

**T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**CELASTROL'ÜN YAĞ ASİTİ SENTAZ YOLAĞI ÜZERİNDEKİ**  
**ETKİLERİNİN HeLa SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDE**  
**TANIMLANMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farangiz GHODRATI**

**9000000877**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zeynep Narçin ÜNSAL**

**MAYIS 2019**

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

CELASTROL'ÜN YAĞ ASİTİ SENTAZ YOLAĞI ÜZERİNDEKİ  
ETKİLERİNİN HELA SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDE  
TANIMLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farangiz GHODRATI

9000000877

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 28 HAZİRAN 2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 28 MAYIS 2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zeynep Narçin ÜNSAL

Juri Üyeler: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN

Prof. Dr. Hülya YAZICI (İstanbul Üniversitesi)

MAYIS 2019

## ÖNSÖZ

Eğitimimin ilk gününden itibaren benden bilgisini ve desteğini esirgemeyen, tez danışmanlığımı kabul ederek beni onurlandıran, bu sürecin en zorlandığım zamanlarında devam edebilmem için beni cesaretlendiren ve motive eden kıymetli hocalarım Prof. Dr. Zeynep Narçın Ünsal ve Prof. Dr. Elif Damla Arısan özellikle şükranlarımı sunuyorum. Prof. Dr. Ajda Çoker Gürkan ve Doç. Dr. Pınar Obakan Yerlikaya hocalarıma da her zaman bana destek verdikleri için teşekkür ederim. Ayrıca bana yol gösteren ve Laboratuvar uygulamalarında bana yardımcı olan Araştırma Görevlisi Pelin Özfiliz Kılbaş, Araştırma Görevlisi Özge Berrak Rencüzoğulları ve Araştırma Görevlisi Halil Özbaşak'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Bana hep güvenen, hayattayken beni bu bölümü okumam için teşvik eden ve hayatını bana ve kardeşlerime adayan canım babam Ghodratollah Ghodrati'ye ve hayatta hep mutluluğumun kaynağı olan annem ve aileme tüm varlığımla minnettarım. Bu yolda beni hiç yalnız bırakmayan arkadaşlarıma ve bana sabır, ilgi, güler yüz, hoşgörü ve anlayış gösteren herkese içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

FARANGİZ GHODRATI

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ABSTRACT .....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. SERVİKS KANSERİ .....	1
1.2. Moleküler Mekanizma .....	2
1.3. CELASTROL'ÜN TANIMLANMASI .....	3
1.4. CELASTROLÜN ANTI KANSER ETKİLERİ.....	4
1.4.1. Celastrol'ün Hücre Ölümünü Aktive Etme Mekanizması .....	4
1.4.2. Anjiyogenezin İnhibisyonu .....	7
1.4.3. İnvazyonun İnhibisyonu.....	8
1.5. CELASTROLÜN ANTI-ENFLAMATUAR ETKİLERİ .....	10
1.6. CELASTROLÜN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ .....	10
1.7. CELASTROLÜN DİĞER HASTALIKLAR ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİLERİ.....	13
1.7.1. Şeker Hastalığı ( <i>Diabetes mellitus</i> ) .....	13
1.7.2. Obezite .....	13
1.7.3. Aterosklerozis .....	14
1.7.4. İşitme Kaybı.....	15
1.8. TOKSİSİTE VE CELASTROL'ÜN SINIRLANMASI.....	15
1.9. YAĞ ASİDİ SENTEZ YOLAĞI.....	16
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER .....	18
2.1. MATERYAL.....	18
2.1.1. Hücre ve Özellikleri .....	18
2.1.2. Kullanılan cihazlar .....	18
2.1.3. Hücre kültürü donanımları .....	18
2.1.4. Kullanılan çözeltiler .....	18
2.1.5. Kullanılan Antikor ve Primerler.....	18
2.2. YÖNTEMLER .....	18
2.2.1. Hücre Kültürü.....	18
2.2.2. Hücre Dondurulması ve Açılması.....	19

2.2.3.	Hücre Canlılığı Testi (MTT).....	19
2.2.4.	Growth Assay (Sağkalım).....	20
2.2.5.	Koloni Oluşum Testi.....	20
2.2.6.	Soft Agar.....	21
2.2.7.	Fluoresan Mikroskopunda Hücre Sağkalım ve Ölümünün Belirlenmesi.....	21
2.2.8.	Protein İfadesinin Belirlenmesi.....	22
2.2.8.1.	<i>Total Protein İzolasyonu</i> .....	22
2.2.8.2.	<i>Bradford Yöntemi</i> .....	22
2.2.8.3.	<i>SDS-PAGE Jel Hazırlaması</i> .....	23
2.2.8.4.	<i>Protein Örneklerin Hazırlanması ve SDS-PAGE Jelin Yürümesi</i> .....	23
2.2.8.5.	<i>Membrana Aktarma ve Blotlama</i> .....	23
2.2.8.6.	<i>Immunoblotlama İçin Birincil ve İkincil Antikorların Uygulanması</i> .....	23
2.2.8.7.	<i>Sonucun ChemiDoc™ Sistemi ile Görüntülenmesi</i> .....	24
2.2.8.8.	<i>Hücrelerde Lipid Birikiminin İncelenmesi</i> .....	24
2.2.9.	Yara İyileşmesi (Scratch testi).....	24
2.2.10.	Hücre Siklusunun Hücre Akış Sitometresi ile İncelenmesi.....	24
2.2.11.	İstatistiksel analiz.....	25
3.	SONUÇLAR.....	26
3.1.	CELASTROL'UN HELA HÜCRE HATLARINDA CANLILIĞA ETKİSİ.....	26
3.2.	CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL KANSERİ HÜCRE HATTINDA SİTOSTATİK ETKİSİ.....	27
3.3.	CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNİN KOLONİ OLUŞTURMA POTANSİYELİNE ETKİSİ.....	28
3.4.	CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL HÜCRE HATLARINDA YARI YUMUŞAK AGAR YÖNTEMİ İLE KOLONİ OLUŞUMUNUN BELİRLENMESİ.....	29

3.5. FLUORESAN MİKROSKOBUNDA HÜCRE SAĞKALIM VE ÖLÜMÜNÜN BELİRLENMESİ.....	30
3.6. CELASTROL'ÜN HELA SERVİKAL KANSERİ HÜCRELERİNDE HÜCRE DÖNGÜSÜNE ETKİSİ.....	32
3.7. CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL KANSERİ HÜCRELERİNDE LİPİD METABOLİZMASINA ETKİSİ .....	34
3.8. CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL HÜCRELERİNDE LİPİD BİRİKİMİNE ETKİSİ.....	35
3.9. CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDE İNVAZİV VE METASTATİK ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ.....	35
3.10. CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL KANSERİNDE HÜCRE DÖNGÜSÜNE OLAN ETKİSİNİN HÜCRE AKIŞ SİTOMETRESİ İLE BELİRLENMESİ .....	37
4. TARTIŞMA.....	39
5. KAYNAKLAR.....	45

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.1. Celastrol'ün yapısı.....3  
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/celastrol#section=Top>) .....3
- Şekil 1.2. Tümör anjiyogenezi .....8
- Şekil 1.3. Metastaz olayının evreleri. Metastaz bir seri evreler şeklinde karakterize edilmektedir: Primer tümör oluşumu, anjiyogenezi ile kan damarında konumlanma, kanser hücrelerinin lokal dokuda invazyonu ve kan damarı içine girmesi. Yayılan hücreler kan dolaşır ve uygun sekonder yere örneğin kemiğe ulaşır, bunun için kan damarı içine girmesi. Yayılan hücreler kan dolaşır ve uygun sekonder yere örneğin kemiğe ulaşır, bunun için kan damarından dışarı çıkar ve kolonize olarak kemikte metastaz yapar (Amber v.d. ., 2017, değiştirilerek). .....8
- Şekil 1.4. Celastrolün androjene bağımsız prostate kanseri üzerine olan etkisi. 9
- Şekil 1.5. Celastrolün romatoid artrit tedavisindeki sinyal iletimi ilişkileri. ....12
- Şekil 1.6. HSF1 yağ dokusu ve kasta PGC1 bağımlı metabolik programın aktivasyon yoluyla enerji harcamasını düzenlemesi. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.005>). .....14
- Şekil 1.7. Yağ asit sentaz yolağı. ACC: Asetil-COA karboksilaz; ACL: ATP sitrat liyaz; FAS: Yağ asidi sentaz; MCD: malonil-COA dekarboksilaz (Lopez v.d. ., 2005, değiştirilerek). .....16
- Şekil 3. 1. Celastrol'ün HeLa hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile belirlenmesi. HeLa hücreleri, 10000 hücre/kuyucuk yoğunluğunda 96 kuyucuklu mikropelatelere eklendi. Hücreler, 24 saat boyunca 0-1 mikrogram Celastrol konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. Kolon grafik, 8 biyolojik kopya içeren en az 4 tekrarlı deney sonuçlarını göstermektedir. Ortalama  $\pm$ Std. Dev. Seçilen Celastrol konsantrasyonlarında T-testi uygulandı; \*\*\*\* p<0.0001.
- Şekil 3.2. Celastrol'ün HeLa Servikal kanser hücre hattında sitotoksik veya sitostatik etkiye aracılık eder. HeLa hücreleri, 50000 yoğunluğunda 6 kuyucuklu kaplara ekildi. 0, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde hücreler seçilen Celastrol

konsantrasyonlarına maruz bırakıldı (0.075 ve 1  $\mu$ M). Grafikler ortalama  $\pm$  Std. Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. ....27

Şekil 3.3. Celastrol'ün Hela hücrelerinde koloni oluşumuna etkisi. HeLa 1000 yoğunluğunda 6 kuyucuklu kaplara ekildi. Hücreler 24 saat boyunca seçilen Celastrol konsantrasyonlarına (0.075 ve 1  $\mu$ M) maruz bırakıldı. Daha sonra, taze besiyerle değiştirildi ve koloni oluşumu için 8 gün beklenildi. Daha sonra kolonilere zarar vermeden besiyer atıldı ve hücreler oda sıcaklığında 5 dakika boyunca metanol ve asetik asit (3:1) ile sabitlendi. 1X PBS ile yıkandıktan sonra, hücreler 15 dakika boyunca kristal viyole ile boyandı, daha sonra fazla boya dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. ....28

Şekil 3.4. Yumuşak agar yöntemi ile koloni oluşumunun belirlenmesi. 6 kuyucuklu petri kaplarına %0,5 lik agaroz ve besiyer karışımı eklenip ve dondurduktan sonra üzerine %0,3 lik agaroz ve hücre ve besiyer karışımı ekleyip ve kuyucuklara Celastrol uygulandı ve 10 gün boyunca besiyeri yenilendi ve Hela servikal kanser hücreleri daha sonra floresan mikroskopta görüntüledi. Sonuçta Celastrolün kontrole oranla yoğunluğa bağlı olarak koloni oluşumunu azalttığı saptandı.....29

Şekil 3.5. Floresan mikroskobunda hücre sağkalım ve ölümünün belirlenmesi. Hücreler 3 farklı boya ile boyandıktan sonra Celastrol uygulaması yapılan hücreler doza bağlı olarak hücre canlılığını azaltmaktadır. 1 $\mu$ M Celastrol uygulamasında HeLa hücrelerinin canlılığı kayda değer bir şekilde azalmıştır. Floresan mikroskobunda 20X büyütme kullanılmıştır.....31

Şekil 3.6. Celastrol HeLa servikal hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna etkisi. DCFDA2H boya ile hücre içindeki hidroksil ve diğer reaktif oksijen türlerini (ROS) aktivitesini ölçen bir boyadır. Floresan mikroskopta 400x büyütme kullanılmıştır. ....32

Şekil 3.7. Celastrol'ün HeLa servikal kanseri hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi. Hela hücreleri 24 saat boyunca 0,075  $\mu$ M ve 1 $\mu$ M Celastrol ile muamele edildikten sonra protein izolasyonu yapıldı ve %12'lik SDS jelde yürütülüp ve PVDF membran üzerine transfer edilerek primere antikorlarının bağlanması sağlandı ve sonra primerde ve sonra sekonderde bekletip ve sonuçlar Chemidoc MP cihazı ile görüntülendi.  $\beta$ -actin kontrol olarak belirlenmiştir.....33



Şekil 3.8. Celastrol'ün HeLa servikal kanser hücrelerinde lipid metabolizma yollarının etkisi. %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek primere antikorlarının bağlanmasını sağladı ve Chemidoc MP cihazı ile görüntülendi. B-aktin kontrol olarak kullanıldı.....	34
Şekil 3.9. Celastrol'ün HeLa servikal kanser hücrelerinde lipid metabolizma yollarının etkisi. %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek primere antikorlarının bağlanmasını sağladı ve Chemidoc MP cihazı ile görüntülendi. B-aktin kontrol olarak kullanıldı.....	35
Şekil 3.10. Celastrol'ün HeLa servikal kanseri hücrelerinde yara İyileşmesi üzerine etkisi. Kontrol ve 2 farklı doz ilaç uygulanan HeLa hücreleri 24 ve 48 saatlerde ışık mikroskop ile görüntülendi. Kontrolün yara iyileşmesi 48 saat sonra %60 iyileşme görünürken, ilaç uygulanan hücrelerde farklı sonuç elde edilmiştir. 0,075 µM celastrol uygulandığında 0-48 saat içerisinde yara iyileşmesi %50 oranında görülürken 1µM celastrol HeLa hücrelerinde 0-48 saat sonra azalıyor ve yara iyileşmesinde azalma olmamaktadır.....	36
Şekil 3.11. Celastrol'ün HeLa servikal kanser hücrelerinde, hücre döngüsüne olan etkisinin hücre akış sitometresinde analiz edilmesi. Celastrol 0.075 µM ve 1 µM konsantrasyonlarda uygulandı.....	38

## TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Hücre akış sitometresinde Celastrol'un farklı konsantrasyonlarının hücre döngüsünün farklı evrelerindeki etkileri.

Tablo 6.1. Kullanılan cihazlar.

Tablo 6.2. Hücre kültürü donanımları.

Tablo 6.3. Kullanılan kimyasal maddeler.

Tablo 6.4. Çalışma kapsamında kullanılan antikor ve primerler

Tablo 6.5. SDS PAGE %12 jel içerikler (2 jel için)

## KISALTMALAR

AR	:	Androjen reseptörü
ACC	:	Aseti koenzim A karboksilaz
ACL	:	ATP sitrat sentaz
ATF4	:	Aktive edici transkripsiyon faktörü
AMPK	:	AMP aktive protein kinaz
AIPC	:	Androjene bağımsız prostat kanseri
Akt/PKB	:	Protein kinaz B
CDK	:	Sikline bağımlı kinaz
CHOP	:	C/EBP homoloji proteini
CIN	:	Servikal intraepitelyal neoplazi
CSC	:	Kanser kök hücresi
Dm	:	Diabetes mellitus
DMEM	:	Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
eIF2	:	Ökaryotik başlatma faktör 2
EPC	:	Endotelyal progenitor hücreler
ER	:	Endoplazmik retikulum
ERB2	:	Reseptör tirozin-protein kinaz
FAS	:	Yağ asidi sentaz
FBS	:	Fetal sığır serumu
FDA	:	Food and Drug Administraion

FLSs	:	Fibroblast benzeri sinoviyositler
GSK3 $\beta$	:	Glikojen sentaz kinaz 3-beta
HIF-1 $\alpha$	:	Hipoksia inducible faktör 1 alfa
HFD	:	Yüksek yağlı diyet
HPV	:	İnsan papilloma virüsü
HSP	:	Isı şoku proteini
HSF-1	:	Isı şoku transkripsiyon faktörü 1
JNK	:	c-Jun N-terminal kinaz
KRAS	:	Kirsten rat sarkoma virüsü
LDL	:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
MAPK	:	MAP Kinaz
MMP	:	Matriks metaloproteinazları
MSZ	:	Mitondriyal solunum zinciri
MTT	:	(3-(4,5-Dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür)
NF- $\kappa$ B	:	Nükleer faktör kappa B
NO	:	Nitrik oksit
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
PBS	:	Fosfat tamponu salin
PI	:	Propidyum iyodür
PIK3CA	:	Fosfatidilinositol 3-kinaz katalitik alt ünitesi
PVDF	:	Polivinil florür
PGC1 $\alpha$	:	Peroksizom proliferator aktive eden reseptör alfa 1
RA	:	Romatoid artrit
ROS	:	Reaktif oksijen türevi

- SDS : Sodyum Dodesil Sulfat
- SDSPAGE: Sodyum dodesil sulfat poliakrilamid jel elektroforezi
- SOD : Süper oksit dismutaz
- TBS : Tris tamponu
- TNF2 : Tümör nekroz faktörü
- UPR : Doğru katlanmamış protein cevabı
- VEGF : Vaskular endotelyal büyüme faktörü



## ÖZET

Rahim ağzı kanseri serviksten kaynaklanmaktadır. Hücrelerin anormal çoğalması sebebi ile vücudun diğer kısımlarına yayılma söz konusudur. İnsanlarda bu hastalığın % 90 ında sebep papillomavirus enfeksiyonudur (HPV), çoğu insanda HPV enfeksiyonu olmakla birlikte serviks kanseri görülmez. Diğer risk faktörleri, sigara içmek, zayıf bağışıklık sistemi, doğum kontrol ilaçları, genç yaşta cinsel yaşama başlama ve çok eşlilik fakat bunlar hastalık gelişiminde daha az önem taşımaktadır. Tüm dünyada ölüm nedenlerinin serviks kanseri kadınlarda dördüncü sırada yer almaktadır.

Celastrol *Tripterygium wilfordii* bitkisinin köklerinden izole edilen bir kimyasaldır ve pentasiklik triterpenoiddir. Terpenoidler terapötik yönden aktif bitkisel kökenli maddelerdir ve kansere, kardiyovaskular ve nörodejeneratif rahatsızlıklara karşı kullanılmaktadır. Celastrol'ün hücrede sinyal yollarını modifiye etmesine ilişkin pek çok çalışma yapılmıştır. Celastrol'ün hücre çoğalmasını engellediği bulunmuş ve bu etkisi pro-apoptotik, anti-anjiyogenik, anti-metastatik ve anti-enflamatuvar aktivitelerle uyumluluk içindedir.

Bu çalışmanın amacı Celastrol'ün HeLa servikal kanseri hücre hatlarında yağ aside sentezi yolağına olan etkisini belirleyebilmektir. Bu nedenle önce Celastrol'ün hücre canlılığına olan etkisi doz ve zamana bağlı olarak belirlendi. Daha sonra Celastrol'ün apoptotik ve sağkalım yolaklarına olan etkileri moleküler düzeyde belirlendi ve bu veriler mikroskopik düzeyde elde edilen verilerle teyit edildi. Ayrıca Celastrol'ün reaktif oksijen türlerinin oluşumuna, hücre döngüsünün çalışmasına, yara iyileşmesine ve lipid sentez yolağına olan etkileri de araştırıldı.

Celastrol 0.01-1.0  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında HeLa servikal kanser hücrelerine uygulandığında doza bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı belirlendi ve bu araştırmada 0.075  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  dozları kullanılarak sitotoksik veya sitostatik etkiye aracılık ettiği saptandı. Celastrol'ün farklı dozlarına 24 saat maruz bırakılan hücrelerin 1  $\mu\text{M}$  uygulamasında koloni oluşumunun kayda değer bir şekilde engellendiği görüldü.

HeLa hücrelerine Celastrol ilacı uygulandığında ilaç dozuna bağlı olarak kontrol hücreleri ile kıyaslandığında hücre canlılığının azaldığı bulundu, en fazla azalmanın 1  $\mu$ M Celastrol uygulanan hücrelerde olduğu belirlendi. Daha sonra Dioc6 boyama yapılarak floresan mikroskopta aynı bulgular doğrulandı. Bunu ardışık DNA kırıklarının, dolayısı ile apoptotik hücreleri belirlemek amacı ile HeLa servikal kanser hücrelerine DAPI boyama yapıldı ve 1 $\mu$ M Celastrol uygulanan hücrelerde apoptozun teşvik olduğu gözlemlendi. Daha sonra reaktif oksijen türlerinin aktivitesini belirleyebilmek amacı ile DCFDA2H boyama yapılarak ilaç uygulandıktan 24 saat sonra Celastrol'ün doza bağlı olarak (1  $\mu$ M), reaktif oksijen türlerini arttırdığı gözlemlendi. Buna ilave olarak 1  $\mu$ M Celastrol'e maruz kalan hücrelerde p27 ve siklin E2 engellendiği belirlendi bu bulgu da hücre döngüsünde G1/S fazının aktivasyonunun önlenmesi anlamına gelmektedir. Öte yandan CDK 6, CDK 4, CDK 2 de doza bağlı olarak daha az etkilenme olduğu görüldü. Celastrol'ün siklin A1 üzerinde doza ve zamana bağlı olarak etkisinin olmadığı da saptandı. Celastrol'un lipid metabolizmasına olan etkisini servikal kanser hücrelerinde belirlemek amacı ile yağ asidi bağlayıcı protein 4 ün Celastrol'ün dozuna bağlı olarak arttığı saptandı. Perilipin ise en iyi karakterize edilmiş lipid damlacıkları ile uyumlu bir proteindir ve lipoliz regülasyonunda kritik rol oynamaktadır ve bu çalışmada kayda değer bir etkisi belirlenmedi; C/EBP $\alpha$  ve Asetil CoA miktarında ise ilacın dozuna bağlı olarak kayda değer olmamakla birlikte bir artışa neden olduğu saptandı. Celastrol'ün invaziv ve metastatik karakterlerinin belirleyebilmek için yara kapanma deneyi yapıldı ve 24 saat 1  $\mu$ M Celastrol uygulaması yapıldığında yara iyileşmesi görülmedi ve zamanla yara açılması arttı, çünkü hücreler ilaç etkisiyle apoptoza eğilim göstermişlerdir ve 48 saat sonra 1  $\mu$ M ilaçlı hücrelerde hücrelerin çok azaldığı görülmektedir. HeLa hücrelerine Celastrol ilacı uygulandığında ilaç dozuna bağlı olarak kontrol hücreleri ile kıyaslandığında hücre canlılığının azaldığı gösterildi, en fazla azalma 1  $\mu$ M Celastrol uygulanan hücreler olarak belirlendi. Bu bulgulara ek olarak Celastrol HeLa hücreleri üzerinde

doza bağlı olarak lipid damlacıklarının oluşmasında azalmaya neden oluşu da saptandı. 0,075  $\mu\text{M}$  ve 1 $\mu\text{M}$  Celastrol'ün 24 saat uygulamasının hücre döngüsü üzerine olan etkisini göstermek için hücre akış sitometrisi analizi gerçekleştirildi. Kontrol, 0,075  $\mu\text{M}$  Celastrol ve 1 $\mu\text{M}$  Celastrol ile kıyaslandığında G0/G1 fazındaki hücreler arasında kayda değer bir fark belirlenemezken, S fazı hücrelerinde kontrole kıyasla 1  $\mu\text{M}$  Celastrol uygulamasında % 29 oranında bir artış saptandı. G2/M fazındaki hücrelerde de kontrole oranla 0.075 uygulamasında % 25 artış bulunurken, 1  $\mu\text{M}$  uygulamasında % 19 azalış belirlendi. SubG1 analiz edildiğinde ise 0.075 Celastrol uygulandığında 2 kat artış belirlenirken 1  $\mu\text{M}$  uygulandığında kayda değer bir fark belirlenememiştir. Özetle 0.075 Celastrol uygulamasında apoptoz tetiklenmiş, fakat diğer uygulamalarda ise kayda değer bir farklılık olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak Celastrol servikal kanserin başlamasında, ilerlemesinde kayda değer rol oynamaktadır ve bu nedenle yeni terapötik stratejilerin tasarlanmasında önemli bir hedefdir. Bu alanda daha detaylı araştırmalara gereklilik vardır.



