LLC1-xenograft erkek C57BL/6 fareler). Fucoidan ile baslenen farelerde beslenmeyenlere göre büyük antitümör etkisi gözlenmiştir. TGF $\beta$  ile oluşturulan *in vitro* akciğer kanser modelinde Fucoidan'ın TGFRI ve TGFRII protein seviyelerini düşürdüğü izlenmiştir. Ayrıca Fucoidan'ın TGFR sinyal yolunda Smad2/3 üzerinden etki ettiği, ayrıca Akt, Erk1/2, FAK fosforilasyonu üzerine ettiği gözlenmiştir. Bu çalışma gösteriyor ki Fucoidan'ın etki mekanizmasının TGFR/ Smad7/ Smurf2 üzerinde olduğu *in vivo* ve *in vitro* da kanıtlanmıştır (126).

Çalışmamızda baş -boyun kanseri üzerinde hücre proliferasyon çalışmamızı xCELLigence E -plaka sistemi kullanarak yaptıktan sonra Fucoidan'ın hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini gördük, sonrasında da analiz yaparak IC<sub>50</sub> dozunu belirledik. xCELLigence CIM -plaka sistemi ile yaptığımız migrasyon deney sonucunda IC<sub>50</sub> dozunda hücre migrasyonunu inhibe ettiğini gözlemledik. Yaptığımız proliferasyon ve migrasyon çalışmalarından sonra Fucoidan'ın apoptoz üzerine etkisini araştırdık ve gördük ki apoptoz ile ilgili genlerde mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonlarında anlamlı bir artış ya da azalma olmamaktadır ve Kaspaz -3 aktivitesi deneyine de bağlı anlamlı bir artış olmaması bize Fucoidan'ın apoptozu uyardığını göstermektedir. Bu sonuç hücre proliferasyon inhibisyonunun farklı yollar üzerinden olabileceğini işaret etmektedir. Yapılan çalışmalar Fucoidan'ın kanser hücreleri üzerine etkisinin apoptoz üzerinden olabileceği gibi, otofaji veya hücre döngüsünü durdurma şeklinde olabileceğini de göstermektedir (60). Baş -boyun kanseri tedavisinde Fucoidan'ın etki mekanizmasının çözümü önemli bir çalışma olup, elde edilen ilk sonuçlar, Fucoidan'ın potansiyel bir tedavi yöntemi olabileceği göstermektedir.

Tüm deneysel çalışmalarımızın ışığında baş -boyun kanser hücre hattında hücre proliferasyonunu ve hücre migrasyonunu inhibe ettiğini fakat bu olayın apoptotik hücre yolağı ile gerçekleşmediğini tespit ettik. Fucoidan'ın kanser hücreleri üzerine etkisinin apoptoz üzerinden olabileceği gibi, otofaji (60) veya hücre döngüsünü durdurma şeklinde olabileceğini göstermektedir (58). Buna bağlı olarak otofajiye bakılabilir.

Hücre döngüsüne bağlı olarak P53 ve P21 ekspresyon değişimleri incelenebilir. P53 stres durumunda normal hücrelerde apoptoza götüren gen dizisini kontrol eden kritik bir transkripsiyon faktörüdür. P21 ekspresyonunun P53'ten bağımlı bir şekilde düzenlendiği gibi P21'in bağımsız bir şekilde de düzenlenebilmekte olduğunu; HRAS-Raf-Mapk yolağı, KLF6 transkripsiyon faktörü, retinoid, vitamin D ve adrojen reseptörleri gibi farklı yollardan da P53'ten bağımsız olarak aktive olduğunu göstermişlerdir. Literatürde aynı zamanda P21 gen ekspresyonunda ki artışın apoptozu inhibe ettiği gözlenmiştir (127). Fucoidan'ın hücre döngüsünü G<sub>1</sub> -fazında durduran, p21 (WAF1) -siklin-CDK mekanizma katılımını gösteren ilk sistematik araştırmayı yapmışlardır. Bu beklenmeyen sonuçlarda Fucoidan'ın HT29 kolon kanser hücrelerinde Akt aktivasyonu yoluyla hücre çoğalmasını inhibe ettiğini göstermişlerdir (127). Buna bağlı olarak hücre döngüsünü durduran genlerin ekspresyon değişimleri mRNA ve protein düzeyinde incelenerek, mekanizmaları aydınlatılabilir.