## ABSTRACT

Human papillomavirus infection is the main reason of cervical cancer. Cervical cancer occurs when the cells of the cervix grow abnormally and spread over to the other organs of the body. If it is invasive, this cancer affects the deeper tissues of the cervix. Celastrol isolated from root extracts of *Tripterygium wilfordii* and is a triterpenoid. These chemicals are therapeutically active phytochemicals to treat cancer, cardiovascular and neurodegenerative disorders. It is well estimated that celastrol can regulate different cell signaling pathways. Celastrol causes weight loss in animal models of obesity but the mechanisms of its effects is not clear yet. Celastrol's anti-angiogenic, anti-metastatic and anti-inflammatory activities detected and these affect closely correlated with its anti-proliferative effects.

The purpose of this study is to establish Celastrol effect on fatty acid synthesis pathway in HeLa cell lines. Therefore, first we targeted to reveal the role of Celastrol on cell viability depending on dose and time parameters. Then we established Celastrol effects on apoptotic and survival pathways by molecular and microscopic levels. Besides we tried to survey Celastrol's mode of action on reactive oxygen species formation, cell cycle progression, wound healing and lipid analyses.

Celastrol at 0.01-1.0  $\mu\text{M}$  treatments cell viability decreased depending dose and time applications and we determined the cytotoxic and cytostatic effects by using 0.075  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$  doses. Besides 1  $\mu\text{M}$  Celastrol inhibited the colony formation significantly and we confirmed viability inhibition by Dioc6 staining procedure also. Then we applied DAPI staining to be able the DNA ladders that is represent apoptosis and we observed apoptosis stimulation at 1  $\mu\text{M}$  Celastrol treatment. Later we determined the increased ROS formation by DCFDA2H staining after 24-hour Celastrol treatment. P27 and cyclin E inhibited in 1  $\mu\text{M}$  Celastrol treated cells, that means G1/S phase activation of cell cycle prohibited and CDK 6, CDK 4, CDK 2 not effected significantly. Celastrol also was not effective on A1 cyclin depending on dose and time dependent manner. We also searched the Celastrol effect on lipid metabolism in HeLa cervical cell lines and we established increment in fatty acid binding protein 4 in dose-dependent

manner. Perilipin is lipid droplet-associated protein and play a role in lipolysis regulation, did not determined significant difference after Celastrol application, but we found slight stimulation C/EBP $\alpha$  and Acetyl CoA contents. Next step was to apply wound healing procedures to be able to establish the invasive and metastatic characteristic of Celastrol and 1  $\mu$ M Celastrol after 24 hours and we did not found wound healing effect and cells were tend to apoptosis and cell amount were decreased by the Celastrol treatment after 48 hours. Celastrol also caused to decrease lipid droplet formations in HeLa cervical cell lines. We also realized flow cytometry analysis to be able to show 0,075 and 1  $\mu$ M Celastrol effect on cell cycle. There was no difference at G0/G1 cell numbers in 0.075 and 1  $\mu$ M Celastrol treated cells, compare to the control condition. However, we established by 29% increase in S phase cell numbers compare to the control; this ratio was 25% for G2/M phase cells. When we treated 0.075  $\mu$ M Celastrol we found 19% decrease in SubG1 cells and no significant difference by 1  $\mu$ M treatment. In conclusion, Celastrol caused to apoptosis stimulation.

In summary, it is very important to understand Celastrol effect on cervical cancer molecular mechanism to design effective therapeutic strategies therefore, we need further researches.

# 1. GİRİŞ

## 1.1. SERVİKAL KANSER

Serviks kanseri kadınlarda meme, kolon ve akciğer kanserlerinden sonra en çok görülen dördüncü kanserdir ve aynı zamanda kanserle ilgili olarak ölümlerle sonuçlanan dördüncü kanser tipidir. Verilere göre 2018 yılında 570 000 yeni tanı, 311 000 ölüm belirlenmiştir. Son yıllarda serviks kanseri hastalarının daha genç yaşlarda oldukları saptanmıştır. Bununla birlikte serviks kanseri oranı gelişmekte olan ülkelerde kadınlar arasında tarama işlemlerinin artması ve HPV (Human Papillomavirus) aşılama nedenleri ile giderek azalmaktadır, fakat daha az gelişmiş ülkelerde en önemli ölüm nedenlerinden birisidir (Siegel v.d. ., 2018) . Gelişmemiş ülkelerde sağkalım süresi 5 yıl iken, ilerlemiş evrelerdeki serviks kanseri hastalarının sağkalım oranı %50 den azdır. Bu nedenle de serviks kanserinin moleküler mekanizmasına ilişkin araştırmalar giderek artmaktadır (Lin v.d. ., 2019).

Serviks kanserinin oluşması ve gelişmesi ile ilgili olarak sigara içilmesi, bağışıklık baskılanması, çok sayıda hamile kalma ve HPV enfeksiyonu gibi pek çok faktör saptanmıştır ve patogenezi oldukça karmaşıktır (Bray v.d. ., 2018). Servikal karsinogenez genellikle yüksek riskli HPV tiplerinin, özellikle tip 16 ve tip 18 in enfeksiyonu ile oluştuğu saptanmıştır ve 100 kadar HPV tipi mevcuttur, dolayısı ile servikal kanserin tanısı açısından virüsün tipine belirlemek önem arz etmektedir. Epidemiyolojik veriler HPV16 ve HPV18 in servikal kanser ile uyumlu olduğunu ortaya koymuştur (Cox, 2006). Yüksek riskli HPV enfeksiyonu her zaman yüksek dereceli servikal intraepitelyal neoplazi (CIN) gelişmesi ve servikal kanser oluşması için sebep değildir. HPV enfeksiyonu immun sistem ile yakından ilişkilidir. HPV enfeksiyonlarının sadece küçük bir kısmı konak genom ile entegredir, anormal gen yapısı, işlevi ve malignant transformasyon söz konusudur (Mungar v.d., 2004; Senapati v.d. ., 2016).

## 1.2. SERVİKAL KANSERİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

Giderek artan veriler HPV enfeksiyonunun karsinogenez oluşturma nedenlerini ortaya koymaktadır (Zhang v.d. ., 2018). 2 viral onkoprotein E6 ve E7 HPV enfeksiyonunun servikal kanserlerde kilit rol oynadığı gösterilmiştir. Viral genom, konağın genomu ile entegre olduğu zaman E6 ve E7 up-regüle olmakta ve hücre sinyal yolundaki kritik proteinlerin regülasyonu bozulmaktadır, örneğin p53 ve pRb gibi iki önemli supresor proteini inhibe olmaktadır (Oyervides-Munoz ve ark., 2018). Lau ve ark. (2017) E7 yi içeren DNA tümör virüs onkogenlerinin cGAS-STING DNA-duyarlı yolağa bağlanıp baskıladığını göstermişlerdir. Bu veriye ek olarak PI3K yolağının kilit proteini PIK3CA (fosfatidilinositid-3- kinaz katalitik alt ünitesi  $\alpha$ ), KRAS ve EGFR (Epidermal büyüme faktörü reseptörü) de mutasyona nedene olduğu bulunmuştur (Wright ve ark., 2013). Zamanımızda serviks kanserinin tedavisinde cerrahi müdahale, radyoterapi ve platin bazlı kemoterapi kullanılmaktadır (Bhatla ve ark., 2018).

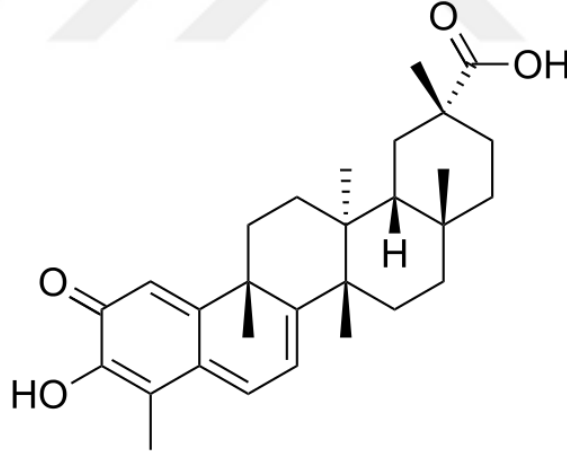
Erken evrelerde olan serviks kanseri tedavisinde cerrahi müdahale yayılmanın durumuna göre uygulanmaktadır. Radyoterapi pivotal rol oynar, sadece lokal olarak ilerlemiş kanserlerde değil, aynı zamanda operasyon sonrasında da uygulanmaktadır. Son yıllarda bir seri sistemik tedavi yapılmaktadır, örneğin platin bazlı kemoterapi ve FDA onaylı pembrolizumab kullanılmaktadır (Marshall ve ark., 2018) Bununla birlikte kemoterapik tedavide duruma göre kombinasyonel tedavi sıklıkla yapılmaktadır, carboplatin, cisplatin, paklitaksel ve bevacizumab karışımı kullanılmaktadır (Marquina ve ark., 2018). Tarama ve gelişmiş terapötik stratejiler serviks kanserinde sağkalım süresini artırmakla birlikte, bazı hastalar hala metastas ve ilaç direnci nedeni ile ölmektedir. Hiç şüphesiz HPV aşısı serviks kanserini engellemektedir, fakat gelişmemiş ülkelerde ekonomik nedenlerle aşıya ulaşmak mümkün olmayabilmektedir. Bu nedenle servikal kanserinin gelişmesi ve ilerlemesi ile ilgili moleküler mekanizmaları anlamak önem arz etmektedir, böylelikle yeni moleküler tanı yöntemleri ve sistemik uygulamalar mümkün olabilecektir.

### 1.3. CELASTROL'ÜN TANIMLANMASI

Celastrol, *Tripterygium wilfordii* ve *Celastrus regeli* bitkisinin köklerinden izole edilen bir penta siklik triterpenoidir (Şekil 1).

*In vitro* ve *in vivo* araştırmalarda Celastrol'ün anti kanser, antioksidan (böcek öldürücü, anti-inflamatuar, aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir (Venkatesha v.d. ., 2011) Celastrol hücre çoğalma ve göçünü inhibe etmektedir (Wu v.d. ., 2017).

Celastrol sitokin salınımıyla, lipit peroksidasyon inhibitörü ve Alzheimer'e karşı etkiler göstermektedir (Sassa v.d. ., 1990). Celastrol'ün aynı zamanda hipotalamusda yer alan hücrelerde NF-κB'ye ket vurduğu, diyabetik nefropatide anti diyabetik etkiyi gösterebileceği ve tüm vücutta insülin direncini düzelittiği bulunmuştur (Abu Bakar v.d. ., 2015). Ayrıca, Celastrol bir çok onkogeni, tümör inhibe edici genleri ve vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü etkileyebilmektedir (Huang v.d. ., 2008).



Şekil 1.1. Celastrolun yapısı.

#### 1.4. CELASTROLÜN ANTI KANSER ETKİLERİ

Birçok kronik hastalıkta modern tedaviler yetersiz ve maliyeti fazla olduğundan dolayı başarısız olmaktadır. Bu nedenle kombinasyon tedavisi ön plana çıkmaktadır. Geleneksel tedaviler binlerce yıl olmasına rağmen etki mekanizmaları tanımsız kalmıştır. Celastrol geleneksel Çin tıbbında (Thunder Vine/un Tanrısı) tanımlanan ve kronik hastalıkların ve kanserlerin tedavisinde kullanılan bir bitkisel ilaçtır (Calixto v.d. ., 2004). Kanser metabolik bir sendromdur ve ölüm nedenlerinden biridir (Zhang v.d. ., 2017). Farklı kanser hücre hatlarından veya *in vivo* kanser modellerinden gelen veriler, Celastrol'un anti kanser özelliklerinin aşağıdaki durumlara atfedilebileceğini öne sürmektedir. Bu amaçla üç ayrı alt başlıkta Celastrol'un etkileri modellenmiştir.

1. Hücre Ölümü Aktivasyonu (Yoon v.d. ., 2014)
2. Anjiyogenezin İnhibisyonu (Semenza, 2003)
3. İnvazyonun İnhibisyonu (Li, 2012)

##### 1.4.1. Celastrol'un Hücre Ölümünü Aktive Etme Mekanizması

Celastrol kanser hücrelerinin kötü ilerleyişini, inhibe etme potansiyelindedir. Bu etkisi birçok hücre hattında gösterilmiş ve apoptotik ölümü tetikleyerek etki gösterdiği belirlenmiştir. Örnek olarak akciğer, meme, özofarinks, glioblastoma, prostat, hepatoma, miyeloma, pankreas, kolon, karaciğer, melanoma, lösemi, osteosarkom ve gastrit kanserleri verilebilir (Shia v.d. ., 2015). Celastrol HeLa servikal kanser hücrelerinde, hücre çoğalmasını inhibe etmekte ve eş zamanlı olarak apoptozu tetiklemektedir. Ayrıca Celastrol'un bu etkisi doza bağımlı olarak değerlendirilmiştir (Feng v.d. ., 2013). Antioksidan proteinlerin sinyal yolağı ile etkileşimleri reaktif oksijen (ROS) oluşmasını azaltır (Islam v.d. ., 1997). Celastrol ROS sinyal iletimini ve gen ekspresyonunu düzenlemekte ve nükleik asitlerin, proteinlerin ve lipidlerin oksidatif hasarına sebep olmaktadır (Pan v.d. ., 2009). Bu nedenle ROS artışı ile hücre proliferasyonu ve apoptoz etkilenmektedir; sitokrom c salınması artmakta ve ROS düşük düzeyde hücre sağkalımını ve çoğalmasını tetiklemektedir (Fleury v.d. ., 2002).

Celastrol'un uyardığı hücre ölümü kayda değer bir şekilde otofaji ve apoptoz inhibitörleri tarafından geri çevrilmektedir. Ayrıca apoptoz inhibisyonu otofajiyi teşvik etmekte ve otofaji inhibitörleri apoptozu azaltmaktadır. Celastrol aynı zamanda c-Jun N-terminal kinazların (JNK) aktivasyonuna ve ROS üretimini uyarmaktadır (Guo v.d. ., 2015). Sonuç olarak Celastrol tümör ROS birikimini *in vivo* da baskılamakta ve JNK sinyal yolağını uyarmaktadır. Bu nedenlerle hücre döngüsü tutulmakta apoptoz ve otofaji indüklenmektedir.

Celastrol'un negatif düzenleyici etkiye sahip mikro RNA'ları (mi RNA lar) etkileyerek otofajiye neden olduğu androgen reseptörü (AR) pozitif prostat kanser hücrelerinde belirlenmiş ve AR/mir-101 eksenini engelleyerek otofajiyi tetiklediği gösterilmiştir (Peng, 2010)). Hücre döngüsünde p23 ve Cdc37 önemli moleküllerdir ve bu döngüde yer alan HSP90'ın (ısı şok protein) ko-şaperon etkisini değiştirmektedir (Zhang v.d. ., 2008). Celastrol pankreas kanseri hücrelerinde HSP90 ve Cdc37 etkileşimini bozmakta ve anti kanser etkisi göstermektedir (Kannaiyan v.d. ., 2011). Buna ilave olarak kanser hücrelerinde farklı apoptotik yolları tetiklemektedir: üçlü negatif meme kanserinde, melanoma hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyon ve P13K/AKT/mTOR yolağının inhibisyonuna neden olmaktadır (Raja v.d. ., 2011). Bu verilere ek olarak Kim v.d. (2013) meme kanseri hücrelerinde reseptör tirozin kinaz ErbB2 nin ve östrojen reseptörlerinin Celastrol tarafından de stabilize edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca Celastrol meme kanseri hücre hattında AMP nin aktive protein kinaz (AMPK) ve polo benzeri kinaz 2 (PLK-2) yolağını indüklemektedir. Celastrol bu verilere ek olarak meme ve kolon kanserlerinde ölüm reseptörlerinin up-regülasyonuna neden olmakta ve tümör nekroz faktör 2 (TNF2) bağlı apoptozu tetikleyen ligandı (TRAIL) indükleyerek apoptozu arttırdığı da gösterilmiştir (Sung v.d. ., 2010). Celastrol gastrik kanser hücre hatlarında ve xenograftlarda da fosforile AKT, mTOR ve S6K 1 azalmakta ve AMP ile aktive AMPK fosforilasyonunda artışa neden olmaktadır (Lee v.d. ., 2014). Mitokondriyal solunum zinciri (MSZ) kompleksinin inhibisyonu ve sonuçta ROS birikimi ile küçük hücreli olmayan akciğer karsinomasında, karaciğer kanseri, osteosarkom ve hepatocellular karsinom hücre hatlarında Celastrol ölümü tetikleyici etki göstermektedir (Yu v.d. ., 2015).

Celastrol'un bir diğer etkisi küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde Fas/Fas ligand yolağının aktive etmesidir (Mou v.d. ., 2011). Bir diğer kanser tipi HL-60 lösemi hücrelerinde de topoizomeraz II'nin inhibisyonuna neden olarak etkin olmaktadır (Nagase v.d. ., 2003).

Mitokondriyal dengesizlik, kaspazların aktivasyonu ve AML1-ETO/c-Kit onko proteinin down-regülasyonu gibi birçok sinyal yolağı ile etkileşime girerek apoptotik mekanizma üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Yu v.d. ., 2016). Celastrol hepatoselüler karsinomada da STAT3/Janus kinaz 2 (JAK2) inhibisyonuna neden olmakta, AML hücrelerinde ise Myc inhibisyonu yolu ile hücre sağkalım mekanizmasını engellediği ve böylece apoptoza neden olduğu, doğru katlanmamış protein cevabı (UPR), endoplazmik retikulum (ER) stresi gibi etkileri belirlenmiştir. ER stres ile birlikte, PERK ökaryotik başlatma faktör 2 (eIF2), aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF4), C/EBP homoloji proteini (CHOP) gibi hedeflerin Celastrol muamelesinde değiştikleri de saptanmıştır (Fribley v.d. ., 2014).

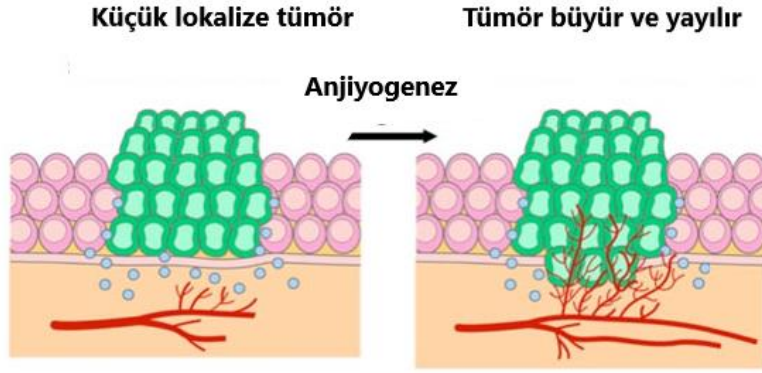
Bu araştırmada kullanılan HeLa servikal kanser hücreleri ile yapılan diğer literatür çalışmalarında Celastrol, glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3) düzeylerinin azaltıcı etki gösterdiği saptanmıştır. Celastrolün ayrıca prostat kanseri hücrelerinde, AR ve NF-κB gibi güçlü transkripsiyon faktörleri ile sinyal kaskadları üzerinde etki gösterdiği de belirlenmiştir. Bu duruma örnek olarak, Celastrol miR-146a ifadesinin artmasını tetikleyerek, gastrik kanserlerde NF-κB aktivitesinin bastırılmasına neden olmaktadır (Baud v.d. ., 2009). NF-κB'nın aktivasyonu, p50/p65 heterodimerinin, hücrelerin IκB kompleksinin inhibitöründen salınması yoluyla gerçekleşmektedir.

Son yıllarda araştırmalar Celastrol'un NF-κB aktivasyonunu engelleyerek farklı tümörlerde apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir (He v.d. ., 2009). Otofaji ve apoptoza ilave olarak Celastrol programlanmış hücre ölümü tiplerini de tetikleyebilmektedir. Celastrol uygulamasına takiben mitokondriyal Ca<sup>2+</sup> uniporter aracılı ER'den indüklenen inositol trisfosfat reseptörü (IP3R) ile Ca<sup>2+</sup> salınımına neden olmaktadır, bu nedenle Celastrol'un etki mekanizmalarının kanıtlanması ilgi odağı olmaktadır (Yoon v.d. ., 2014).



### 1.4.2. Anjiyogenezin İnhibisyonu

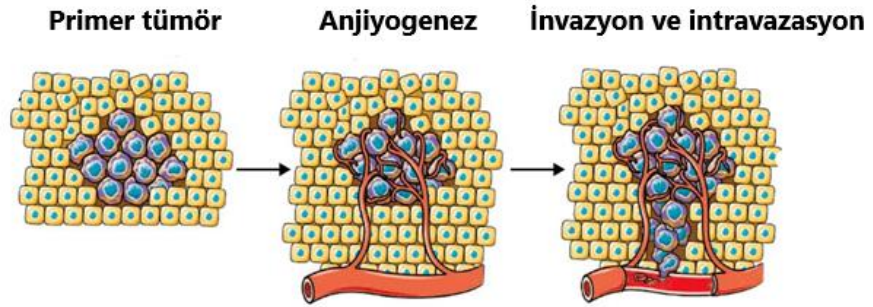
Anjiyogenez yeni damarların oluşması, gelişmesi anlamındadır (Fotsis v.d. ., 1994). Literatürde anjiyogenez açıklamasında, anjiyogenezin büyüme faktörleri, sitokinler ve reseptörlerin rol oynadığı karmaşık bir olay anlamına geldiği belirtilmektedir (Konukoglu, 2005). Celastrol daha önce de belirtildiği gibi *Trypterigium wilfordi*'nin kökünden üretilen biyolojik bir bileşiktir. Tripterin, anjiyogenez ve metastatik aktiviteye sahip proteinlerin ekspresyonunu ve tümör hücrelerinde hücre sağkalım veya hücre proliferasyonunda önemli olan Siklin D1, Cox-2 gibi hedefleri modüle etmektedir (Sethi v.d., 2007). Celastrol'un anti-kanser özellikleri tümör anjiyogenezin inhibisyonu üzerine olan etkisine atfedilebilir. Celastrol'un anjiyogenez üzerindeki önleyici etkisi HIF-1 $\alpha$ 'nın bastırılmasından aracılık eden, HSP90 ve mTOR/p70S6K/eIF4E yolak inhibisyonu ve ERK1/2 fosforilasyonudur (Ma v.d., 2014). Bu hipoksia inducible faktör 1'in (HIF-1 $\alpha$ ) inhibisyonu, anjiyogenez sürecinde çok önemli olan vaskular endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi hedeflerin azalmasına neden olur. *In vitro* ve xenograftlerde Celastrol'un VEGF üzerinde etkili olmadığı, daha çok VEGF reseptörlerinin ekspresyonunda olduğu insan glioblastoma hücrelerinde görülmektedir (Huang v.d. ., 2008). Bulgular Celastrol'un anti anjiyogenez ve anti tümör etkisini ortaya koymaktadır Şekil 1.2 de anjiyogenez mekanizması açıklanmaktadır.



Şekil 1.2. Tümör anjiyogenezi.

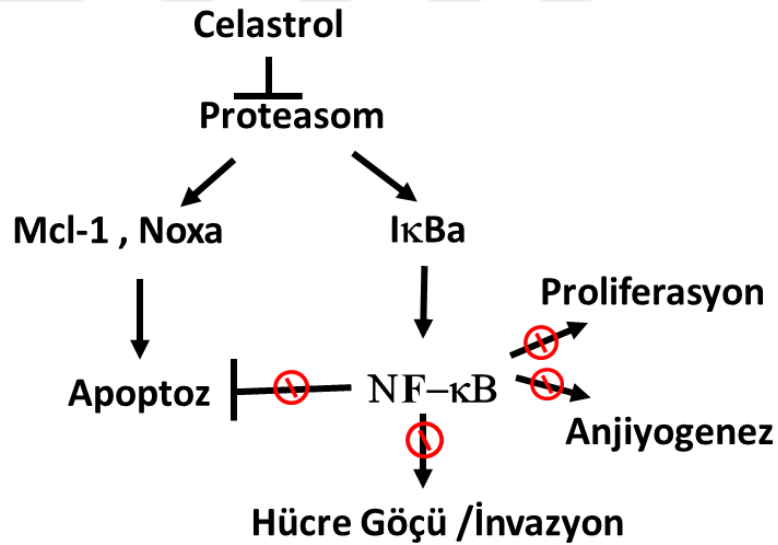
### 1.4.3. İnvazyonun İnhibisyonu

Metastaz ve invazyon kanser hücrelerin önemli özellikleri olup, tedavinin başarısız olmasına neden olmaktadır. Bu durumda metastazın ve invazyonun kontrolü çok önemlidir. Yapılan çalışmalarda matriks metaloproteinazlarının (MMP) fazla ekspresyonu metastaz ve tümör invazyonun ve kanserlerde ilişkisini göstermektedir (Rao, 2003). Tümör invazyonu Şekil 1.3 de açıklanmaktadır.



Şekil 1.3. Metastaz olayının evreleri. Metastaz bir seri evreler şeklinde karakterize edilmektedir: Primer tümör oluşumu, anjiyogenez ile kan damarında konumlanma, kanser hücrelerinin lokal dokuda invazyonu ve kan damarı içine girmesi. Yayılan hücreler kan dolaşır ve uygun sekonder yere örneğin kemiğe ulaşır, bunun için kan damarı içine girmesi. Yayılan hücreler kan dolaşır ve uygun sekonder yere örneğin kemiğe ulaşır, bunun için kan damarından dışarı çıkar ve kolonize olarak kemikte metastaz yapar (Amber v.d. ., 2017, değiştirilerek).

Tümör invazyonunu inhibe etmek için ilaç deneyimleri yapılmaktadır. Celastrol'un etkisi tümör invazyonuna etkisi araştırıldı ve engellediği belirlendi. Akciğer adenokarsinoma hücrelerinde, Celastrol NF- $\kappa$ B kaynaklı gen ürünlerinin down-regüle ederek ve MMP-9 un inhibisyonu ile TNF kaynaklı invazyon aktivitesini engellemektedir (Sethi v.d. ., 2007). Celastrol'un meme tümör hücrelerinde apoptozu indüklediği ve TNF'nin indüklediği MMP-9 ekspresyonunu down-regüle etmesi yoluyla invazyonlarını engellediği ve MMP-1 ve MMP-2'yi etkilemediği de gösterilmiştir (Mi v.d. ., 2014). Celastrol, kolon ve pankreas kanseri hücrelerinde, kemokin reseptörü CXCR4 ekspresyonunun down-regülasyonu ile tümör invazyonunu azaltmaktadır (Yadav v.d. ., 2010). Tüm bu veriler Celastrol, esas olarak NF- $\kappa$ B ve HIF-1 $\alpha$  gibi transkripsiyon faktörlerini inhibe etme kapasitesini ve HSP90 şaperonu gibi protein homeostaz mediatörlerine bağlı olarak, farklı kanser türlerinin tedavisinde kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır. Örneğin Celastrol'un etkisi AIPC (Androgen independent prostate cancer) ilerlemesinde Şekil 1.4 de açıklanmaktadır.



Şekil 1.4. Celastrol'un androjene bağımsız prostate kanseri üzerine olan etkisi.

Celastrol proteazome fonksiyonunu engeller, apoptozu tetikleyen Mcl-1 hareketi ve Noxa indüksiyonu ile apoptozu tetiklemektedir. Aynı zamanda Celastrol I $\kappa$ B $\alpha$  bozulmasını önler ve NF- $\kappa$ B baskılanmasına neden olmaktadır. Genel olarak, Celastrol androjene bağımsız prostat kanseri (AIPC) hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonun ve anjiyogenezini engellemekte ve yapısal NF $\kappa$ B aktivitesini önemli ölçüde engelleyerek apoptoz yol açmaktadır.

## 1.5. CELASTROL'ÜN ANTI-ENFLAMATUAR ETKİLERİ

Artan enflamasyona karşı kullanılan ilaçlara, ya da önleme potansiyeli olan maddelere anti-enflamatuar denilir. Celastrol, anti-enflamatuar ve anti-tümör özellikleri, bilinen triterpenoid ailesinin bir üyesidir (Chang v.d. .,2003). Celastrol DNA ya ket vurmaktadır (Deng v.d. ., 2000). Celastrol nüklear faktör  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) sinyalini inhibe ederek anti-enflamatuar etkiler göstermektedir (Suh v.d. ., 2003). Romatoid artrit (RA) kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Eklemlerimizde, tendon kılıflarımızda sinovium adı verilen yumuşak bir doku bulunmaktadır ve eklemlerin iç yüzeyinde yer almaktadır. Sinovitis ise sionovial membranın enflamasyonunu ifade etmektedir. Sinovial hiperplazi (hücre sayısının artması) bir otoimmün hastalık olan RA nın tipik bir özelliğidir. Sinovitler fibroblastlara benzediği için FLS şeklinde kısaltılmaktadır.

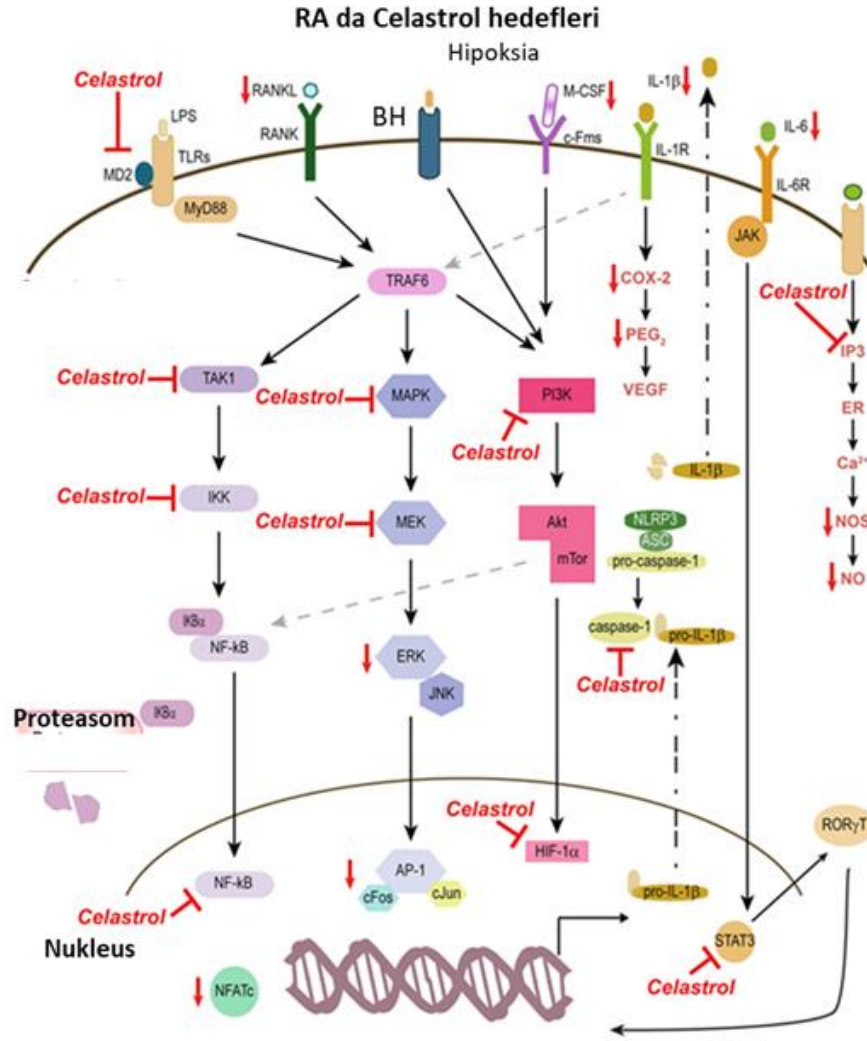
FLS ler, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-1, MCP-1 gibi farklı sitokinler ve ayrıca matriks metaloproteinazlarının (MMP) salgılayarak RA da çeşitli işlemleri tetikler (Tian. v.d., 2013). Günümüze kadar Celastrol'ün antiinflamatuvar özellikleri, enflamatuar aracının ekspresyonunun düzenlenmesi, osteoklast modülasyonu ve kemik hasarı kontrolü, sitokin ve kemokin üretimin düzenlenmesi, enflamatuar hücre fonksiyonlarının modülasyonudur (Şekil 1.5).

## 1.6. CELASTROL'ÜN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ

Nörodejeneratif hastalıklar genellikle protein yanlış katlanması ile ilgili rahatsızlıklardır ve protein agregatlarının sinir hücrelerinde birikmesi ile karakterize edilmektedir (Selkoe, 2004). Yapılan araştırmalarda Celastrol'ün insanlarda ve hayvanlarda nörodejeneratif hastalıklarda nöroprotektif ilaç olduğu belirlenmiştir. İnsanlarda Parkinson, Alzheimer ve Huntington hastalıkları örnek olarak verilmektedir (Cleren v.d. ., 2005). Yanlış katlanmış proteinlere karşı direnç sağlayan regüle edici ajan HSP (ısı şok proteinleri) proteinleridir ve farklı fonksiyonları olan bir protein ailesidir (Muchowski v.d. ., 2010). HSP proteinlerinin hepsi ani sıcaklık değişikliklerinde, reaktif oksijen metabolitleri varlığında, anoksia koşullarında, glukoz düzeylerinde değişiklik ve toplam olarak stres durumlarında üretilmektedir, HSP ler molekular ağırlıklarına göre sınıflandırılmaktadır (HSP 100, HSP 90, HSP 70, HESP 60, küçük ısı şok proteinleri, ubikuitin). HSP lerin uyarılmasında Celastrol rol oynamakta ve buna bağlı olarak önemli terapötik

sonuçları ortaya koymaktadır (Salminen v.d. ., 2007). Celastrol uygulaması ile HSP70 deki artış NF-κB, COX-2 ve GSK-3β'yi azalmasını ve BCL-2 ekspresyonunun artmasını ve LPS nin neden olduğu hücre ölümünü ve hem amiloid üretiminin azalmasını sonuçlandırmaktadır (Zhao v.d. ., 2014). *In vitro* da Celastrol ile yapılan model deneylerde Parkinson hastalığında dopaminerjik hücrelerin apoptozdan korunduğunu, ROS oluşumunun ve mitokondriyal membran potansiyel kaybının engellendiği bulunmuştur. Celastrol'ün aynı zamanda dopaminerjik hücreleri koruduğu, mitokondriyal apoptotik yolağı engellediği ve mitokondrilerin işlevini koruduğu ve P38 MAPK (MAP Kinaz) aktivasyonunun inhibe ettiği Choi v.d. (2014) tarafından kanıtlanmıştır.





Şekil 1.5. Celastrolün romatoid artrit tedavisindeki sinyal iletimi ilişkileri.

Burada Celastrolün, ana anti-enflamatuar özellikleri ve RA'nın fizyopatolojisinde moleküler hedefleri gösterilmektedir. Celastrol'ün sitokin, kemokin ve enflamatuar mediatörlerin üretimine yönelik birkaç hücresel hedefi vardır: Hücre invazyonu ve çoğalmasının inhibe edilmesi ve kemik rezorpsiyonunun baskılanması. Bu verilere dayanarak Celastrol'ün enflamatuar hastalıkların tedavisi için potansiyel bir aday olduğu sonucuna varılmıştır (Cascao v.d., 2017)

Celastrol'un ayrıca LPS nin aktive ettiği BV-2 mikroglia hücrelerinde ERK/MAPK fosforilasyonunu ve NF-κB aktivasyonunu down regüle ederek IL-1β TNF ve NO gibi enflamatuar araçların inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Jung v.d. ., 2013). Buna ilave olarak Celastrol'un amiyotrofik lateral skleroz hayvan modelinde (G93A SOD1 transgenik fareler) terapötik yararları açıklanmıştır. Nöron sayısında artma ve iNOS ve TNF düzeylerinde azalma ve lumbar omurilikte HSP70 düzeylerinin artması ile farelerin sağkalımında artış saptanmıştır (Kiaei v.d. ., 2005) Bu veriler ışığında Celastrol'un nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde özellikle NF-κB ve HSP'lerin engellenmesi yolu ile umut vaat ettiğini ortaya koymaktadır.

## **1.7. CELASTROLÜN DİĞER HASTALIKLAR ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİLERİ**

Yapılan son araştırmalar Celastrol'un diyabet (şeker hastalığı), obezite, ateroskleroz ve duyma kayıplarında terapötik etkili bir ilaç olduğunu göstermektedir.

### **1.7.1. Şeker Hastalığı (*Diabetes mellitus*)**

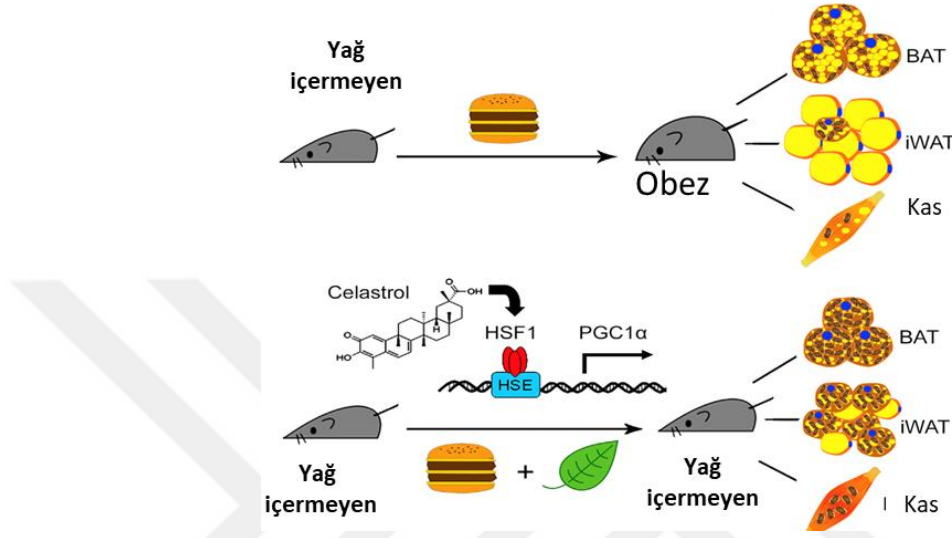
Şeker hastalığı, insülin hormonunun azalıp veya etkisiz hale geldiğinde kan şekerinin artması ile oluşan insülin salgısının yetersiz olduğu kronik bir hastalıktır. Diabetes mellitus (Dm) tip 1 ve tip 2 olmak üzere 2 tipdir.

Araştırmalar NOD farelerde Celastrol'un Tip 1 diyabette etkili olduğunu göstermiştir (Grant v.d., 2013). Haftada 2 kere 25 mg/kg olmak üzere uygulandığında bir gün sonra kan şekerini çok az azalttığı fakat 2 gün sonra etkisiz olduğu belirlenmiştir. Celastrol Tip 2 sıçan modellerinde ise NF-κB ekspresyonunu azaltmakta, IL-1β ve TNF azaltmakta böylece karaciğer dokusunda hasarı ve enflamasyonu geciktirmektedir (Kim v.d., 2013).

### **1.7.2. Obezite**

Vücutta enerji giriş ve çıkış arasında dengesizlik olduğu zaman, aşırı yağ dokusunun birikmesi oluşur ve bu da obeziteye neden olmaktadır (Farmer, 2008). Celastrol mitokondriyal fonksiyonun ve ışık şoku transkripsiyon faktörünün (HSF-1) ifadesinin artışına neden olmaktadır. Celastrol uygulaması ile HSF1'in aktifleştirilmesi, enerji harcamaları arttırmakta ve yüksek yağlı diyet (HFD) üzerinde kayda değer bir etki göstermektedir, böylece obez hastalarda yağların

azalmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca, adipoz dokularında ve kaslarda peroksizom proliferator aktive eden reseptör  $\gamma$  ko-aktivatörü 1- $\alpha$  ya (PGC1 $\alpha$ ) bağımlı metabolik bir programın aktive edilmesi yoluyla enerji harcamasının düzenlenmesine, enerji harcamasının artmasına yol açar, dolayısı ile obezite ve metabolik hastalıkları tedavi etmek için olası bir stratejiyi ortaya koymaktadır (Ma v.d ., 2015) (Şekil 1.6.).



Şekil 1.6. HSF1 yağ dokusu ve kasta PGC1 bağımlı metabolik programın aktivasyon yoluyla enerji harcamasını düzenlemesi.

### 1.7.3. Ateroskleroz

Ateroskleroz çok odaklı, kronik bir immune-enflamatuar hastalıktır ve patogenezi dengesiz lipit metabolizmasını içermektedir ve arter duvarının kasılmasına bağlı olarak immün yanıt oluşmasıdır. Son yıllarda yapılan tavşan deneysel karotid ateroskleroz modelinde Celastrol'ün plak oranını, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) serum seviyelerini ve VEGF ekspresyonunu etkin bir şekilde azalttığı ve bunun bir anti-aterosklerotik etki gösterdiği belirlenmiştir (Zhu v.d ., 2014). Ayrıca *in vitro* ve *in vivo* veriler Celastrol'ün endotelial progenitor hücrelerin (EPC) fonksiyonel bütünlüğünü geliştirdiğini göstermiştir, böylelikle kardiyovasküler ve iskemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan etkili bir EPC transplantasyonu yapabilmek mümkün olmaktadır (Lu v.d ., 2015).