*In vitro*'da başlayan bu çalışma daha da genişletilerek *in vivo* çalışmalar tamamlanıp, uzun vadede tedavi amacıyla değerlendirilebilir. Bu çalışma sonraki aşamalar için basamak oluşturmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Öncelikle çalışmamızda hücre proliferasyon deneyi için xCELLigence cihazı kullanılmıştır. Baş-boyun kanser hücre hattına Fucoidan uygulayarak, IC<sub>50</sub> (Hücre büyümesinin %50'sini inhibe eden konsantrasyon) değeri belirlenmiştir. Bu değer, UT-SCC-6A baş-boyun kanseri hücre hattı için 550 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Bir sonraki aşama olan hücre migrasyon deneyi için de xCELLigence cihazından faydalanılmıştır. Çalışmamız sonucunda uyguladığımız Fucoidan IC<sub>50</sub> (550 µg/ml) ve IC<sub>50</sub> dozunun iki katında (1 100 µg/ml) kontrole oranla ikisinin de inhibe ettiğini ama IC<sub>50</sub> dozunda daha iyi inhibe ettiğini gözlemledik.

Fucoidan ile yapılan çalışmaları incelediğimizde farklı kanser hücre hatlarında apoptotik yolağı kullanarak ölüme götürdüğü tespit edilmiştir. Bizde daha önce çalışılmamış olan baş -boyun kanseri hücre hattında, Fucoidan uygulamasına bağlı apoptozun tetiklenip tetiklenmediği gözlemek için apoptozda önemli rolü olan genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon değişimlerini araştırdık. Bu genler; Bax, Bcl -2 Kaspaz -3, Kaspaz -9, Kaspaz -8, Cytochrome -c genlerine ve tümöröenez, proliferasyon, migrasyon ve yine apoptotik etkilerini incelemek içinde Erk (Mapk1), Survivin ve VEGF genleri'dir. Bunun için de farklı konsantrasyonlarda Fucoidan uyguladıktan sonra, Fucoidan uygulanmış ve kontrol grubu hücrelerinden RNA izolasyonunu yapıp cDNA sentezini gerçekleştirdik. Real Time PZR deneyini yaparak gen ekspresyonlarındaki değişimi student's t-test ile sonuçlandırdık.

Yaptığımız Real time PZR analizi sonucu 6A hücre hattına uygulanan Kaspaz -9 (**p<0.05**) harici hiçbir gende Fucoidan IC<sub>50</sub> (550ug/ml) dozuna bağlı anlamlı bir artış ya da azalma gözlenmemiştir. Kaspaz -9 ekspresyonunda anlamlı bir artış olmasına rağmen Bax/Bcl -2 gen ekspresyon oranında ve diğer apoptotik genlerde de belirgin bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Bu apoptotik gen ekspresyonlarında protein aktivasyonunda nasıl bir değişikliğe yol açtığını bir sonraki deney planımız olan, Western Blot ile gerçekleştirdik.

Yaptığımız Western Blot çalışmasında, 6A hücre hattına uygulanan Fucoidan IC<sub>50</sub> (550 ug/ml) dozuna bağlı anlamlı bir artış ya da azalış meydana gelmemiştir. Fakat IC<sub>50</sub> (1 100 ug/ml) dozunun iki kat uygulamasına bağlı değişimde Bax (**p<0.05**) ve Bcl -2 (**p<0.05**) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir fark olmasına rağmen Bax/Bcl -2 gen ekspresyon oranında ve diğer apoptotik genlerde anlamlı bir fark bulamadık. Bu sebeplerden ötürü Fucoidan'ın apoptozu uyarmadığını Western Blot deneyi ile de teyit etmiş olduk.

RT -PZR ve Western Blot deneylerinden sonra apoptotik yolak ile ilişki olup olmadığını son yanıtını almak üzere apoptoz yolağında oldukça önemli role sahip bir protein olan Kaspaz -3 aktivite deneyi (activity assay) yaptık. Fucoidan'ın IC<sub>50</sub> (550ug/ml) ve IC<sub>50</sub> (1 100ug/ml) dozunun iki katını uyguladığımız baş -boyun kanser hücrelerinde, Kaspaz-3 aktivite ölçümüne bağlı anlamlı bir sonuca ulaşamadık. Fucoidan'ın farklı kanser hücre hatlarında olan etki mekanizmalarına baktığımızda apoptotik yolu tetiklediği gösterilirken, yaptığımız baş -boyun kanser araştırmasında, hücre ölümünün apoptotik yolak üzerinden olmadığını gördük.

Yaptığımız çalışmalar ışığında baş -boyun kanser hücre hattında hücre proliferasyonunu ve hücre migrasyonunu inhibe ettiğini fakat bu olayın apoptotik hücre yolağı ile gerçekleşmediğini tespit ettik. Fucoidan'ın kanser hücreleri üzerine etkisinin apoptoz üzerinden olabileceği gibi, otofaji veya hücre döngüsünü durdurma şeklinde olabileceğini göstermektedir. Hücre döngüsünü durduran genlerin ekspresyon değişimleri mRNA ve protein düzeyinde incelenerek, mekanizmaları aydınlatılabilir. Özellikle de P53 ve P21 ekspresyon değişimleri incelenebilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Cancer Facts, Figures. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2014.html>. 18 Haziran 2015.
2. Alberts B BD, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.D, Orme N, Hesketh-Moore K. 3rd ed. *ASM Press*, 2008.
3. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray C. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet (London, England)* 2006, 367(9524):1747-1757.
4. Jemal A, Bray, F, Center, M. M, Ferlay, J, Ward, E, Forman, D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2011, 61(2):69-90.
5. Anonymous A phase III randomised trial of cisplatin, methotrexate, cisplatin + methotrexate and cisplatin + 5-FU in end stage squamous carcinoma of the head and neck. Liverpool Head and Neck Oncology Group. *British journal of cancer*, 1990, 61(2):311-315.
6. Gandini S, Botteri, E, Iodice, S, Boniol, M, Lowenfels, A. B, Maisonneuve, P, Boyle, P. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer*, 2008, 122(1):155-164.
7. Sundermann BV, Uhlmann L, Hoffmann J, Freier K, Thiele O. The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2018, 46(2):177-182.
8. Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, & Straif K. Smokeless tobacco and cancer. *The Lancet. Oncology*, 2008, 9(7):667-675.
9. Morse D, Psoter, W. J, Cleveland, D, Cohen, D, Mohit-Tabatabai, M, Kosis, D. L. Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. *Cancer causes & control : CCC*, 2007, 18(9):919-929.
10. Hashibe M, Brennan, P, Chuang, S, Boccia, S, Chen, C. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 2009, 18(2):541-550.
11. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff R. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(1):9-22.

12. Chaturvedi A, Kim, E, Iang, B, Goodman, M. T. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2011, 29(32):4294-4301.
13. Gillison ML, Westra, W, Sugar, E, Xiao, W. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 2008, 100(6):407-420.
14. Guha N, Boffetta, P. Wunsch Filho, V, Eluf Neto, J. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *American journal of epidemiology*, 2007, 166(10):1159-1173.
15. Chien Y, Chen, J. Y, Liu, M. Y, Chen, C. J. Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *The New England journal of medicine*, 2001, 345(26):1877-1882.
16. Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *Journal of dental research*, 2007, 86(2):104-114.
17. Carter BW, Benveniste, M. K, Wu, C. C. Revisions to the TNM Staging of Lung Cancer: Rationale, Significance, and Clinical Application. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America*, 2018, Inc 38(2):374-391.
18. Harrison C, Drury P, Cassell O. Sentinel lymph node biopsy for thin melanomas under the American Joint Committee on Cancer 8th edition cancer staging system. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*, 2018, 71(1):120-121.
19. Anatomy Revealed in AJCC Cancer Staging Atlas. <https://cancerstaging.org/About/news/Pages/atlas.aspx>. 19 Nisan 2014.
20. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*, 2010, 17(6):1471-1474.
21. Pharynx Anatomy. <https://emedicine.medscape.com/article/1949347-overview>. 18 Kasım 2015.
22. Houten VM, Tabor, M. P, Kummer, J. A, Denkers, F. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *The Journal of pathology*, 2002, 198(4):476-486.