#### 1.7.4. İşitme Kaybı

İşitme bozukluğu geçici veya kalıcı olabilmektedir, genellikle yaşlanma, gürültü travması, kimyasallar ve terapötikler nedeniyle iç kulakta mekanik sensörlerin ölümünden kaynaklanır. Aminoglikozid antibiyotikler ototoksisiteye neden olabilen en çok kullanılan antibiyotiklerden birisidir (Selimoğlu, 2007). Aminoglikosid kaynaklı işitme kaybının tedavisi mümkün değildir, bu nedenle de terapötik bir strateji bulmak büyük ilgi çekmektedir (Rybak v.d. ., 2007). Bu bağlamda Celastrol'ün birkaç kronik durumun tedavisi için potansiyel bir molekül olduğu görülmektedir, ancak bu alanda daha ileri tekniklere dayalı moleküler mekanizmalara dönük araştırmalara gereklilik duyulmaktadır.

#### 1.8. TOKSİSİTE VE CELASTROL'ÜN SINIRLANMASI

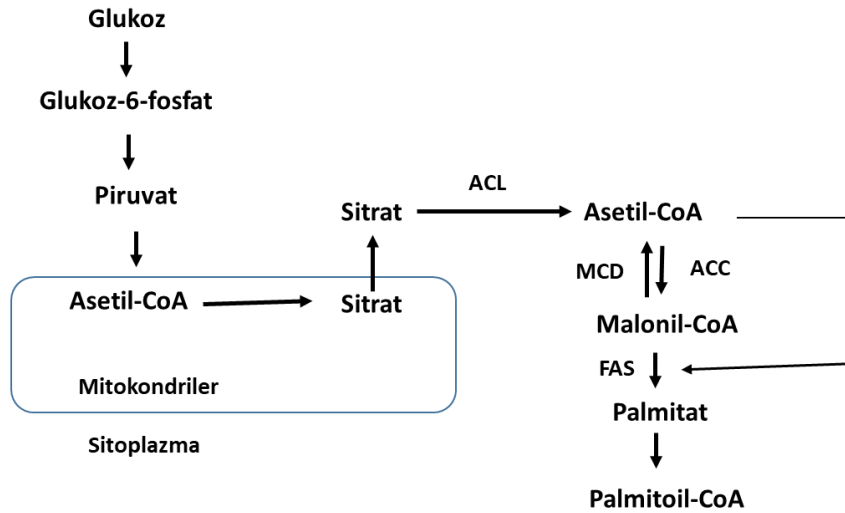
Celastrol'ün klinik kullanımı ile ilgili yan etkilerin ortaya çıkması endişe oluşturmakla birlikte bu etkiler terapötik doza bağlıdır. Literatürde *in vivo* olarak sıçanlardaki artrit tedavisinde 2,5 ve 5 µg/gün dozlarının etkili ve toksik olmadığı gösterilmiştir, yüksek konsantrasyon ise toksik belirtiler göstermiştir (Rita Cascao v.d. ., 2017). Benzer sonuçlar yakın zamanlarda Parkinson hastalığı modellerinde de tanımlanmıştır (Konieczny v.d. ., 2014). Celastrol'ün bir önemli yan etkisi infertilitedir (Bai v.d. ., 2003). Farelerin spermatogenik hücrelerinin kullanıldığı bir araştırmada, Ca<sup>2+</sup> miktarlarının Celastrol tarafından inhibe edildiği bulunmuştur.

Celastrol'ün terapötik potansiyeline rağmen, klinik uygulamaları sınırlıdır. Celastrol'ün H<sub>2</sub>O ile çözünürlüğü zayıftır (37°C'de 13,25 ± 0,83 mg/ml) (Qi v.d. ., 2014). Yüksek dozda oksidatif strese neden olurken, düşük dozda anti-oksidasyon etki sergilemektedir. Celastrol nanomolar konsantrasyonlarda oksidatif stresi baskılamaktadır ve 1 µM konsantrasyonun üzerinde ROS oluşumunu uyarmaktadır. Özellikle kanser hücrelerindeki ROS üretimine olan etkisinin tersine mikrogliya ve endotel hücreleri damar düz kas hücrelerinde oksidatif stresi uyarmaktadır Bu zıt etkiler kanser ve kanser olmayan hücre özelliklerine ve doza bağlı olarak açıklanmaktadır (Allison v.d. ., 2001; Yu v.d. ., 2010).

## 1.9. YAĞ ASİDİ SENTAZ YOLAĞI

Yağ asidi sentaz (FAS), asetil CoA ve malonil CoAdan uzun zincirli yağ asitlerinin sentezini katalize eder (Katsurada v.d. ., 1986). FASN bir multienzimdir ve asetil CoA ve malonil CoA nın 16-karbonlu yağ asidi palmitata dönüşümünü kataliz eder. Malign hücrelerde FASN over-ekspresedir ve hiperaktivite gösterir.

Toplam enerji alımı, enerji harcamasından yüksek olursa, yağ asitleri ve triaçilgliseroller sentezlenir ve bunlar adipoz dokusunda birikir. Yağ asidi sentezi sitoplazmada bir karboksilaz olan asetil CoA (ACC) ve FASN ile katalize edilir (Şekil 1.7) (Lopez v.d. ., 2005). Lipogenik koşulların altında, hücredeki aşırı glukoz, sitoplazmada glikolizis yoluyla piruvata dönüştürülür. Piruvat daha sonra asetil CoA ya dönüştürülür ve sitrat olarak mitokondriden sitoplazmaya taşınır. ATP sitrat liyaz (ACL) daha sonra tekrar asetil CoA 'ya dönüştürülür. ACC, asetil CoA nın malonil CoA ya karboksilasyonunu ATP ye bağımlı bir şekilde kataliz eder. Asetil CoA ve malonil CoA daha sonra palmitat üretimi için substrat olarak kullanılır ve FAS tarafından 7 enzimatik reaksiyon katalizlenir. Böylece yağ asitleri sentezlenmiş olur ve hücreye taşınır ve triaçil gliserol sentezinde kullanılır. Malonil CoA sentez evresi regüle bir mekanizma ile geniş dönüşebilir ve malonil CoA dekarboksilaz malonil CoA yı tekrar asetil CoA ya dönüştürür (Lopez v.d. ., 2005).



Şekil 1.7. Yağ asit sentaz yolağı. ACC: Asetil-COA karboksilaz; ACL: ATP sitrat liyaz; FAS: Yağ asidi sentaz; MCD: malonil-COA dekarboksilaz (Lopez v.d. ., 2005, değiştirilerek).

Bu araştırmanın amacı HeLa servikal kanser h¼cre hatlarında bir penta siklik triterpen olan Celastrol'un yağ asidi sentez yolağı üzerindeki etkilerini belirleyebilmektir. Bu noktadan yola ¼ıkılarak ¼nce HeLa h¼cre hatlarında Celastrol'un h¼cre canlılığına etkisini doz ve zamana bağlı olarak belirlendikten sonra apoptoz ve sağkalım üzerine olan etkilerini saptamak amacı ile fluoresan mikroskopunda morfolojik h¼cre ¼alıřmaları ger¼ekleřtirildi. Bu saptamalardan sonra reaktif oksijen oluşumu, h¼cre d¼ng¼s¼, yara iyileşmesi, lipid analizleri yapıldı.



## **2. MATERYAL VE YÖNTEMLER**

### **2.1. MATERYAL**

#### **2.1.1. Hücre ve Özellikleri**

HeLa (ATCC® CCL-2™) epitel hücre ve adenokarsinomalardan türevlenen insan servikal kanser hücre hattıdır.

#### **2.1.2. Kullanılan cihazlar**

Kullanılan cihazlar Ek A'da yer almaktadır.

#### **2.1.3. Hücre kültürü donanımları**

Hücre kültüründe kullanılan materyaller Ek B'de yer almaktadır.

#### **2.1.4. Kullanılan çözeltiler**

Çalışma kapsamında kullanılan çözeltiler Ek C'de yer almaktadır.

#### **2.1.5. Kullanılan Antikor ve Primerler**

Çalışma kapsamında kullanılan antikor ve primerler Ek D'de yer almaktadır.

## **2.2. YÖNTEMLER**

### **2.2.1. Hücre Kültürü**

HeLa servikal kanser hücreleri DMEM besiyerinde içerisinde L-glutamin 4.5 g/L, sodium piruvat 3.7 g/L, NaHCO<sub>2</sub>, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin ilave edilerek 37°C'de, %5'lik CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletildi.

Kültür flaskındaki hücre sayısının artması sonucunda hücre pasajlanması işlemi için ortamdan besiyeri uzaklaştırıldı. 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flask içerisine 1 ml fosfat tamponu eklendi (PBS) yıkama işlemi yapıldı. Bu aşamadan sonra, 1 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) ilave edildi ve CO<sub>2</sub> etüvünde 3 dakika bekletildi. Daha sonra hücrelerin zarar görmemesi için tripsin-EDTA ile aynı oranda (1:1) besiyeri eklenerek tripsinin inaktif hale gelmesi sağlandı. Flask içinde kalkmış halde bulunan hücreler yıkanarak 15 ml'lik falkon tüpe alındı ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı. Pellet üzerine 1 ml taze besiyeri eklenerek çözünmesi sağlandı.

Daha sonra hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı. Hemositometrede 25 karede sayılan hücre sayısı, 104 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre miktarı bulundu.  $1 \times 10^3$  hücre, 25 cm<sup>2</sup>'lik flask'a ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirildi. hücre yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak 3 günde bir pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

### **2.2.2. Hücre Dondurulması ve Açılması**

Pasaj sayısı az olan hücreler yedeklenmek amacıyla donduruldu. 25 cm<sup>2</sup>'lik flask'da bulunan HeLa servikal kanser hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldı, daha sonra tripsini inaktive etmek için üzerine besiyeri ilave edildi. 15'lik falkona alınan hücreler 2000 rpm'da 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra çöktürülen hücreler freezing medya içinde çözüldü ve yaklaşık 10<sup>6</sup> kadar hücre krio tüplerine kondu. Soğuğa dayanıklı steril krio tüpler parafilm ile sarılarak önce -80°C'de sonra -196°C sıvı azot tankında saklandı. Gerekteğinde hücreler sıvı azottan çıkarıldı ve çözdürüldü Freezing medya üzerine besiyeri eklendi, 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi supernatant uzaklaştırıldıktan sonra taze besiyeri yerinde çözülen hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekildi.

### **2.2.3. Hücre Canlılığı Testi (MTT)**

HeLa servikal kanser Hücreleri kaldırıp ve sayım yaptıktan sonra 96 kuyuya sahip petri kaplarında her bir kuyucuğa 10000 hücre ekildi. Ardından hücreler yapışması için bir gece inkübatörde bekletildi. Hücre kuyucuklara yapıştıktan sonra, 9 farklı koşulda uygulama yapıldı: kontrol, 0,01 µM, 0,075 µM, 0,025 µM, 0,075 µM, 0,1

$\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , ilaç uygulanıldı. Hücrelere ilaç uyguladıktan sonra iki farklı zamanda (24 ve 48 saat) ilacın etkisi kontrol edildi.

Bu sürecin sonunda 10  $\mu\text{L}$  MTT (3-(4,5-Dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür) kuyucuklara uygulanıldı ve 4 saat beklendikten sonra, hücre zarar görmeden, kuyucuklardan besiyerleri çekildi ve her bir kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  DMSO (Dimetil Sülfoksit) eklendi. Örnekler 5 dakika karanlıkta bekletildikten sonra mikropılaka okuyucusunda (Bio RAD, Filtre (570nm-655nm), özellik (Raw data) absorbands ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlar MS Office Excel programı ile analiz edildi.

#### **2.2.4. Growth Assay (Sağkalım)**

HeLa servikal kanser hücreleri 6 kuyucuklu petrilere ekildi. Bu deney kapsamında her kuyucuğa 50000 hücre ekim yapıldıktan sonra ilaç uygulaması gerçekleştirildi. Seçilen dozda ilacın etkisi 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca gözlemlendi.

Bu amaçla, farklı zamanlarda üst faz atıldı ve 1x PBS ile hücreler yıkandı. Ardından hücreler 1x tripsin ile muamele edildi. Hücrelere ardından serumsuz besiyeri eklenerek 3 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra, üst faz atılıp ve pelete 50  $\mu\text{l}$  Tripan mavisi boyası eklendi. Hücre sayımı Neubauer Hemositometrede yapıldı. Sayımı gerçekleştirilen hücre lineer grafik ile MS Office Excel programında analiz edildi.

#### **2.2.5. Koloni Oluşum Testi**

HeLa servikal kanseri hücreleri 6 kuyucuklu petrilere ekim yapılır. Farklı yoğunluklarda koloni oluşturma potansiyelini gözlemlenmek amacı ile petrilere sırası ile 2500, 5000 ve 10000 hücre olacak şekilde kuyucuklara ekim yapılmıştır. Ardından hücrelerin gece boyu yapışması bekletilmiş ve seçili dozlarda celastrol uygulaması yapılmıştır.

Hücreler, 24 saat boyunca Celastrol'ün farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılır. Ardından hücreler 2 defa 1x PBS ile yıkanır ve taze besiyeri eklenir. 14 gün boyunca kolonilerin büyümesi her iki veya üç günde değiştirilen besiyerlerinde devam eder. Ardından hücreler oda sıcaklığında hazırlanan metanol ve asetik asit (3:1) karışımı çözeltisinde sabitlenir. Bu amaçla her kuyucuğa 500  $\mu\text{l}$  metanol: asetik asit çözeltisi konur. Hücreler 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bu çözelti ile bekletildikten sonra her bir örneğe 500  $\mu\text{l}$  kristal viyole eklenir (100 de 0.05 lik ve MERCK

firmanın). Hücreler bu süreçte 15 dakika inkübe edilir. Boya kalıntıları dH<sub>2</sub>O ile uzaklaştırılır ve petri görüntüleri dijital kameri ile kaydedilir.

### 2.2.6. Soft Agar

Hücrelerin soft agarda tanımlanmaları için ilk olarak 15 ml tüplerin içerisinde 1,5 ml %0,5'lik konsantrasyon agaroz ve 1,5 ml 2x DMEM eklenir. Bu karışım iyice pipetaj yaparak karıştırıldıktan sonra 6 kuyucuklu petri kaplarına 1 er ml olacak şekilde dağıtılır. Agaroz ve besiyer karışımı donduktan sonra, üst fazın hazırlığı yapılır. Üst jel içerisinde seçili Celastrol, besiyeri ve hücreler ile birlikte hazırlanır. Ayrıca % 0,3 agaroz eklenir. Bu karışım daha önce hazırlanan alt jelin üzerine dikkatlice yayılır ve donması beklenir. 10 gün boyunca koloni oluşumu taze besiyeri eklemesi ile takviye edilerek izleniyor. Ardından dijital görüntüleme sistemine sahip mikroskop ile sonuçlar gözlemlenip, kaydedilir.

### 2.2.7. Floresan Mikroskopunda Hücre Sağkalım ve Ölümünün Belirlenmesi

HeLa servikal kanser Hücrelerin Celastrol uygulaması sonucunda hücre sağkalım ve ölüm yönündeki kararlarının tanımlanabilmesi amacı ile floresan mikroskopunda sırası ile aşağıdaki boyama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla önce HeLa servikal kanser hücreleri 12 kuyucuklu petri kaplarına, her bir kuyucuğa 50000 hücre olacak şekilde ekimi gerçekleştirilir. Hücrelere ilaç uygulaması gerçekleştirildikten 24 saat sonra boyama işlemleri yapılır.

3, 3'Diheksiloksakarbosiyanin iyodür (DiOC6) lipofilik boyadır. Bir hücrenin endoplazmik retikulum, vezikül membranları ve mitokondriyal boyamasında kullanılan floresan boyadır. 6 kuyucuklu petriye  $5 \times 10^4$  hücre ekilip bir gece bekletildikten sonra belirlenen konsantrasyonlarda ilaç uygulanır. İlaçlı besiyeri atıldıktan sonra, mitokondri membran geçirgenliğinin saptanması için, içinde 4 nM DiOC6 bulunan medya koyulur ve 15 dakika bekletilir. Sağlıklı mitokondri membranına sahip hücreler eksitasyon/emisyon = 488nm/525nm'de yeşil olarak gözlemlenir (Koning v.d. 1993).

**DCFH (diklorofluorescin diasetat)** hücre içi toplam ROS seviyesini, flüoresans mikroskobu ile görüntüleniyor. 6 kuyulu petriye  $5 \times 10^4$  hücre ekilip bir gece bekletildikten sonra belirlenen dozajda ilaç uygulanır. İlaçlı medya atıldıktan sonra, hücre popülasyonundaki ölü hücrelerin tespit edilmesi amacıyla 5 mg/ml

propidyum iyodür içeren medya koyulur ve 30 dakika bekletilir. Ölü hücrelerin boyanması sağlandıktan sonra fluoressan mikroskobunda eksitasyon/emisyon = 536 nm/67nm'de kırmızı olarak gözlemlenir.

**DAPI** (4',6-diamidino-2-fenilindol) DNA'nın boyanmasında kullanılır. 6 kuyucuklu petriye  $5 \times 10^4$  hücre ekilip bir gece bekletildikten sonra belirlenen konsantrasyonda ilaç uygulanır. İlaçlı besiyeri atıldıktan sonra, DNA'da kırık oluşunu takiben apoptozu gözlemlenmesi amacıyla 5 mg/ml DAPI içeren medya koyulur ve 10 dakika bekletilir. DNA'ya bağlanan boya eksitasyon/emisyon, 350nm/470 nm de mavi olarak gözlemlenir (Kapuscinski, 1995).

## **2.2.8. Protein Tayini**

### *2.2.8.1. Total Protein İzolasyonu*

Total protein tayini için 60 mm'lik petrilere HeLa hücreleri ekilerek 37 C'de bir gece yapışması beklendi. Petrilere bir tanesi kontrol grubu olarak alındı, diğer petriye belirlenen konsantrasyonda Celestrol uygulandı ve 24 saat etüvde bekletildi. Hücrelerin üzerindeki besiyerleri alınarak +4°C ve 13200 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı ve sıvı faz kullanıldı. İsootonik ortamda besiyerleri atılan hücrelerin üzerine, kazıma için gerekli olan 1x PBS eklendi. Kazıma yapıldıktan sonra mikrofüj tüpünde toplandı ve 13200 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve bu işlem 2 kere tekrarlandı. Santrifüjden sonrasında supernatant atıldı ve pellet üzerine p-CLB (Fosfo Protein izolasyonu için kullanıldı) veya CLB (protein izolasyonu için kullanıldı) eklendi ve homojenize edilerek oda sıcaklığında çalkalayıcıda 20 dakika boyunca inkübe edildi. Bu işlemden sonra, örnekler 20 dakika 13200 rpm'de 4°C'de santrifüj edildi ve supernatantlar yeni Ependorf tüplere alındı. Ölçüm yapıldıktan sonra daha sonra kullanmak üzere -80°C'de saklandı.

### *2.2.8.2. Bradford Yöntemi*

Protein içeriğinin belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bio-Rad). Proteinler, Coomassie brilliant blue G-250'ye bağlanmakta ve bir renk değişimi oluşturmaktadır. Normalde proton halde kırmızı/kahverengi renkte olan boya, proteinle bağlanınca mavi renkte görülür. Bu değişim mikropilaka okuyucusu ile 595 nm'de absorbans ölçerek belirlenir.



1,5 µg- 7,5 µg arası alınarak BSA (Bovine Serum Albumin) standart oluşturuldu. 2 set halinde yapılır. Daha sonra 96 kuyucuklu kaplara örnekler her bir kuyucuğa 1 µl konur ve üzerlerine 200 µl Bradford solüsyonu eklenip karanlıkta 5 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm de ölçülür. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği eğim eşitliği kullanılarak absorbans değerleri üzerinden örneklerin konsantrasyonları belirlendi.

#### 2.2.8.3.SDS-PAGE Jel Hazırlanması

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez) proteinlerin moleküler büyüklüğünü belirlemek amacı ile kullanıldı. Tabloda belirtilen kimyasallar ile hazırlanan Poliakrilamid jel tank içerisine yerleştirilmiş ve tankın içi soğuk 1X yürütme tamponu ile doldurulmuştur.

#### 2.2.8.4. Protein Örneklerin Hazırlanması ve SDS-PAGE Jelin Yürütmesi

Immunoblotlama işlemi için her bir örnekten alınan protein örnekler Bradford sonuçlarından elde edilen standart eğriye göre protein örnekleri 5x Laemmli yükleme tamponu ile 1:5 oranında karıştırılarak 95°C'de 5 dakika tutuldu. Örnekler protein belirteçler ile birlikte 80 Volt'da SDS içeren yürütme tamponunda yürütüldü.

#### 2.2.8.5. Membrana Aktarma ve Blotlama

SDS-PAGE sonrası, yükleme jeli kesildi, ayırma jeli boyutunda kesilen ve metanol ile aktive edilen poliviniliden florid (PVDF) membranlar önce su daha sonra aktarma tamponunda bekletildi. Membranlar jellerin altına konduktan sonra trans-blot turbo transfer sisteminde proteinlerin membrana geçişi gerçekleştirildi.

Jel üzerindeki protein örnekleri PVDF membrana aktarıldıktan sonra, %5'lik yağsız süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı (100 ml %0,001 Tween-20 içeren Tris Tuz Solüsyonu için g süt tozu).

#### 2.2.8.6. Immunoblotlama İçin Birincil ve İkincil Antikorların Uygulanması

Membranlar, uygun birincil antikorla (1:1000; antikor: %5 süt solüsyonu) gece boyu +4°C'de yatay döndürücülere konuldu, 15'er dakikalık üç kez TBS-T ile yıkama sonrasında uygun ikincil antikorla (1:5000; antikor: %5 süt solüsyonu) gece boyu +4°C yatay döndürücülerde inkübe edildi Bu işlemlerde seçilen antikorlar;

HeLa servikal kanser hücrelerinde Celastrol'ün hücre döngüsünde ve lipid metabolizması yollarındaki etkisinin gösterilmesi amacı ile kullanıldı.