23. Anonymous Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention and Screening, [www.cancer.net/patient](http://www.cancer.net/patient). (American Society of Clinical Oncology Clinical Cancer Advances), 2009.
24. Kiuru A, Servomaa K, Grenman R, Pulkkinen J, Rytomaa T. p53 mutations in human head and neck cancer cell lines. *Acta oto-laryngologica. Supplementum*, 1997, 529:237-240.
25. Wood NB, Kotelnikov, V, Kotelnikov, V, Caldarelli, D. D, Hutchinson, J. Mutation of p53 in squamous cell cancer of the head and neck: relationship to tumor cell proliferation. *The Laryngoscope*, 1997, 107(6):827-833.
26. Woolgar JA, Triantafyllou A. Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis. *Oral oncology*, 2009, 45(4-5):361-385.
27. Chung CH, Parker, J. S, Karaca, G, Wu, J, Funkhouser, W. K. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer cell*, 2004, 5(5):489-500.
28. Henle G, Henle W. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *International journal of cancer*, 1976, 17(1):1-7.
29. Rocco JW, Li, D, Liggett, W. H, Duan, L. p16INK4A adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 1998, 4(7):1697-1704.
30. Takiar V, Garden, Adam S, Li, Jing, Frank, Steven J. Disease control and toxicity outcomes for T4 carcinoma of the nasopharynx treated with intensity-modulated radiotherapy. *Head & Neck*, 2016, 38(S1):E925-E933.
31. Karpathiou G, Monaya, A, Forest, F, Froudarakis, M, Casteillo, F. p16 and p53 expression status in head and neck squamous cell carcinoma: a correlation with histological, histoprognostic and clinical parameters. *Pathology*, 2016, 48(4):341-348.
32. Han YS, Lee JH, Lee SH. Antitumor Effects of Fucoïdan on Human Colon Cancer Cells via Activation of Akt Signaling. *Biomolecules & therapeutics*, 2015, 23(3):225-232.
33. Field JK, Spandidos, D. A, Stell, P. M, Vaughan, E. D. Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 1989, 4(12):1463-1468.
34. Izzo JG, Ibarguen, H, Lee, J. S, Ro, J. , El-Naggar, A.. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* 17(18):2313-2322.

35. Pai S, Westra W. Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Annual review of pathology*, 2009, 4:49-70.
36. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*, 2004, 73:39-85.
37. Cross D, Burmester J. Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clinical Medicine and Research*, 2006, 4(3):218-227.
38. Herzog RW, Cao O, & Srivastava A. Two Decades of Clinical Gene Therapy – Success Is Finally Mounting. *Discovery medicine*, 2010, 9(45):105-111.
39. Uzun LB. Baş boyun kanserlerinde gen tedavisi uygulamaları. [http://kbb-forum.net/journal/pdf/pdf\\_KBB\\_68.pdf](http://kbb-forum.net/journal/pdf/pdf_KBB_68.pdf), 2004. 9 Mart 2016.
40. Poulsen TT, Pedersen N, Poulsen H. Replacement and suicide gene therapy for targeted treatment of lung cancer. *Clinical lung cancer*, 2005, 6(4):227-236.
41. Zarogoulidis P. Suicide Gene Therapy for Cancer – Current Strategies. 4, 2013.
42. El-Kenawi AE, El-Remessy A. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales. *British Journal of Pharmacology*, 2013, 170(4):712-729.
43. Wang M, Yin B, Wang HY, Wang R. Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 2014, 6(12):1265-1278.
44. Azuma K, shihara, T, Nakamoto, H, Amaha, T, Osaki, T, Tsuka, T. Effects of Oral Administration of Fucoidan Extracted from *Cladosiphon okamuranus* on Tumor Growth and Survival Time in a Tumor-Bearing Mouse Model. *Marine Drugs*, 2012, 10(10):2337-2348.
45. Ale MT, Mikkelsen Jø D, Meyer A. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Marine Drugs*, 2011, 9(10):2106-2130.
46. Piovan A, Seraglia R, Bresin B, Caniato R, Filippini R. Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*: photostability and coextractive effects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2013, 18(6):6298-6310.
47. Wang M, Jiang, X, Wu, W, Hao, Y, Su, Y, Cai, L. Psychrophilic fungi from the world's roof. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 2015, 34:100-112.