#### 2.2.8.7. Sonucun ChemiDoc™ Sistemi ile Görüntülenmesi

Daha sonra 15'er dakikalık TBS-T ile iki kez ve 15 dakikalık TBS ile yıkama sonrasında örnekler oda sıcaklığında kemiluminesans madde ile 1 dakika boyunca uygulama yapıldı. Kemiluminesans ışımlar (0-100 sn), ChemiDoc™ Imaging System, Bio-Rad ile görüntüledi.

#### 2.2.8.8. Hücrelerde Lipid Birikiminin İncelenmesi

Hela Hücreler 6 kuyucuklu petrilere, her bir kuyucuya 100,000 hücre ekip ve hücreler yapıştıktan sonra ilaç uygulanıyor (0,075 µM, 1 µM). 24 saat sonra soğuk 1x PBS ile kuyucuklardaki hücelere zarar vermeden yıkayıp ve 10 dakika %4 Paraformaldehyde ile fikse ediliyor. Sonra üzerine %0,2 Oil-Red-O eklenip ve 15 dakika bekletiliyor. 15 dakika sonra 1 dakika boyunca distile su (dH<sub>2</sub>O) ile yıkanılıyor. Sonuçlar dijital mikroskop ile incelenip ve kayıt ediliyor.

#### 2.2.9. Yara İyileşmesi (Scratch testi)

*In vitro* yara iyileşmesi, hücre göçünü incelemek için basit ve ekonomik bir deneydir. Tek katmanlı hücelere "çizik" olarak adlandırılan yapay boşluğun yaratılmasından sonra, bu yaratılan boşluğun kenarlarındaki hücelerin boşluğu kapatmak için açıklığa doğru hareket etmesi gözlemine dayanır. 6 kuyucuklu petrilere hüceler yoğun bir şekilde ekilir. Hücelerin yapışması beklendikten sonra belirlenen dozajda ilaç uygulanır. 10 µl' lik pipet ucu yardımıyla petrinin ortasından bir çizgi çizilerek yara oluşturulur ve 1x PBS ile yıkama yapılır. Bu aşamadan sonra yara, mikroskopta incelenir ve görüntüsün kaydediliyor. Oluşturulan yaranın 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonra ışık mikroskopunda görüntülenmiştir.

#### 2.2.10. Hücre Siklusunun Hücre Akış Sitometresi ile İncelenmesi

Hüceler 6 kuyulu petri kaplarına, bir kuyuya 500000 hücre olacak şekilde ekildi ve yapışmaları beklendi. Ardından hücelere seçili dozda ve zamanda Celastrol uygulaması gerçekleştirilmiştir. Ardından hüceler tripsin eklenerek kaldırılmıştır ve 1x PBS (500 µL) içerisinde pipetaj ile yıkanmıştır. Tüm örnekler mikrofüj

tüpünde 2 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra % 20 soğuk EtOH ile yapılmıştır. Örnekler +4°C de bir hafta bekletildikten sonra 5 dakika boyunca yeniden 2000 rpm 'de santrifüj ettikten sonra EtOH uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1x PBS ile yıkanılır ve ardından 4 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilir. Son olarak pellet üzerine PI boyası RNaz ile birlikte eklenmiştir. Örnekler 30 dakika boyunca 37°C da bekletildikten sonra analize alınmıştır.

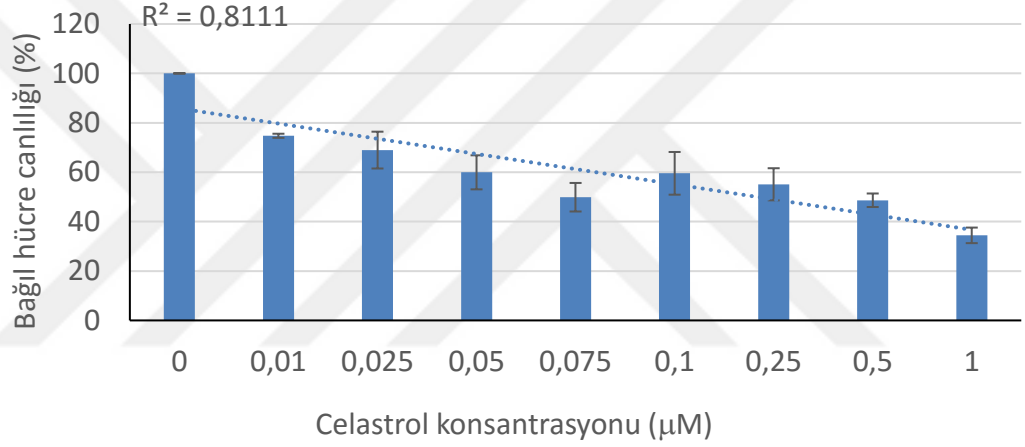
### **2.2.11. İstatistiksel analiz**

MTT hücre canlılığı testi ve hücre sağkalım analizi Windows graph pad prism 6 yazılım ile grafik hale düzenlenmiştir. Gruplar kontrole göre anlamlarını değerlendirilmektedir. İstatiksel değerlendirilmelerde  $p < 0.05$  anlamlılık seviyesi temel alındı. Deney gruplarında, değerler ANOVA testi uygulanmıştır.

### 3. SONUÇLAR

#### 3.1.CELASTROL'UN HELA HÜCRE HATLARINDA CANLILIĞA ETKİSİ

HeLa servikal kanser hücre hattında Celastrol 24 saat uygulandıktan sonra doza bağlı olarak etkinliğini gösterebilmek amacı ile MTT hücre canlılığı analizi yapıldı. İlaç uygulamaları ile konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu görüldü. Celastrol uygulanan hücrelerde, 24 saat sonrasında kontrol hücrelerine oranla sırası ile hücre canlılığı 0,075  $\mu$ M ve 1  $\mu$ M ilaç konsantrasyonlarında %63 ve % 35 oranlarında azalmaktadır. Bu çalışmada Celastrol dozları 0,075  $\mu$ M ve 1  $\mu$ M olarak belirlenmiştir, sadece bu dozlar ile çalışılmaktadır (Şekil 3.1).

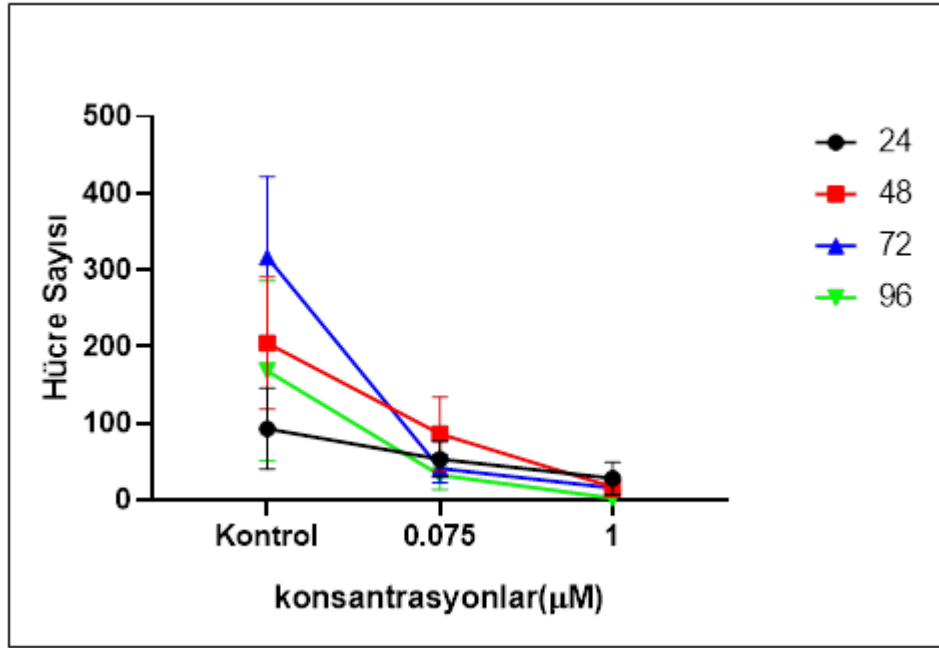


Şekil 3. 2. Celastrol'ün HeLa hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin MTT testi ile belirlenmesi. HeLa hücreleri, 10000 hücre/kuyucuk yoğunluğunda 96 kuyucuklu mikropelatelere eklendi. Hücreler, 24 saat boyunca 0-1 mikrogram Celastrol konsantrasyonlarına maruz bırakıldı. Kolon grafik, 8 biyolojik kopya içeren en az 4 tekrarlı deney sonuçlarını göstermektedir. Ortalama  $\pm$ Std. Dev. Seçilen Celastrol konsantrasyonlarında T-testi uygulandı; \*\*\*\* p<0.0001.

### 3.2.CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL KANSERİ HÜCRE HATTINDA SİTOSTATİK ETKİSİ

Celastrol 'ün HeLa hücrelerine olan etkisini zamana bağlı olarak tespit etmek için sağkalım analizi yapıldı. HeLa hücre hatlarına 0.075  $\mu$ M ve 1  $\mu$ M konsantrasyonlarda 24, 48, 72, 96 saat ilaç uygulamaları gerçekleştirildi. Tripan mavisi ile boyama yapıp ve canlı hücreler sayıldı (Şekil 3.2.)

Kontrol ile Celastrol uygulamalarının hücre sayısına olan etkileri ele alındığında hücre sayısı kontrol örneklerinde 96. saatte % 69 oranında artarken, 0.075  $\mu$ M Celastrol uygulandığında bu oran % 94 azalmakta, 1  $\mu$ M uygulamasında ise % 97 oranında azalış olduğu belirlendi.



Şekil 3.2. Celastrol'ün HeLa Servikal kanser hücre hattında sitotoksik veya sitostatik etkiye aracılık eder. HeLa hücreleri, 50000 yoğunluğunda 6 kuyucuklu kaplara ekildi. 0, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde hücreler seçilen Celastrol konsantrasyonlarına maruz bırakıldı (0.075 ve 1  $\mu$ M). Grafikler ortalama  $\pm$  Std. Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

### 3.3.CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNİN KOLONİ OLUŞTURMA POTANSİYELİNE ETKİSİ

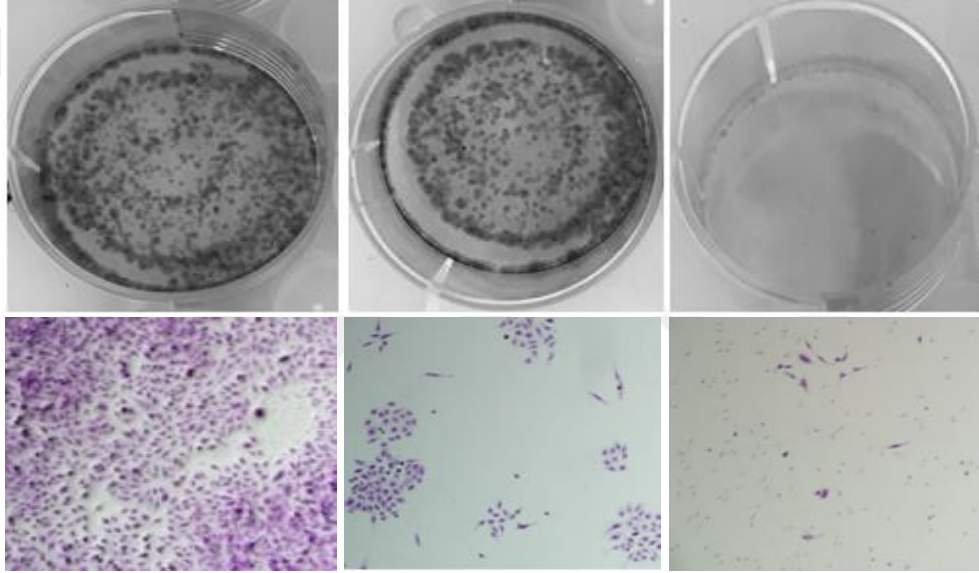
Koloni formasyon deneyi tek bir hücrenin bir koloni halinde büyüme kabiliyetine dayanan bir *in vitro* hücre sağkalım testidir. Bu araştırmada HeLa servikal kanser hücrelerin Celastrol'ün farklı dozlarda maruz bırakıldı ve 24 saat sonra ilaç dozuna bağlı olarak koloni oluşumu incelendi ve sonuç olarak Celastrol doza bağlı olarak HeLa hücrelerin etkilimekte ve 1 $\mu$ M Celastrol hücreye verildiğinde koloni oluşumu çok az veya görülmemektedir (Şekil 3.3).

#### CELASTROL UYGULAMASI ( $\mu$ M)

0

0.075

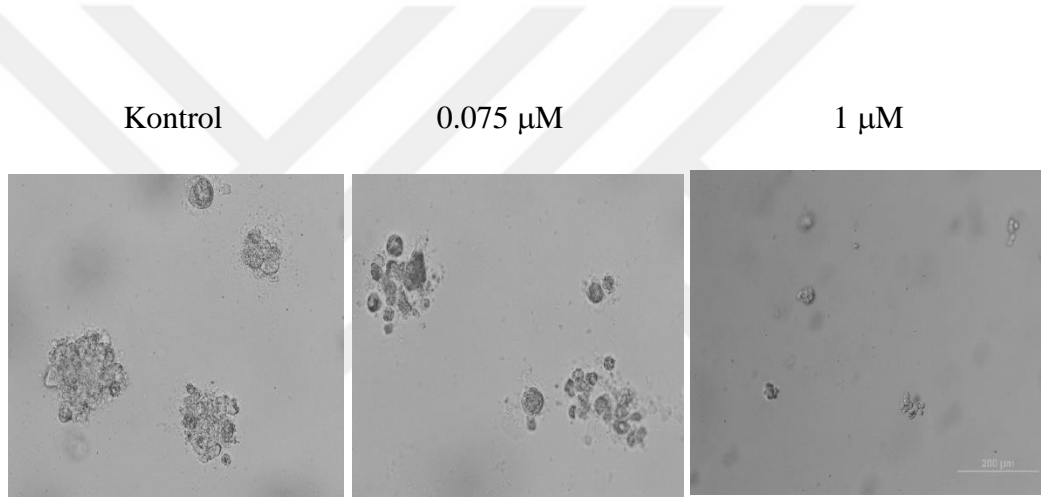
1



Şekil 3.3. Celastrol'ün Hela hücrelerinde koloni oluşumuna etkisi. HeLa 1000 yoğunluğunda 6 kuyucuklu kaplara ekildi. Hücreler 24 saat boyunca seçilen Celastrol konsantrasyonlarına (0.075 ve 1  $\mu$ M) maruz bırakıldı. Daha sonra, taze besiyerle değiştirildi ve koloni oluşumu için 8 gün beklenildi. Daha sonra kolonilere zarar vermeden besiyer atıldı ve hücreler oda sıcaklığında 5 dakika boyunca metanol ve asetik asit (3:1) ile sabitlendi. 1X PBS ile yıkandıktan sonra, hücreler 15 dakika boyunca kristal viyole ile boyandı, daha sonra fazla boya dH<sub>2</sub>O ile yıkandı.

### 3.4.CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL HÜCRA HATLARINDA YARI YUMUŞAK AGAR YÖNTEMİ İLE KOLONİ OLUŞUMUNUN BELİRLENMESİ

Yumuşak agarda koloni oluşumu deneyi, hücresel ankrjadan bağımsız büyüme*yi in vitro* olarak doğrulamak için kullanılan bir yöntemdir. HeLa servikal kanser hücrelerine Celastrol 0.075 ve 1  $\mu$ M konsantrasyonlarda uygulandı. Daha sonra 10 gün boyunca koloni oluşumunu beklerken taze besiyer ile takviye edildi ve floresan mikroskop ile görüntüledi. Kontrol ile kıyaslandığında Celastrol'ün genel olarak zamana ve ilaç dozuna bağlı olarak koloni oluşumunu azalttığı belirlendi. En kayda değer koloni oluşumu azalmasının 1  $\mu$ M Celastrol ile muamele edilen hücrelerde olduğu belirlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Yumuşak agar yöntemi ile koloni oluşumunun belirlenmesi. 6 kuyucuklu petri kaplarına %0,5 lik agaroz ve besiyer karışımı eklenip ve dondurduktan sonra üzerine %0,3 lik agaroz ve hücre ve besiyer karışımı ekleyip ve kuyucuklara Celastrol uygulandı ve 10 gün boyunca besiyeri yenilendi ve HeLa servikal kanser hücreleri daha sonra floresan mikroskopta görüntüledi. Sonuçta Celastrolün kontrole oranla yoğunluğa bağlı olarak koloni oluşumunu azalttığı saptandı.

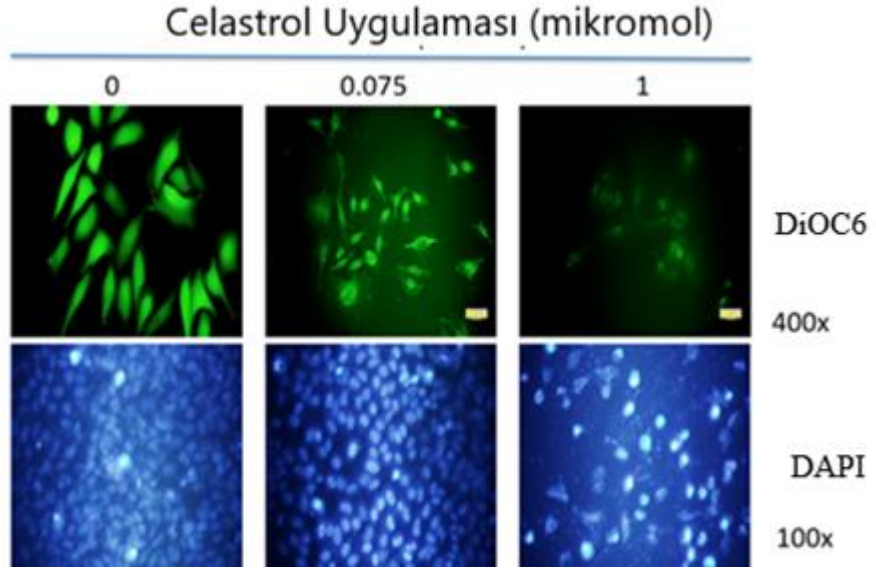
### 3.5. FLUORESAN MİKROSKOBUNDA HÜCRE SAĞKALIM VE ÖLÜMÜNÜN BELİRLENMESİ

HeLa servikal kanser hücrelerinde Celastrol uygulaması sonunda hücre sağkalım ve ölümünü belirlemek için farklı boyalarla işlemler gerçekleştirildi ve floresan mikroskopu ile görüntüledi Şekil 3.5 de görüldüğü gibi 3 farklı boyama işlemi yapıldı. 12 kuyucuklu petriye 50000 hücre ekim yapıldı ve 24 saat sonra ilaç uygulanıp ve tekrar 24 saat sonra 3 farklı boya ile kendi yöntemleriyle işlemler gerçekleştirildikten sonra floresan mikroskopta görüntüledi.

Dioc6 lipofilik özellikte olup endoplazmik retikulum, vesiküllerin ve mitokondri membranlarının boyanmasında kullanılan bir floresan boyadır. Canlı hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Floresan mikroskop ile 488 nm/525nm de yeşil olarak gözlemlendi. HeLa hücrelerine Celastrol ilacı uygulandığında ilaç dozuna bağlı olarak kontrol hücreleri ile kıyaslandığında canlı hücre miktarının azaldığı gözlemlendi ve en fazla azalmanın 1  $\mu$ M Celastrol uygulanan hücrelerde olduğu belirlendi (Şekil 3.5).

DAPI ise bozulmuş hücre membranından geçerek DNA'daki adenin ve timin açısından zengin bölgelere güçlü bir şekilde bağlanmaktadır, böylece apoptozun en önemli göstergesi olan DNA kırıklarını belirlemek mümkün olmaktadır. Şekil 3.5 de HeLa servikal kanser hücrelerinin, Celastrol uygulanan hücrelerde zamana ve doza bağlı olarak azaldığını görülmektedir. 1  $\mu$ M Celastrol uygulanan hücrelerde daha fazla apoptotik hücre belirlendi (Şekil 3.5).



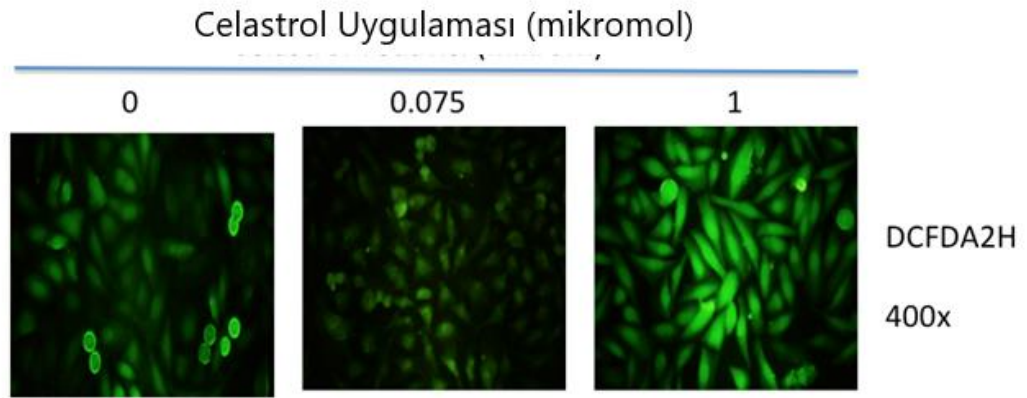


Őekil 3.5. Fluoresan mikroskobunda hücre sađkalým ve ölümünün belirlenmesi.