48. Durig J, Bruhn, T, Zurborn, K. H, Gutensohn, K, Bruhn, H. D. Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation in vitro. *Thrombosis research*, 1997, 85(6):479-491.
49. Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo A. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Current medicinal chemistry*, 2004, 11(18):2399-2419.
50. Kylin H. *Hoppe-Seylers Zeitschrift fu`r physiologische Chemie*, 1913, p 171.
51. Croci DO, Cumashi, A, Ushakova, N. A, Piccoli, A, Totani, L. Fucans, but Not Fucomannoglucuronans, Determine the Biological Activities of Sulfated Polysaccharides from *Laminaria saccharina* Brown Seaweed. *PLoS ONE* , 2011, 6(2).
52. Han Y, Lee H. Antitumor Effects of Fucoidan on Human Colon Cancer Cells via Activation of Akt Signaling, 2015, 23(3):225-232.
53. Myers SP, Fitton, J. H, Brooks, L., Rolfe, M, Connellan, P. A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis. *Biologics : targets & therapy*, 2010, 4:33-44.
54. Nagamine T, Hayakawa, K, Kusakabe, T, Nakazato, K. Inhibitory effect of fucoidan on Huh7 hepatoma cells through downregulation of CXCL12. *Nutrition and cancer*, 2009, 61(3):340-347.
55. Jin JO, Song MG, Kim YN, Park JI, Kwak JY. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide. *Molecular carcinogenesis*, 2010, 49(8):771-782.
56. Liang Y, Yan C, Schor NF. Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene*, 2001, 20(45):6570-6578.
57. Zhang Z, Teruya K, Eto H, Shirahata S. Fucoidan extract induces apoptosis in MCF-7 cells via a mechanism involving the ROS-dependent JNK activation and mitochondria-mediated pathways. *PLoS ONE*, 2011, 6(11):e27441.
58. Fukahori S, Akiba, J, Ogasawara, S, Momosaki, S. Fucoidan, a major component of brown seaweed, prohibits the growth of human cancer cell lines in vitro. *Molecular medicine reports*, 2008, 1(4):537-542.
59. Kwak J. Fucoidan as a Marine Anticancer Agent in Preclinical Development. *Marine Drugs*, 2014, 12(2):851-870.
60. Park HS, Kim GY, Nam TJ, Deuk Kim N, Hyun Choi Y. Antiproliferative activity of fucoidan was associated with the induction of apoptosis and autophagy in AGS human gastric cancer cells. *Journal of food science*, 2011, 76(3):T77-83.

61. Altunkaynak BZ, Ö.E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? . *Tip Araş Dergisi*, 2008, :93-104.
62. Sperelakis N. *Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach* (Gulf Professional Publishing, 2001, United States).
63. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 1972, 26(4):239-257.
64. Sammarco P.W, Strychar KB. Responses to High Seawater Temperatures in Zooxanthellate Octocorals. *PLoS ONE*, 2013, 8(2).
65. Searle J, Kerr J., Bishop C. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathology annual 17 Pt*, 2013, 2:229-259.
66. Wyllie A.H. Death in normal and neoplastic cells. *Journal of Clinical Pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)*, 1974, 7:35-42.
67. Odaka C, Ucker DS. Apoptotic morphology reflects mitotic-like aspects of physiological cell death and is independent of genome digestion. *Microscopy Research and Technique*, 1996, 34(3):267-271.
68. Bellamy S, Kovacheva Y, Zulkipli I, Halford S. Differences between Ca(2+) and Mg(2+) in DNA binding and release by the SfiI restriction endonuclease: implications for DNA looping. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(16):5443-5453.
69. Walker N, Harmon B, Gobe G, & Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods and achievements in experimental pathology*, 1988, 13:18-54.
70. Imawati Budihardjo, Holt Oliver, Michael Lutter, Xu Luo a, Wang X. Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1999, 15(1):269-290.
71. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual review of biochemistry*, 2004, 73:87-106.
72. Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica acta Helvetiae*, 2000, 74(2-3):281-286.
73. Hassan M, Selimovic, D, Hannig, M, Haikel, Y. Endoplasmic reticulum stress-mediated pathways to both apoptosis and autophagy: Significance for melanoma treatment. *World Journal of Experimental Medicine*, 2015, 5(4):206-217.

74. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenaabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell death and differentiation*, 2007, 14(1):44-55.
75. Khosravi-Far R, Esposti M. Death Receptor Signals to Mitochondria. *Cancer biology & therapy*, 2004, 3(11):1051-1057.
76. Wilson N.S, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature immunology*, 2009, 10(4):348-355.
77. Schultz D.R, Harrington WJ, Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 2003, 32(6):345-369.
78. Wei MC, Zong, W. X, Cheng, E. H, Lindsten, T, Ross, A. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)*, 2001, 292(5517):727-730.
79. Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*, 2004, 1644(2-3):125-132.
80. Narita M, Shimizu, S, Ito, T, Chittenden, T. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(25):14681-14686.
81. Marzo I, Brenner, C, Zamzami, N, Jurgensmeier, J. M. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 1998, 281(5385):2027-2031.
82. Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Seminars in cancer biology*, 2004, 14(4):231-243.
83. Mader C. The Biology of Cancer. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 2007, 80(2):91.
84. Norrby K. Angiogenesis: New Aspects Relating to its Initiation and control, 1997, 417-437.
85. Folkman J. Anti-angiogenesis: New Concept for Therapy of Solid Tumors, 1972, 409-416.
86. Papetti M, Herman, I.M., *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. (Mechanism of Normal and Tumor-Derived Angiogenesis), 2002, C947-C970.

87. Kut C, Mac Gabhann F, Popel AS. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *British journal of cancer*, 2007, 97(7):978-985.
88. Carmeliet P, Ferreira, V. Breier, G, Pollefeyt, S, Kieckens, L, Gertsenstein, M. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, 380(6573):435-439.
89. Ziyad S, Iruela-Arispe ML. Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. *Genes & Cancer*, 2011, 2(12):1085-1096.
90. Liem AA, Chamberlain MP, Wolf CR, Thompson A. The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 2002, 28(6):679-684.
91. Plataniotis L.C. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*, 2003, 101(12):4667-4679.
92. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal*, 2000, 351 Pt 2:289-305.
93. Ambrosini G, Adida C, Altieri D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine*, 1997, 3(8):917-921.
94. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed J.C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 1997, 388(6639):300-304.
95. Jaiswal PK, Goel A, Mittal R. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *The Indian Journal of Medical Research*, 2015, 141(4):389-397.
96. Konturek PC, Bielanski, W, Pierzchalski, P. Role of gastrin in gastric cancerogenesis in Helicobacter pylori infected humans. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 1999, 50(5):857-873.
97. Johnson ME, Howerth EW. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Veterinary pathology*, 2004, 41(6):599-607.
98. Sun C, Gunasekera, A. H, Meadows, R. P, Chen, J. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature*, 1999, 401(6755):818-822.
99. Anonymous Advertising. *Journal of Clinical Oncology*, 2016, 34(3):A229-A251.

100. Small S, Keerthivasan G, Huang Z, Gurbuxani S, Crispino J. Overexpression of survivin initiates hematologic malignancies in vivo. *Leukemia*, 2010, 24(11):1920-1926.
101. Chandele A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastry P. Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia*, 2004, (New York, N.Y.) 6(1):29-40.
102. Wang Z, Fukuda S, Pelus L. Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. *Oncogene*, 2004, 23(49):8146-8153.
103. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Journal of Cancer*, 2016, 7(3):314-323.
104. Wilson W, Hay M. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(6):393-410.
105. Duan L, Hu X, Jin Y, Liu R, You Q. Survivin protein expression is involved in the progression of non-small cell lung cancer in Asians: a meta-analysis. *BMC Cancer*, 2016.
106. Song K. Critical role of a survivin/TGF-beta/mTORC1 axis in IGF-I-mediated growth of prostate epithelial cells. *PLoS ONE*, 2013, 8(5):e61896.
107. ERÖZ R, YÜCE H, ÖZMERDİVENLİ R. Survivin Hakkında Bilinenler: Survivin İle İlgili Türkiye’de Yapılmış Olan Çalışmalar. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2015.
108. Altieri D. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(1):46-54.
109. Mandy Wagner<sup>1</sup> KS, Christian Wuchter<sup>2</sup>, Wolf-Dieter Ludwig, Bernd Dörken, Ingo D. *International Journal of Cancer*, 2006, pp 1291–1297.
110. Das B. Boron chemicals in diagnosis and therapeutics. *Future medicinal chemistry*, 2013, 5(6):653-676.
111. Al-Tubuly A. SDS-PAGE and Western Blotting. *Methods in molecular medicine*, 2000, 40:391-405.
112. Robert A. Weinberg R. *The Biology Of Cancer*, 2013, p 960.
113. Razzaghi H, Andall-Brereton, G. Mery, L. Leading Causes of Cancer Mortality - Caribbean Region, 2003-2013. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 2016, 65(49):1395-1400.

114. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2010, 60(5):277-300.
115. Brachman D. Molecular biology of head and neck cancer. *Seminars in oncology*, 1994, 21(3):320-329.
116. Li F, Zhao C, Wang L. Molecular-targeted agents combination therapy for cancer: developments and potentials. *International journal of cancer*, 2014, 134(6):1257-1269.
117. Olsen J, Overvad K. The concept of multifactorial etiology of cancer. *Pharmacology & toxicology*, 1993, 72 Suppl 1:33-38.
118. Bhadury P. *the current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents*, 2006. pp 325–337.
119. Chandini S.K. GP, Suresh P., Bhaskar N. 'Production of Fucoxanthin-Rich Powder from *Cladosiphon okamuranus*', 2011, 1-13.
120. Nishitsuji K. A draft genome of the brown alga, *Cladosiphon okamuranus*, S-strain: a platform for future studies of 'mozuku' biology. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 2016, 23(6):561-570.
121. Xue M. Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 2012, 7(8):e43483.
122. Yoshimoto M, Higaki K, Nanba E, Ikeguchi M. Anti-Proliferation Activity of Fucoidan in MKN45 Gastric Cancer Cells and Downregulation of Phosphorylated ASK1, a Cell Cycle-Regulated Kinase. *Yonago acta medica*, 2015, 58(1):1-7.
123. Chen S, Zhao Y, Zhang Y, Zhang D. Fucoidan induces cancer cell apoptosis by modulating the endoplasmic reticulum stress cascades. *PLoS ONE*, 2014, 9(9):e108157.
124. Lee H, Kim J-S, Kim E. Fucoidan from Seaweed *Fucus vesiculosus* Inhibits Migration and Invasion of Human Lung Cancer Cell via PI3K-Akt-mTOR Pathways. *PLoS ONE*, 2012, 7(11):e50624.
125. Zhang Z, Teruya K, Eto H, Shirahata S. Induction of apoptosis by low-molecular-weight fucoidan through calcium- and caspase-dependent mitochondrial pathways in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2013, 77(2):235-242.
126. Hsu H. Fucoidan inhibition of lung cancer in vivo and in vitro : role of the Smurf2-dependent ubiquitin proteasome pathway in TGFbeta receptor degradation. *Oncotarget*, 2014, 5(17):7870-7885.

127. Abbas T & Dutta A p21 in cancer: intricate networks and multiple activities.  
*Nat Rev Cancer*, 2009, 9(6):400-414.



## 8. EKLER

### EK 1. Özgeçmiş

<b>KİŞİSEL BİLGİLER</b>	
Adı Soyadı	: Kübra KÖSEM (AKBAŞ)
Doğum tarihi	: 14.05.1990
Doğum yeri	: İstanbul
Medeni hali	: Evli
Uyruğu	: T.C.
Adres	:Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Ankara
Tel	: 0 546 489 93 28
Faks	: -
E-mail	: akbas.kbr@gmail.com
<b>EĞİTİM</b>	
Lise	: Pendik Rauf Denктаş Lisesi
Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi (Biyoloji)
Yüksek lisans	: Yıldırım Beyazıt Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik A.B.D.
<b>YABANCI DİL BİLGİSİ</b>	
İngilizce	: 56,25 (2017 -Mart -Yökdil)
<b>ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR</b>	