Hücreler 3 farklý boya ile boyandıktan sonra Celastrol uygulamasý yapılan hücrelerde doza bađlý olarak hücre canlılığının azaldığı saptandı. 1  $\mu$ M Celastrol uygulamasında HeLa hücrelerinin canlılığı kayda değer bir Őekilde engellenmektedir. Fluoresan mikroskobunda 20X büyütme kullanılmıŐtır.

DCFDA2H, hücre içindeki hidroksil ve diğer reaktif oksijen türlerinin (ROS) aktivitesini belirleyen bir boyadır. HeLa servikal kanser hücreleri ilaç uygulandıktan 24 saat sonra floresan mikroskop ile görüntülendi. Celastrol'un doza bağlı olarak (1  $\mu$ M) reaktif oksijen türlerini arttırdığı saptandı (Şekil 3.6).

Bu etki 0.075  $\mu$ M Celastrol daha az ancak 1 mM uygulamasında çok daha kesin bir SOD stimülaasyonu olduğu gözlemlendi. Bu bulgular Celastrol'un apoptoz üzerine olan teşvik edici etkisini onaylar niteliktedir. Celastrol hem apoptozu ve hem de ROS oluşumunu kayda değer bir şekilde stimüle etmektedir. Bu bulgu hem mikroskopik hem de moleküler düzeydeki analizlerle ortaya konmuş olmaktadır.

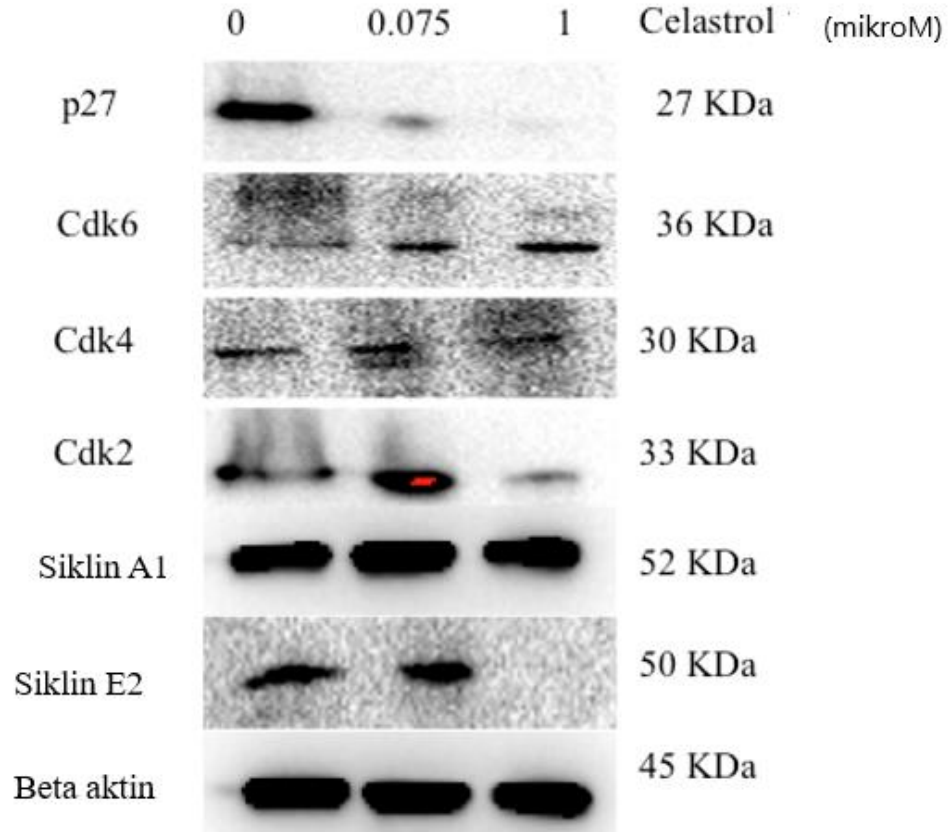


Şekil 3.6. Celastrol HeLa servikal hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna etkisi. DCFDA2H boya ile hücre içindeki hidroksil ve diğer reaktif oksijen türlerinin aktivitesini ölçen bir boyadır. Floresan mikroskopta 400x büyütme kullanılmıştır.

### **3.6.CELASTROL'ÜN HELA SERVİKAL KANSERİ HÜCRELERİNDE HÜCRE DÖNGÜSÜNE ETKİSİ**

HeLa servikal kanser hücrelerine Celastrol 0,075 ve 1  $\mu$ M konsantrasyonlarda uygulandı ve western blot analizi gerçekleştirildi ve daha sonra Chemidoc MP cihazı ile görüntülenme yapıldı. HeLa hücreleri 1  $\mu$ M Celastrol'e maruz kaldığında p27 ve siklin E2 protein düzeyleri engellenmektedir, bu durumda hücre döngüsünde

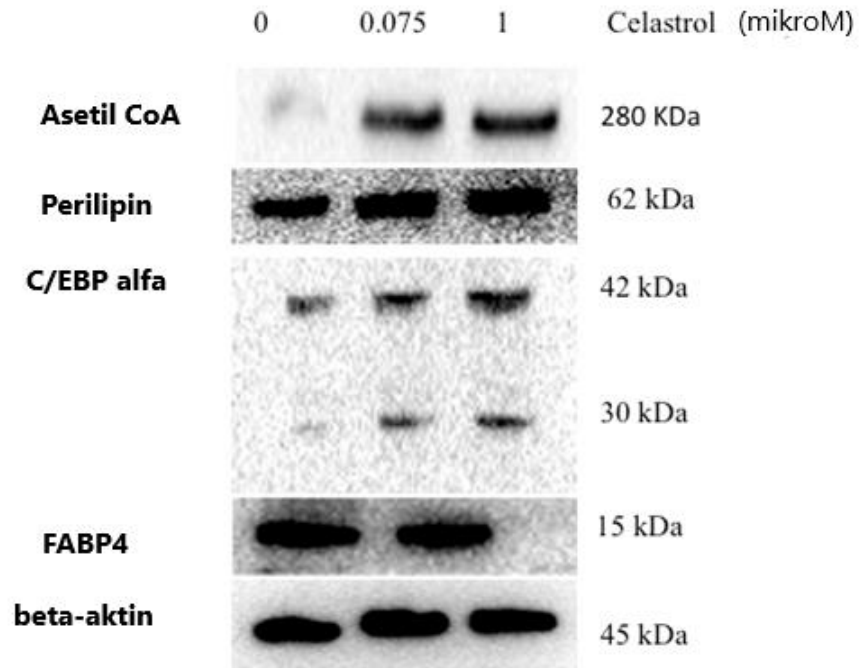
G1/S fazının aktivasyonu önlenmektedir. Öte yandan CDK 6, CDK 4, CDK 2 nin Celastrol'den doza bağlı olarak daha az etkilendiği belirlendi. Siklin A1 üzerinde ise doza ve zamana bağlı olarak etkisinin olmadığı saptandı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Celastrol'ün HeLa servikal kanseri hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi. Hela hücreleri 24 saat boyunca 0,075 µM ve 1µM Celastrol ile muamele edildikten sonra protein izolasyonu yapıldı ve %12'lik SDS jelde yürütülüp ve PVDF membran üzerine transfer edilerek primere antikorlarının bağlanması sağlandı ve sonra primerde ve sonra sekonderde bekletip ve sonuçlar Chemidoc MP cihazı ile görüntülendi. β-aktin kontrol olarak kullanıldı.

### 3.7. CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL KANSERİ HÜCRELERİNDE LİPİD METABOLİZMASINA ETKİSİ

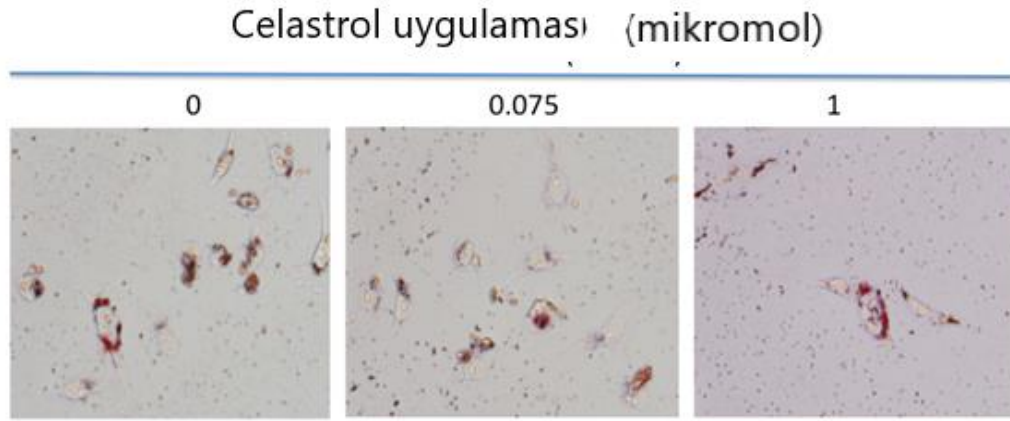
Celastrol'un lipid metabolizmasına olan etkisini servikal kanser hücrelerinde belirlemek amacı ile Western blot analizleri yapıldı ve Chemidocda görüntülendi. Yağ asidi bağlayıcı protein 4 ün (FABP4) Celastrol'ün dozuna bağlı olarak arttığı saptandı. Perilipin ise en iyi karakterize edilmiş lipid damlacıkları ile uyumlu bir proteindir ve lipoliz regülasyonunda kritik rol oynamaktadır. Bu noktadan yola çıkılarak perilipinin Celastrol'den etkilenimi araştırıldı ve kayda değer bir fark belirlenemedi ve C/EBP $\alpha$  ve Asetil CoA miktarında ise ilacın dozuna bağlı olarak kayda değer olmamakla birlikte bir artışa neden olduğu saptandı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Celastrol'ün HeLa servikal kanser hücrelerinde lipid metabolizma yollarının etkisi. %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek primere antikorlarının bağlanması sağlandı ve Chemidoc MP cihazı ile görüntülendi.  $\beta$ -aktin kontrol olarak kullanıldı.

### 3.8. CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL HÜCRELERİNDE LİPİD BİRİKİMİNE ETKİSİ

Hela servikal kanser hücrelerinde Celastrol muamelesi yapıldıktan sonra % 0,2 Oil-Red-O lipid boyası ile uygulama yapılarak lipid damlacıkları kırmızı olarak gözlemlendi. Celastrol HeLa hücreleri üzerinde doza bağlı olarak lipid damlacıklarının oluşmasında azalmaya neden olmaktadır (Şekil 3.9).

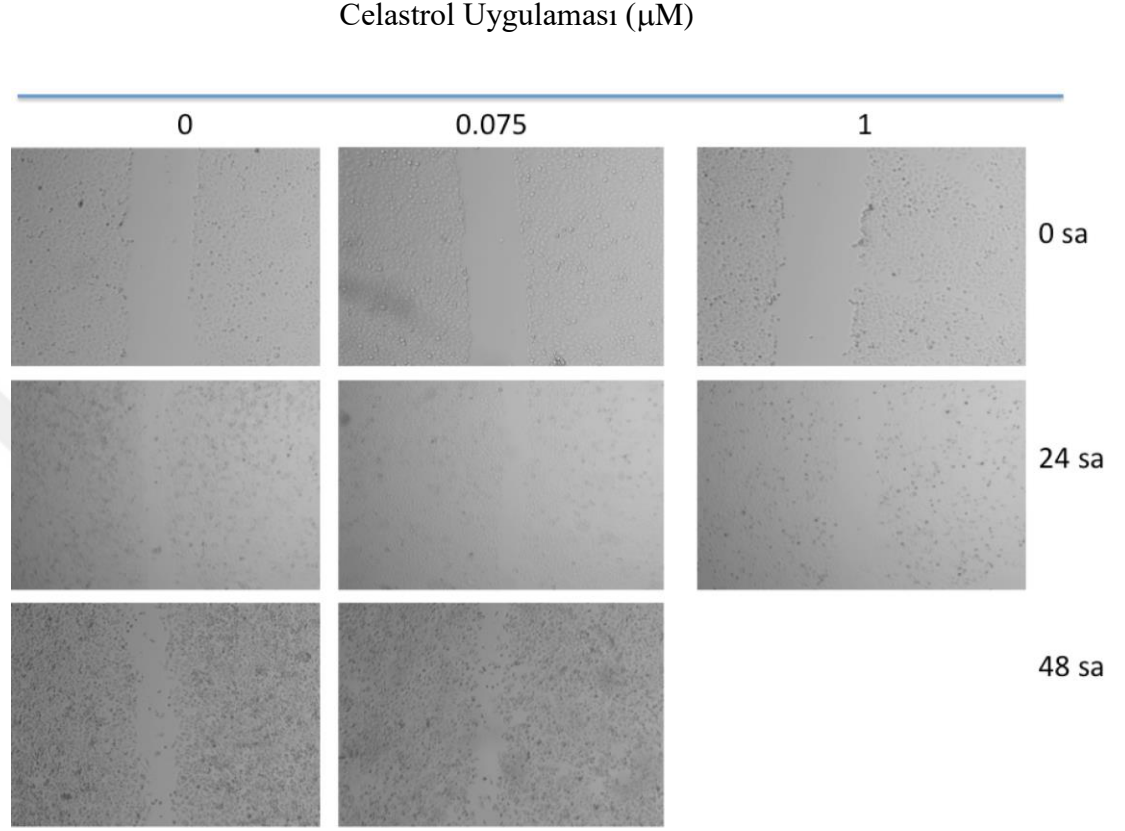


Şekil 3.9. Celastrol'ün HeLa servikal kanser hücrelerinde lipid metabolizması yollarına etkisi. %12'lik SDS jelde yürütüldükten sonra PVDF membran üzerine transfer edilerek primere antikorlarının bağlanmasını sağladı ve Chemidoc MP cihazı ile görüntülendi.  $\beta$ -aktin kontrol olarak kullanıldı.

### 3.9. CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL KANSER HÜCRELERİNDE İNVAZİV VE METASTATİK ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ

Celastrol'ün HeLa servikal kanser hücrelerinin üzerine olan invaziv ve metastatik karakterlerinin belirleyebilmek için yara kapanma deneyi yapılmıştır. Bu kapsamda hücrelerin ilaç uygulama saati içerisinde ne kadar bölündüğü ve/veya hareket ettiği saptanmıştır. Sonuçta kontrol ile kıyaslandığında Celastrol'un doza ve zamana bağlı olarak yara iyileşmesinde değişim yaptığı görülmüştür. Kontrol hücrelerinde yara iyileşmesi 48 saat sonra %60 iyileşme gösterirken, 0.075  $\mu$ M Celastrol uygulamasında 48 saat sonra yara iyileşmesi görülmemiştir. Buna karşın HeLa servikal kanser hücre hattına 1  $\mu$ M Celastrol eklendiğinde 24 saat sonra yara

iyileşmesi görülmemiştir ve zaman ilerledikçe daha fazla yara açılmış, çünkü hücreler ilaç etkisiyle apoptoza eğilim göstermişlerdir ve 48 saat sonra 1  $\mu\text{M}$  ilaçlı hücrelerde hücrelerin çok azaldığı görülmektedir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Celastrol'ün HeLa servikal kanseri hücrelerinde yara İyileşmesi üzerine etkisi. Kontrol ve 2 farklı doz ilaç uygulanan HeLa hücreleri 24 ve 48 saatlerde ışık mikroskop ile görüntülendi. Kontrolün yara iyileşmesi 48 saat sonra %60 iyileşme görünürken, ilaç uygulanan hücrelerde farklı sonuç elde edilmiştir.

0.075  $\mu\text{M}$  celastrol uygulandığında 0-48 saat içerisinde yara iyileşmesi %50 oranında görülürken 1 $\mu\text{M}$  Celastrol HeLa hücrelerinde 0-48 saat sonra azalmaktadır ve yara iyileşmesinde azalma olmamaktadır.

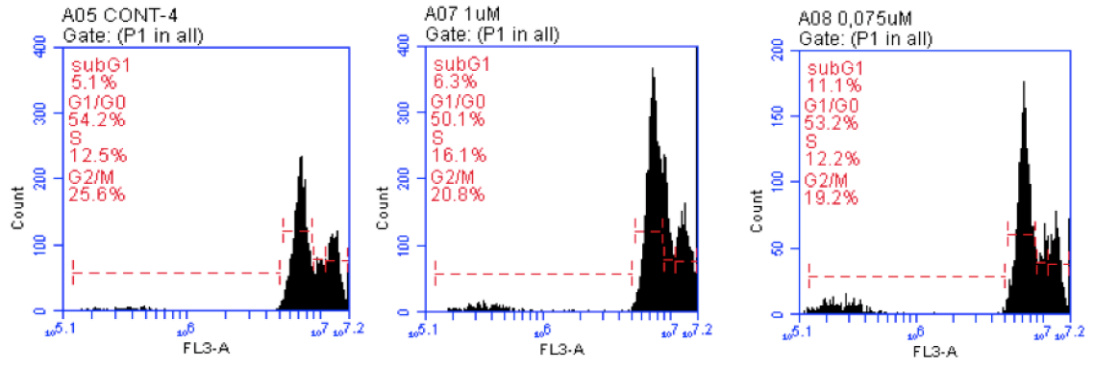
### 3.10. CELASTROL'ÜN HeLa SERVİKAL KANSERİNDE HÜCRE DÖNGÜSÜNE OLAN ETKİSİNİN HÜCRE AKIŞ SİTOMETRESİ İLE BELİRLENMESİ

Celastrol'ün HeLa servikal kanseri hücre hattında hücre döngüsüne olan etkisi flow sitometri ile de analiz edilmiştir. PI fluoresan boyası hücrelerin DNA sına bağlanarak DNA içeriği hakkında bilgi vermektedir. DNA ya bağlanan boya miktarı her bir hücredeki DNA miktarı ile orantılıdır. 0,075  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  Celastrol'ün 24 saat uygulamasının hücre döngüsü üzerine olan etkisini göstermek için hücre akış sitometrisi analizi gerçekleştirildi.

Kontrol, 0,075 $\mu\text{M}$  Celastrol ve 1 $\mu\text{M}$  Celastrol ile kıyaslandığında G0/G1 fazındaki hücreler arasında kayda değer bir fark belirlenemezken. S fazı hücrelerinde kontrola kıyasla 1  $\mu\text{M}$  Celastrol uygulamasında % 29 oranında bir artış saptandı. G2/M fazındaki hücrelerde de kontrola oranla 0.075  $\mu\text{M}$  uygulamasında % 25 artış bulunurken, 1  $\mu\text{M}$  uygulamasında % 19 azalış belirlendi. SubG1 analiz edildiğinde ise 0.075  $\mu\text{M}$  Celastrol uygulandığında 2 kat artış belirlenirken 1  $\mu\text{M}$  uygulandığında kayda değer bir fark belirlenememiştir. Sonuç olarak 0.075  $\mu\text{M}$  Celastrol uygulamasında apoptoz tetiklenmiş, diğer uygulamalarda ise kayda değer bir farklılık olmamıştır (Şekil 3.11).

Tablo 3.1. Hücre akış sitometresinde Celastrol'ün farklı konsantrasyonlarının hücre döngüsünün farklı evrelerindeki etkileri.

UYGULAMA	HÜCRE DÖNGÜSÜ EVRELERİNDEKİ HÜCRE SAYISI (%)			
	G0/G1	S	G2/M	Sub G1
Kontrol	54,2	12,5	25,6	5,1
0.075 $\mu\text{m/L}$ Celastrol	53,2	12,2	19,2	11,1
1 $\mu\text{m/L}$ Celastrol	50,1	16,1	20,8	6,3



Şekil 3.11. Celestrol'ün HeLa servikal kanser hücrelerinde, hücre döngüsüne olan etkisinin hücre akış sitometresinde analiz edilmesi. Celestrol 0.075  $\mu$ M ve 1  $\mu$ M konsantrasyonlarda uygulandı.



#### 4. TARTIŞMA

Celastrol geleneksel Çin tıbbında şifalı bir bitki olarak kullanılmaktadır (Tong v.d. 2007) ve birçok hastalığın tedavisinde olumlu sonuçlar vermiştir, yapılan araştırmalar Celastrol'un kanser hücrelerinde canlılığı inhibe edebileceğini, hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirebildiğini ve apoptozu uyardığını ortaya koymuştur.

Bu araştırmada Celastrol'un yağ asidi sentaz yolağı üzerindeki etkileri HeLa servikal kanser hücrelerinde incelenmiştir. Tüm dünya kadınlarında ikinci yaygın malign kanser türü ve dördüncü ana kansere bağlı ölüm nedeni servikal kanserdir (Jemal v.d. 2011). Servikal kanserin tekrarlanma hızı fazladır, yüksek metastaz riskine sahiptir ve bu da yüksek ölüm oranına yol açmaktadır (Pectasides v.d. 2008). Yağ asidi sentaz yolağında birçok kilit hedefler bulunmaktadır, bu araştırmada hücre döngüsü kilit proteinleri CDK lar ve p27 ele alınmıştır ve P27 aktivitesinin CDK üzerinde etkin işlevi belirlenmiştir. Celastrol insan HeLa servikal kanser hücrelerinde, hücre döngüsünde G2/M fazın durmasına neden olduğu Rajendran v.d. (2012) tarafından gösterilmiştir ve bu araştırmada elde edilen veriler bu araştırma ile uyumluluk göstermektedir.

Bu çalışmada MTT canlılık testi ile elde edilen veriler, HeLa servikal kanser hücrelerinde Celastrol'un 2 farklı dozda (0,075  $\mu$ M ve 1  $\mu$ M) hücre canlılığında etkili olduğu gösterilmiştir. Celastrol uygulanan hücrelerde, 24 saat sonra sırası ile 0,075  $\mu$ M ve 1  $\mu$ M ilaç konsantrasyonlarında %50 oranına yakın kontrol hücrelere göre hücre canlılığı azalmaktadır. Bu araştırmada yapılan tüm uygulamalarda 2 farklı doz kontrol ile kıyaslanmıştır.

Günümüze kadar elde edilen veriler Celastrol'un yağ asidi sentez yolağının üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Hücre döngüsünü düzenleyici bir protein olan p27 nin, vücut hacmi ve yağ dokusu ile birlikte arttığı bilinmektedir. Bu çalışmada ise HeLa servikal kanser hücreleri Celastrol'e maruz bırakıldığında p27 nin ve yağ dokusunun azaldığı saptandı

P27 nin metabolik etkilerinden birisi Cdk aktivitesinde farklılıklar yaratmasıdır ve farklı CDK'larda inhibitör aktiviteye sahiptir ve potansiyel bir tümör baskılayıcı gen olarak görev yapmaktadır (Agnantis v.d. , 2002). P27 aynı zamanda protein birikiminin bir sonucu olarak, hücre döngüsüne yeniden girişi bloke etmekte ve

böylece adipozitlerin farklılaşmasını engellemektedir ve buna bağlı olarak da Cdk aktivitesinin inhibisyonu ile hücre döngüsünün engellenmesi meydana gelmektedir (Patel v.d. 1999). P27 siklin bağımlı kinaz (Cdk) inhibitörü olarak hücre çoğalmasını ve hücre hareketliliğini ve apoptozu düzenlemektedir (Isabel v.d. ., 2008). Bir başka araştırmada p27 nin yağ oluşmasında etkili olduğu gösterilmiştir. KO farelerinde p27 nin azalması leptin reseptöründe artan yağ kütlesi hücrede görülmüştür (Uchida v.d. ., 2005). Literatüre bakıldığında Celastrol'un, insan monositik lösemi hücrelerini (U937), G0/G1 fazında durdurduğu saptandı ve bu nedenle siklin D1, cdk4, cdk6 ve cdk2'nin aşağı regülasyonunun gerçekleştiği ortaya kondu (Bin Peng v.d. ., 2010). Bu araştırmada elde edilen veriler literatürdeki bu verilerle kıyaslandığında aynı doğrultuda bulguların elde edildiği görülmektedir ve Celastrol HeLa servikal kanser hücrelerine uygulandığında siklin D1, cdk4, cdk6 ve cdk2 nin aşağı regülasyonu oluşmaktadır.

Siklin E nin aşırı ekspresyonu çeşitli insan kanserlerinde gözlenmiştir ve siklin E tümör gelişiminde önemli rolü oynamaktadır (Keyomarsi v.d. .,1994). Siklin E ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27, G1-S geçişinin iki önemli düzenleyicisidir (Eelanson v.d. ., 1998). Siklin E1 ve Siklin E2 ikisi birlikte Siklin E olarak kabul edilmektedir ve G1/S fazının siklinleridir (Vincent v.d. ., 2012). Bu çalışmada HeLa servikal kanser hücrelerine, Celastrol'un doza bağlı olarak Siklin E ekspresyonunu azattığı ve durdurduğu saptandı.

Hücre döngüsü, kanser patojenindeki değişiklikler için ana hedef durumundadır. Tüm kanserler, tümör baskılayıcılarda veya G1/S geçişini düzenleyen onkogenlerde mutasyon içermektedir (Knudson, 2002). Siklin'ler hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynarlar ve siklin A1, hücrelerin G2/M fazı boyunca ilerlemesi için gereken siklindir. Siklin A1 alternatif bir CDK2 ye bağımlı A tipi siklindir ve erken mayozda önemli rolü vardır (Sweeney v.d. ., 1996). Yapılan bu çalışmada ise HeLa servikal kanser hücrelerine Celastrol uygulandığında siklin A1 miktarında önemli bir fark belirlenmemiştir.

Celastrol HeLa servikal kanser hücrelerinde lipid metabolik yollarını modüle etmekte ve bunu ortaya koyabilmek için western blot analizleri gerçekleştirildi

FABP4 (fatty acid binding protein 4), hedef hücrelerde, özellikle adipozitler ve makrofajlarda, inflamatuvar ve metabolik süreçlerle ilgili olarak glukoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Hotamisligil v.d. ., 1996).

FABP4 eksikliği olan adipozitlerin lipoliz etkinliğini azalttığı belirlenmiştir (Scheja v.d. .,1999). FABP4'ın yüksek ekspresyonunun, yüksek dereceli rezidüel hastalığın (Kanser hücreleri kemik iliğinden) güvenilir bir moleküler belirleyicisi olabileceğini gösterilmiştir (Tucker v.d. .,2014). Bazı çalışmalarda FABP4'ün hücre proliferasyonunu ve apoptotik süreçleri etkileyebileceği de bulunmuştur (Boiteux v.d. ., 2009). FABP4'ün işlevi, küçük hücreli olmayan akciğer, meme, mesane, prostat ve servikal kanserlerde gözlenmiştir (Thompson v.d. ., 2017).

Literatürde, Celastrol'ün insan dopaminerjik hücrelerinde rotenonun neden olduğu hücre hasarına etkileri incelenmiştir. Celastrol 0-8 gün tedavi amaçlı uygulanmıştır. Celastrol C/EBPa ve FABP4 ekspresyonunu azaltarak çoğu TG (tiroglobulin) yi azalttığı belirlenmiştir (Choi v.d. ., 2016). Perilipin ailesi, lipolizi inhibe ederek lipid homeostazını sağlamaktadır (Asimakopoulou v.d. 2019). Lipid damlacıklarını stabilize eden ve lipolizi kontrol eden perilipin üyesi (perilipin 2) hem yağlanmanın gelişmesine ve hem de glukoza karşı geliştirilmiş toleransa katkıda bulunmaktadır (Sun, v.d. ., 2012). Adenovirüs adipositlerde Celastrol'ün perilipin 1 in aşırı ekspresyonuna aracılık ettiği de saptanmıştır (Li v.d. ., 2014).

Bu araştırmada HeLa servikal kanser hücreleri Celastrol'e maruz kaldığında adipositler perilipin'in ekspresyonuna aracılık etmişler. Western blotting yöntemi ile Celastrolün perilipin üzerinde etkili olduğu ve perilipinin arttığı gösterilmiştir. Celastrol'ün lipid birikimi ve adipogenez üzerindeki inhibitör etkisi, doza ve uygulama süresine ve bireysel donöre bağlı olarak değişmektedir. Aynı sonuç adipositlerde C/EBPa ve asetil CoA da da görülmektedir. Sonuç olarak Celastrol, HeLa servikal kanser hücrelerinde lipid birikimini önlediği söylenebilir.

Kanser hücrelerinin tümör uygulama alanından koloni oluşumu etkinliği, yüksektir. Servikal kanser hücre hatlarında (Hela hücrelerinde) koloni oluşumu fazladır. Tümörden oluşan tek hücreler, kendini yenileme potansiyelini yansıtan ikinci tümör hücrelerini üretebilmektedir (Cioce v.d. ., 2010). HeLa servikal kanser hücreleri, yapışkan olmayan kültür sistemi kullanılarak zenginleştirildi ve genişletildi. Zenginleşmiş kanser hücreler, CSC (kanseri kök hücre) fenotipini sergiledi ve servikal kanseri veya diğer kanser türlerin terapötik temel ve poliklinik incelenmesi için CSC'lerin faydalı bir model olabilmektedirler. İnsan servikal kanseri tedavisi ve önlenmesi için yeni bir yöntem olabilir ve bu nedenle daha fazla araştırmaya gereklilik vardır (Kim v.d. ., 2006).

Bu araştırmada Celastrol farklı dozlarda HeLa servikal hücrelerine uygulanarak koloni oluşumu incelendi. Kontrol ile kıyaslandığında zamana ve doza bağlı olarak koloni oluşumunun azaldığı saptandı. Bu veri Celastrol'un HeLa servikal kanser hücrelerinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

HeLa servikal kanser hücreleri Celastrol ilacına maruz kaldığında soft agarda koloni oluşumu 10 gün sonra kontrol ile kıyasla ilaç dozuna bağlı olarak kayda değer oranda azalmaktadır.

Genel olarak, *In vitro* yara iyileşmesi (scratch assay), laboratuvarında hücre göçünü analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir. Yapılan araştırmalarda Celastrol'un epitel hücrelerinin hareketliliğini doğrudan etkilediği tespit edilmiştir ve bu veri yara iyileşmesi deneyi ile saptanmıştır (Eraslan v.d. ., 2009). Bu araştırmada, HeLa servikal kanser hücrelerinde Celastrol 2 farklı dozda uygulandığında 1 gün sonra kontrol hücrelerinde %60 oranında yara iyileşmesi belirlenirken, uygulama yapılan hücrelerde yara iyileşmesi meydana gelmediği gözlemlendi.

Ayrıca farklı boyama yöntemleri kullanılarak hücre canlılığı araştırmaları gerçekleştirildi: DiOC6 lipofilik bir boyadır ve hücrenin endoplazmik retikulumu ve mitokondri membranını boyamakta ve canlı hücrelerin nükleusunun yeşil renkte görünmesini sağlamaktadır (Gokçe v.d. ., 2011). DCFH ise hücre içi ROS düzeyinin tespiti için kullanılan bir boyadır. DCFH ile boyanan kanser hücrelerinin içindeki ROS birikimi fluoresan göstermektedir ve bu da apoptozun uyarıldığının göstergesidir (Rahman v.d. ., 2015). DAPI mavi fluoresan sergileyen DNA'ya özgü bir boyadır ve canlı hücre zarından geçmektedir. DAPI boyama apoptozda hücre zarı geçirgenliğini arttırmakta ve daha güçlü bir mavi fluoresans vermektedir (Kapuscinski., 1995). HeLa servikal kanser hücreleri DAPI boyaması ile apoptotik hücreler belirlenmiş ve apoptotik hücre sayısı kontrol grupundan daha fazla gözlenmiştir. Farklı dozlarda ilaç uygulanan hücrelerde, doza bağımlı şekilde apoptoz ve DNA kırıklarına neden olduğu görülmüştür (Rahman v.d. ., 2015).

HeLa servikal kanser hücrelerine Celastrol uyguladıktan sonra hücre ölüm ve sağkalımını saptamak için, hücrelere boyama işlemleri yapılarak floresan mikroskopunda görüntülenmiştir. Yapılan araştırmada 4 farklı boya DİOC6, DCFH, DAPI kullanıldı ve hücreleri ilaçlı ve ilaçsız durumlarda incelendi (Şekil 3.5).

DİOC6 ile HeLa servikal kanser hücreleri boyanmıştır ve 3 farklı durumda (kontrol, 0,075  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  Celastrol) incelenmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında Celastrol hücreye eklendiğinde DİOC6 canlı hücrelerin mitokondri membranını daha az boyamaktadır ve 1  $\mu\text{M}$ 'de en az yeşil renk görülmektedir. Celastrol'un doza bağlı olarak canlı hücre sayısını azalttığı gözlenmiştir.

DCFH hücre içi ROS seviyesini tespiti için kullanılan bir boyadır. HeLa servikal kanser hücrelerine Celastrol uygulandığında 1  $\mu\text{M}$  Celastrol kontrol ile kıyaslandığında ROS'un daha fazla olduğu saptanmıştır. DAPI mavi floresan veren DNA'ya özgü bir boyadır, sağlam ve canlı hücre zarından geçebilir. HeLa servikal kanser hücrelerine uygulandığında kontrol ile kıyaslandığında doza bağlı olarak canlılık farklıdır ve 1  $\mu\text{M}$  Celastrol uygulandığında canlı hücreler azalmıştır. Celastrol 0,075  $\mu\text{M}$  eklendiğine, kontrol ile kıyaslandığında canlılıkta az fark görülmüştür.

Celastrol'un hücre siklusuna olan etkisi DU145 prostat kanseri hücre hattında çalışılmış ve flow sitometri ile incelenmiştir. Celastrol 24 saat boyunca 0,5-2  $\mu\text{M}$  hücrelere uygulanmış ve Celastrol'un DU145 hücrelerinde apoptozu arttırdığı G0/G1 faz hücrenin yüzdesi kademeli olarak artmış ve S fazı hücrelerinin oranı azalmış ve G2/M fazındaki hücrelerin yüzdesi üzerinde ise az bir etkisi olmuştur (Arcangeli v.d. ., 2009). Bir diğer araştırmada da Celastrol'un DU145 prostat kanseri hücre hatlarında G0/G1 fazında hücreleri bloke ettiği bildirilmiştir (Arcangeli v.d. ., 2009).

Bu araştırmada da Celastrol iki farklı dozda (0,075  $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$ ) hücrelere uygulanmış ve kontrol ile kıyaslandığında apoptoz yüzdesi üzerinde çok etkili olduğu saptanmıştır, ayrıca 0,075  $\mu\text{M}$  Celastrol'un G0/G1, G2/M fazlarında hücrelerin yüzdesi üzerinde az etkili olmuştur. Hücre siklusuna olan, Celastrol'un etkisi HeLa servikal kanser hücre hattında çalışılmış ve flow sitometri ile incelenmiştir. 0,075 ve 1  $\mu\text{M}$  Celastrol 24 saat boyunca hücrelere uygulanarak kontrol ile kıyaslandığında, Celastrol'un HeLa hücrelerinde apoptozu ve G0/G1 fazındaki hücrelerin yüzdesini kademeli olarak azalttığı saptandı. Ayrıca S fazı hücrelerinin

yüzdesi kontrol ile kıyaslandığında 0,075  $\mu$ M Celastrol uygulamasında azalma ve 1  $\mu$ M uygulamasında ise artış gözlemlendi ve G2/M fazı hücrelerinin yüzdesinin de azaldığı belirlendi. Sub G1 hücrelerinin oranı kontrol ile kıyaslandığında ise artış görülmüştür (Şekil 3.10).

Özetle Celastrol kanser, kardiyovaskular ve nörodejeneratif hastalıklarda terapötik açıdan önem arz etmektedir. Celastrol'un bu çalışma içerisinde hücre ölümünü teşvik ettiği ve lipogenezde etkili olduğu HeLa servikal kanser hücre hatlarında belirlendi. Bu çalışmadan sonra daha ileri moleküler analizler uygulanarak kanser hücreleri içindeki spesifik hedeflerin belirlenmesine gereklilik bulunmaktadır.



## 5. KAYNAKLAR

- Abu Bakar, M. H., Cheng, K. K.; Sarmidi, M. R., Yaakob, H. & Huri, H. Z. (2015). Celastrol Protects against Antimycin A Induced Insulin Resistance in Human Skeletal Muscle Cells. *Molecules*, 20 (5): 8242–8269.
- Agnantis, N.J., Bai, M. (2002). Learn more about Protein P27 Molecular Genetics; Lung and Breast Carcinomas. *Handbook of Immunohistochemistry and in Situ Hybridization of Human Carcinomas*.  
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/protein-p27>
- Asimakopoulou, A., Vucur, M., Luedde, T., Schneiders, S., Kalampoka, S., Weiss, T.S., & Weiskirchen, R., (2019). Perilipin 5 and Lipocalin 2 Expression in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* 11(3),385.
- Abu Bakar, M. H., Cheng, K. K.; Sarmidi, M. R., Yaakob, H. & Huri, H. Z. (2015). Celastrol Protects against Antimycin A Induced Insulin Resistance in Human Skeletal Muscle Cells. *Molecules*, 20 (5): 8242–8269.
- Ahmedin, J., Freddie, B., M., C. M., Jacques, F., Elizabeth, W., & David, F. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. volume 61, issue 2,69-90,3869.
- Allison, A. C., Cacabelos, R., Lombardi, V. R. M., Álvarez, X. A., & Vigo, C. (2001). Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 25(7):1341-57.
- Amber, E.G, Roy, S., Brown, J.S., Pienta, K.J., Amend, S.R. (2017) Revisiting Seed and Soil: Examining the Primary Tumor and Cancer Cell Foraging in Metastasis. *Mol. Cancer Res.*, 15(4): 361–70. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0436

- Arcangeli, A., Crociani, O., Lastraioli, E., Masi, A., Pillozzi, S., & Becchetti, A. (2009). Targeting Ion Channels in Cancer: A Novel Frontier in Antineoplastic Therapy. *Current Medicinal chemistry*. 16(1):66-93.
- Bahrami, A., Hasanzadeh, M., Shahidsales, S., Farazestanian, M., Hassanian, S., M., Moetamani Ahmadi, M., ... Avan, A. (2018). Genetic susceptibility in Cervical cancer: From bench to bedside. *Journal of Cellular Physiology*. 233(3):1929-1939.
- Bai, J. P., Shi, Y. L., Fang, X., & Shi, Q. X. (2003). Effects of demethylzeylasteral and celastrol on spermatogenic cell Ca<sup>2+</sup> channels and progesterone-induced sperm acrosome reaction. *European Journal of Pharmacology*. 464(1):9-15.
- Bakar, M. H. A., Cheng, K. K., Sarmidi, M. R., Yaakob, H., & Huri, H. Z. (2015). Celastrol protects against antimycin A-induced insulin resistance in human skeletal muscle cells. *Molecules*. 7;20(5):8242-69
- Baud, V., & Karin, M. (2009). Is NF- $\kappa$ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature Reviews Drug Discovery*. 8(1): 33-40. <https://doi.org/10.1038/nrd2781>
- Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D. N., & Sankaranarayanan, R. (2018). Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 143 Suppl. 2:22-36. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12611>
- Bogani, G., Leone Roberti Maggiore, U., Signorelli, M., Martinelli, F., Ditto, A., Sabatucci, I., Raspagliesi, F. (2018). The role of human papillomavirus vaccines in cervical cancer: Prevention and treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 122:9297.
- Boiteux, G., Lascombe, I., Roche, E., Plissonnier, M. L., Clairotte, A., Bittard, H., & Fauconnet, S. (2009). A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells. *International Journal of Cancer*. 124(8):1820-8.



- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 68(6):394-424.
- Calixto, J. B., Campos, M. M., Otuki, M. F., & Santos, A. R. S. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*. <https://doi.org/10.1055/s-2004-815483>
- Cascão, R., Carvalho, T., Goncalves, J., Moita, L., & Fonseca, J. (2017). AB0096 Efficacy and safety of oral administration of pure celastrol in aia rats. *BMJ journal*. 2868.
- Cascao, R., Fonseca, J.E., Moita, L.F., (2017) Celastrol: A Spectrum of Treatment Opportunities in Chronic Diseases. *Frontiers in Medicine*, 4: 1-18.
- Chang, F. R., Hayashi, K., Chen, I. H., Liaw, C. C., Bastow, K. F., Nakanishi, Y., Nozaki, H., Cragg, G. M., Wu, Y. C., & Lee, K. H. (2003). Antitumor agents. 228. five new agarofurans, Reissantins A-E, and cytotoxic principles from *Reissantia buchananii*. *J. Nat. Prod.* 66(11): 1416–1420.
- Choi, B. S., Kim, H., Lee, H. J., Sapkota, K., Park, S. E., Kim, S., & Kim, S. J. (2014). Celastrol from “Thunder God Vine” Protects SH-SY5Y cells through the preservation of mitochondrial function and inhibition of p38 mapk in a rotenone model of parkinson’s disease. *Neurochemical Research*. 39(1): 84-96.
- Choi, S.K., Park, S., Jang, S., Cho, H.H., Lee, S., You, S., Kim, S.H., Moon, H.S. (2016) Cascade regulation of PPAR $\gamma$  2 and C/EBP $\alpha$  signaling pathways by celastrol impairs adipocyte differentiation and stimulates lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism*, 65: 646-654.
- Chu, I. M., Hengst, J., Slingerlan J.M., (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 8: 253–267

- Cleren, C., Calingasan, N. Y., Chen, J., & Beal, M. F. (2005). Celastrol protects against MPTP- and 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*. 94(4):995-1004. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03253.x>
- Czerniak, B., & Olszewska-Słonina, D. (2018). Biomarkers could facilitate prediction of worse clinical outcome of cancer with special insight to cervical cancer. *Wspolczesna Onkologia*. 2018;22(1):1-7.
- Deng, J. Z., Starck, S. R., and Hecht, S. M. (2000). Pentacyclic triterpenoids from *Freziera sp.* that inhibit DNA polymerase  $\beta$ . *Bioorg. Med. Chem.* 8,247–250.
- Eraslan, M., Toker, e., (2009). Mechanisms of corneal wound healing and its modulation following refractive surgery. *Marmara Medical Journal*. 22(2): 169-178. <http://hdl.handle.net/11424/2190>
- Gökçe, Ö., Yılmaz, A., Gürbüz, V., konaç, E., (2011). İnsan Servikal Kanser Hela Hücrelerinde Vinorelbin'in Apoptotik Etkisi. *Research Gate*. 24 (2):100-105.
- Groot de, A. E., Roy, S., Brown, J. S., Pienta, K. J., & Amend, S. R. (2017). Revisiting Seed and Soil: Examining the Primary Tumor and Cancer Cell Foraging in Metastasis. *Molecular Cancer Research*. 15(4):361-370.
- Erlanson, M., Portin, C., Linderholm, B., Lindh, J., Roos, G., and Landberg, G., (1998). Expression of Cyclin E and The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27 in Malignant Lymphomas Prognostic Implications. *American society of hematology (ASH), Blood* 92:770-777.
- Farmer, S. R., (2008). Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes and Development*. 15; 22(10): 1269–1275.
- Feng, L., Zhang, D., Fan, C., Ma, C., Yang, W., Meng, Y., & Guo, D. (2013). ER stress-mediated apoptosis induced by celastrol in cancer cells and important role of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the signal network. *Cell Death and Disease*. 11;4:e715.

- Firestein, G. S., (1996). Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis and Rheumatism*. 39(11):1781-90.
- Fleury, C., Mignotte, B., & Vayssière, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*. 84(2-3):131-41.
- Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M. S., Adlercreutz, H., Montesano, R., Nawroth, P. P., & Schweigerer, L., (1994). The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature*. 368(6468):237-9.
- Fribley, A. M., Miller, J. R., Brownell, A. L., Garshott, D. M., Zeng, Q., Reist, T. E., & Kaufman, R.J. (2015). Celastrol induces unfolded protein response-dependent cell death in head and neck cancer. *Experimental Cell Research*. 15;330(2):412-22.
- Grant, C. W., Moran-Paul, C. M., Duclos, S. K., Guberski, D. L., Arreaza-Rubín, G., & Spain, L. M. (2013). Testing Agents for Prevention or Reversal of Type 1 Diabetes in Rodents. *PLoS ONE*. 8(8):e72989.
- Groves, I.J., & Coleman, N. (2015). Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *Journal of Pathology*. 235: 527-667.
- Guo, J., Huang, X., Wang, H., & Yang, H., (2015). Celastrol induces autophagy by targeting AR/miR-101 in prostate cancer cells. *PLoS ONE*. 10(10): e0140745.
- He, D., Xu, Q., Yan, M., Zhang, P., Zhou, X., Zhang, Z., Chen, W., (2009). The NF-kappa B inhibitor, celastrol, could enhance the anti-cancer effect of gambogic acid on oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 9:343.
- Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM., (1996). Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*. Vol. 274, Issue 5291, 274(5291)1377-9.

- Huang, Y., Zhou, Y., Fan, Y., & Zhou, D. (2008). Celastrol inhibits the growth of human glioma xenografts in nude mice through suppressing VEGFR expression. *Cancer Letters*. 264(1):101-106.
- Iritani, N., Nagashima, K., Fukuda, H., Katsurada, A., & Tanaka, T., (1986). Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *Journal of Nutrition*. 190–197.
- Islam, K. N., Kayanoki, Y., Kaneto, H., Suzuki, K., Asahi, M., Fujii, J., & Taniguchi, N., (1997). TGF- $\beta$ 1 triggers oxidative modifications and enhances apoptosis in hit cells through accumulation of reactive oxygen species by suppression of catalase and glutathione peroxidase. *Free Radical Biology and Medicine*. 22(6): 1007-17.
- Cox, J.T., (2006). The development of cervical cancer and its precursors: What is the role of human papillomavirus infection? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 18 Suppl 1:s5-s13.
- Jung, H. W., Chung, Y. S., Kim, Y. S., & Park, Y.K. (2007). Celastrol inhibits production of nitric oxide and proinflammatory cytokines through MAPK signal transduction and NF- $\kappa$ B in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 39: 715–721.
- Kannaiyan, R., Manu, K. A., Chen, L., Li, F., Rajendran, P., Subramaniam, A., Sethi, G. (2011). Celastrol inhibits tumor cell proliferation and promotes apoptosis through the activation of c-Jun N-terminal kinase and suppression of PI3 K/Akt signaling pathways. *Apoptosis*. 16:1028
- Katsurada, A., Iritani, N., Fukuda, H., Noguchi, T. & Tanaka, T. (1986). Effects of dietary nutrients on lipogenic enzyme and mRNA activities in rat liver during induction. *Biochim. Biophys. Acta* 877, 350-358.
- Keyomarsi, K., O’Leary, N., Molnar, G., Lees, E., Fingert, H. J., & Pardee, A.B., (1994) Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res*. 54:380-385.

- Kim, J. H., Lee, J. O., Lee, S. K., Kim, N., You, G. Y., Moon, J. W. & Kim, H. S. (2013). Celastrol suppresses breast cancer MCF-7 cell viability via the AMP-activated protein kinase (AMPK)-induced p53-polo like kinase 2 (PLK-2) pathway. *Cellular Signalling*. 25(4):805-13.
- Kim, J. E., Lee, M. H., Nam, D. H., Song, H. K., Kang, Y. S., Lee, J. E., ... Cha, D. R. (2013). Celastrol, an NF- $\kappa$ B Inhibitor, Improves Insulin Resistance and Attenuates Renal Injury in db/db Mice. *PLoS ONE*. 26;8(4):e62068.
- Kim, M. J., Kim, Y. J., Park, H. J., Chung, J. H., Leem, K. H., & Kim, H. K. (2006). Apoptotic effect of red wine polyphenols on human colon cancer SNU-C4 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 44(6):898-902.
- Knudson A.G., (2002). Cancer Genetics *American journal of Medical Genetics*,11: 96–102.
- Konieczny, J., Jantas, D., Lenda, T., Domin, H., Czarnecka, A., Kuter, K., & Lorenc-Koci, E. (2014). Lack of neuroprotective effect of celastrol under conditions of proteasome inhibition by lactacystin in in vitro and in vivo studies: Implications for Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*. 26(3):255-73.
- Lau, A., Gray, E. E., Brunette, R. L., & Stetson, D. B. (2015). DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. *Science*.
- Lee, H. W., Jang, K. S. Bin, Choi, H. J., Jo, A., Cheong, J. H., & Chun, K. H., (2014). Celastrol inhibits gastric cancer growth by induction of apoptosis and autophagy. *BMB Reports*. 47(12):697-702.
- Li, G.Q., Zhang, Y., Liu, D., Qian, Y. Y., Zhang, H., Guo, S. Y. & Liu, Y. Q., (2012). Celastrol inhibits interleukin-17A-stimulated rheumatoid fibroblast-like synoviocyte migration and invasion through suppression of NF- $\kappa$ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression. *International Immunopharmacology*. 14(4):422-31.

- Li, X., Li, Y., Yang, W., Xiao, C., Fu, S., Deng, Q., Li, X. (2014). SREBP-1c overexpression induces triglycerides accumulation through increasing lipid synthesis and decreasing lipid oxidation and VLDL assembly in bovine hepatocytes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 143:174-82.
- Lu, C., Yu, X., Zuo, K., Zhang, X., Cao, C., Xu, J., Li, M. (2015). Tripterine treatment improves endothelial progenitor cell function via integrin-linked kinase. *Cellular Physiology and Biochemistry, International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 37(3):1089-103.
- Kiaei, M., Kipiani, K., Petri, S., Chen, J., Calingasan, N.Y., Beal, M.F., (2005). Celastrol blocks neuronal cell death and extends life in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Diseases*. 2:246–254.
- Ma, J., Han, L. Z., Liang, H., Mi, C., Shi, H., Lee, J. J., & Jin, X. (2014). Celastrol inhibits the HIF-1 $\alpha$  pathway by inhibition of mTOR/p70S6K/eIF4E and ERK1/2 phosphorylation in human hepatoma cells. *Oncology Reports*. 1;32(1):235-42.
- Ma, X., Xu, L., Alberobello, A. T., Gavrilova, O., Bagattin, A., Skarulis, M., Mueller, E., (2015). Celastrol protects against obesity and metabolic dysfunction through activation of a HSF1-PGC1 $\alpha$  transcriptional axis. *Cell Metabolism*. 6;22(4):695-708.
- Marshall, C., Rajdev, M. A., Somarouthu, B., Ramaiya, N. H., & Alessandrino, F., (2018). Overview of systemic treatment in recurrent and advanced cervical cancer: a primer for radiologists. *Abdominal Radiology*. 44(4):1506-1519.
- Mi, C., Shi, H., Ma, J., Han, L. Z., Lee, J. J., & Jin, X., (2014). Celastrol induces the apoptosis of breast cancer cells and inhibits their invasion via downregulation of MMP-9. *Oncology Reports*. 32(6):2527-32.

- Mou, H., Zheng, Y., Zhao, P., Bao, H., Fang, W., & Xu, N. (2011). Celastrol induces apoptosis in non-small-cell lung cancer A549 cells through activation of mitochondria- and Fas/FasL-mediated pathways. *Toxicology in Vitro*. 25(5):1027-32.
- Muchowski, P. J., & Wacker, J. L. (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature Reviews Neuroscience*. 6(1):11-22.
- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Huh, K., (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of Virology*. 78(21):11451-60.
- Nagase, M., Oto, J., Sugiyama, S., Yube, K., Takaiishi, Y., & Sakato, N. (2003). Apoptosis Induction in HL-60 Cells and Inhibition of Topoisomerase II by Triterpene Celastrol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67(9):1883-7.
- Oyervides-Muñoz, M. A., Pérez-Maya, A. A., Rodríguez-Gutiérrez, H. F., Gómez-Macias, G. S., Fajardo-Ramírez, O. R., Treviño, V., Garza-Rodríguez, M. L. (2018). Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infection, Genetics and Evolution*. 61:134-144.
- Pan, J. S., Hong, M. Z., & Ren, J. L. (2009). Reactive oxygen species: A double-edged sword in oncogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 14;15(14):1702-7.
- Pappa, K. I., Kontostathi, G., Lygirou, V., Zoidakis, J., & Anagnou, N. P. (2018). Novel structural approaches concerning HPV proteins: Insight into targeted therapies for cervical cancer. *Oncology Reports*. 39(4):1547-1554.
- Patel, Y. M., and Lane, M. D. (1999) Role of calpain in adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 1279 –1284. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (4) 1279-1284.
- Pectasides, D., Kamposioras, K., Papaxoinis, G., & Pectasides, E. (2008). Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 34(7):603-13.

- Peng, B., Xu, L., Cao, F., Wei, T., Yang, C., Uzan, G., & Zhang, D. (2010). HSP90 inhibitor, celastrol, arrests human monocytic leukemia cell U937 at G0/G1 in thiol-containing agents reversible way. *Molecular Cancer*.16;9:79.
- Qi, X., Qin, J., Ma, N., Chou, X., & Wu, Z. (2014). Solid self-microemulsifying dispersible tablets of celastrol: Formulation development, characterization and bioavailability evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 10:472:40-7.
- Rahman, A., Arshad, H., (2015). Anticancer activity and apoptosis inducing effect of methanolic extract of *Cordia dichotoma* against human cancer cell line. *Bangladesh J Pharmacol*. 226026 India. 27-34.
- Raja, S. M., Clubb, R. J., Ortega-Cava, C., Williams, S. H., Bailey, T. A., Duan, L., Band, H. (2011). Anticancer activity of Celastrol in combination with ErbB2-targeted therapeutics for treatment of ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Biology and Therapy*. 15;11(2):263-76.
- Rajendran, P., Li, F., Shanmugam, M. K., Kannaiyan, R., Goh, J. N., Wong, K. F., Sethi, G. (2012). Celastrol suppresses growth and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma through the modulation of STAT3/JAK2 signaling cascade *In Vitro and In Vivo*. *Cancer Prevention Research*. 5(4):631-43.
- Rao, J. S., (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: The role of proteases. *Nature Reviews Cancer*. 489–501.
- Rita Cascão TC, Goncalves J, Moita L, Fonseca J. (2017). Efficacy and Safety of Oral Administration of Pure Celastrol in AIA Rats. Madrid: *EULAR Abstract Book: Annals of Rheumatic Diseases ARD*. Volume 76-Suppl 2.
- Rybak L.P., Ramkumar V., Ototoxicity. (2007). *Kidney Int*. 72(8):931–5.



- Salminen, A., Lehtonen, M., Paimela, T., & Kaarniranta, K. (2010). Celastrol: Molecular targets of Thunder God Vine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 394(3):439-442.
- Sankaranarayanan, R., Swaminathan, R., Brenner, H., Chen, K., Chia, K. S., Chen, J. G., Al-Hamdan, N. (2010). Cancer survival in Africa, Asia, and Central America: a population-based study. *The Lancet Oncology*.165-173.
- Sassa, H., Takaishi, Y. and Terada, H. (1990) The triterpene celastrol as a very potent inhibitor of lipid peroxidation in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*172: 890-897.
- Scheja, L., Makowski, L., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Shimshek, D. R., Meyers, D. S., Hotamisligil, G. S. (1999). Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2(-/-) mice. *Diabetes*. 48(10):1987-94.
- Selkoe, D.J. (2004). Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biology*. **6**: 1054–1061.
- Semenza G.L., (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732.
- Senapati, R., Senapati, N. N., & Dwibedi, B. (2016). Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infectious Agents and Cancer*. 11: 59
- Selimoglu E., Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Curr Pharm Des* (2007) 13(1):119–26.
- Sethi, G., Ahn, K.S., Pandey, M.K., Aqqawal, B.B. (2007). Celastrol, a novel triterpene, potentiates TNF-induced apoptosis and suppresses invasion of tumor cells by inhibiting NF- $\kappa$ B-regulated gene products and TAK1-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Blood*. 109:2727-2735.
- Sha, M., Ye, J., Luan, Z. yun, Guo, T., Wang, B., & Huang, J. xing. (2015). Celastrol induces cell cycle arrest by MicroRNA-21-mTOR-mediated inhibition p27 protein degradation in gastric cancer. *Cancer Cell International*. 15:101.

- Siegel, R. L., Miller, et al. (2018). Cancer Statistics, (2018) *Ca Cancer J Clin.* 68(1):7-30.
- Small, W., Bacon, M. A., Bajaj, A., Chuang, L. T., Fisher, B. J., Harkenrider, M. M., Gaffney, D. K. (2017). Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer.* 1;123(13):2404-2412.
- Sorensen, A., Travers, M. T., Vernon, R. G., Price, N. T., & Barber, M. C. (2003). Localization of messenger RNAs encoding enzymes associated with malonyl-CoA metabolism in mouse brain. *Gene Expression Patterns.* 1(3-4):167-73.
- Suh, N., Roberts, A. B., Birkey Reffey, S., Miyazono, K., Itoh, S., ten Dijke, P., Heiss, E. H., Place, A. E., Risingsong, R., Williams, C. R., Honda, T., Gribble, G. W., Sporn, M. B., (2003). Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor beta/Smad signaling. *Cancer Res.* 63: 1371–1376.
- Sun, Z., Miller, R. A., Patel, R. T., Chen, J., Dhir, R., Wang, H., Lazar, M. A. (2012). Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nature Medicine.*18(6):934-42.
- Sung, B., Park, B., Yadav, V. R., & Aggarwal, B. B. (2010). Celastrol, a triterpene, enhances TRAIL-induced apoptosis through the down-regulation of cell survival proteins and up-regulation of death receptors. *Journal of Biological Chemistry.* 9;285(15):11498-507.
- Sweeney, C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S. E., Hawkins, C. F., Wolgemuth, D. J., & Carrington, M. (1996). A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development (Cambridge, England).*122(1):53-64.
- Takahashi, K. A., Smart, J. L., Liu, H., & Cone, R. D. (2004). The Anorexigenic Fatty Acid Synthase Inhibitor, C75, Is a Nonspecific Neuronal Activator. *Endocrinology.*145(1):184-93.
- Thompson, K. J., Garland, A. R., S, N. S., S, G. K., A, I. D., & H, M. I., (2017). Altered fatty acid-binding protein 4 (FABP4) expression and function in human and animal models of hepatocellular carcinoma. *Liver International.* 38: (6) 961-1141.

- Tong, L., & Moudgil, K. D. (2007). *Celastrus aculeatus* Merr. Suppresses the induction and progression of autoimmune arthritis by modulating immune response to heat-shock protein 65. *Arthritis Research and Therapy*. 9: R70
- Tornero-López, A. M., & Guirado, D. (2018). Radiobiological considerations in combining doses from external beam radiotherapy and brachytherapy for cervical cancer. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*. 23(6):562-573.
- Tian, J., Chen, J.W., Gao, J.S., Li, L., Xie, X. (2013). Resveratrol inhibits TNF- $\alpha$ -induced IL-1 $\beta$ , MMP-3 production in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via modulation of PI3kinase/Akt pathway. *Rheumatol. Int.*, 33: 1829–1835.
- Tucker, S.L., Gharpure, K., Herbrich, S.M., Unruh, A.K., Nick, A.M., Crane, E.K., Coleman, R.L., Guenthoer, J., Dalton, H.J., Wu, S.Y., Rupaimoole, R., Lopez-Berestein, G., Ozpolat, B., Ivan, C., HU, W., Baggerly, K.A., Sood, A.K., (2014). Molecular biomarkers of residual disease after surgical debulking of high-grade serous ovarian cancer. *Clin. Cancer Res*. 20: 3280–3288.
- Uchida, E., Xu, J., & Rozelle, S. (2015). Grain for Green: Cost-Effectiveness and Sustainability of China's Conservation Set-Aside Program. *Land Economics*. 81:247-264.
- Venkatesha, S. H., Yu, H., Rajaiah, R., Tong, L., & Moudgil, K. D. (2011). *Celastrus*-derived celastrol suppresses autoimmune arthritis by modulating antigen-induced cellular and humoral effector responses. *Journal of Biological Chemistry*. 286: (17) 15138–15146.
- Wright, A. A., Howitt, B. E., Myers, A. P., Dahlberg, S. E., Palescandolo, E., Van Hummelen, P., ... Hirsch, M. S. (2013). Oncogenic mutations in cervical cancer: Genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. *Cancer*. 119: 3739-3896.

- Wu, J., Ding, M., Mao, N., Wu, Y., Wang, C., Yuan, J., Shi, Z. (2017). Celastrol inhibits chondrosarcoma proliferation, migration and invasion through suppression CIP2A/c-MYC signaling pathway. *Journal of Pharmacological Sciences*. 134: 122-28.
- Yadav, V. R., Sung, B., Prasad, S., Kannappan, R., Cho, S. G., Liu, M. Aggarwal, B. B. (2010). Celastrol suppresses invasion of colon and pancreatic cancer cells through the downregulation of expression of CXCR4 chemokine receptor. *Journal of Molecular Medicine*. 88: 1243–1253.
- Yang, V.W. in *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fifth Edition)*, (2012) 11-131
- Yoon, M.J., Lee, A.R., Jeong, S. A., Kim, Y.S., Kim, J.Y., Kwon, Y.J., Choi, K.S. (2014). Release of Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and its subsequent influx into mitochondria trigger celastrol-induced paraptosis in cancer cells. *Oncotarget*. 30 5(16): 6816-31.
- Yoon M.J., Lee A.R, Jeong S.A, Kim Y.S, Kim J.Y, Kwon Y.J, et al. (2014) Release of Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and its subsequent influx into mitochondria trigger celastrol-induced paraptosis in cancer cells. *Oncotarget* 5: 6816–31.
- Yu, X., Ruan, X., Zhang, J., & Zhao, Q. (2016). Celastrol induces cell apoptosis and inhibits the expression of the AML1-ETO/C-KIT oncoprotein in t(8;21) leukemia. *Molecules*. 21(5), 574.
- Yu, X., Zhou, X., Fu, C., Wang, Q., Nie, T., Zou, F., ... Dai, M. (2015). Celastrol induces apoptosis of human osteosarcoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Oncology Reports*, 1129-1136
- Zhang, L., Lv, R., Qu, X., Chen, X., Lu, H., & Wang, Y. (2017). Aloesin Suppresses Cell Growth and Metastasis in Ovarian Cancer SKOV3 Cells through the Inhibition of the MAPK Signaling Pathway. *Analytical Cellular Pathology*. 8158254, 9.

- Zhang, T., Hamza, A., Cao, X., Wang, B., Yu, S., Zhan, C.-G., & Sun, D. (2008). A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 162-170.
- Zhang, W., Chen, M., Cheng, H., Shen, Q., Wang, Y., & Zhu, X. (2018). The role of calgranulin B Gene on the biological behavior of squamous cervical cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Management and Research*. 2018: 323-338.
- Zhao, Y., Zhao, H., Lobo, N., Guo, X., Gentleman, S. M., & Ma, D. (2014). Celastrol enhances cell viability and inhibits amyloid- $\beta$  production induced by lipopolysaccharide *in vitro*. *Journal of Alzheimer's Disease*. 41(3):835-44.
- Zhu, F., Li, C., Jin, X. P., Weng, S. X., Fan, L. L., Zheng, Z., Liu, P. (2014). Celastrol may have an anti-atherosclerosis effect in a rabbit experimental carotid atherosclerosis model. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. Int J Clin Exp Med. 7(7):1684-1691.

## 6. EKLER

### 6.1.KULLANILAN CİHAZLAR

Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler kullanılan cihazlar Tablo 6.1 de gösterilmektedir.

**Tablo 6.1** Kullanılan cihazlar.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
ChemiDoc Görüntüleme Cihazı	1708280	Bio-Rad
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Fluoresan Mikroskopu	Model: 1X71	Olympus
Sentrifüj	5810R	Eppendorf
Mini spin	SN0708	LabNet
Dikey akışlı güvenlik kabini	Model: 12469,2000	HeraSafe
Distile Su Cihazı	12469,2000 D56412	TKA-Pacific
Dondurucu (-80oC)	Ultra Low	New Brunswick
DynaMag-2 Magnet	Temperature 12321D	Scientific Life Technologies
Elektroporatör	Micropulser	BioRad
Fluoresan ataçmanlı invert mikroskop	Model: 1X71	Olympus
Fluorometre	Fluoroskan	Thermo Labsystems
Güç Kaynağı	Ascent PowerPac/Basic	BioRad
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (2µl-20µl)	CJ17240	Thermo Scientific
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo Scientific
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo Scientific
Mikroplaka okuyucu,	680	Bio-Rad
Otoklav	OTO32	Nüve
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6
Elektroforez aparatları	1658004	BioRad

PVDF Membran	88518	Thermo aientific
Sıvı azot tankı	Arpege 40	Air Liquide
Hemositometre	-	Neubar
Spektrofotometrede	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
İnkübatör	Heracell	Thermo
Laminar Flow	12469,2000	Herasafe
Buzdolabı	4263 TMB	Arçelik

## 6.2.HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI

Tez çalışması kapsamında hücre doku kültüründe kullanılan malzemeler Tablo 6.2 de gösterilmektedir.

**Tablo 6.2.** Hücre kültürü donanımları.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
60 mm petri	93060	TPP
T75 (75 cm <sup>2</sup> 'lik kültür flask)	90076	TPP
T25 (25 cm <sup>2</sup> 'lik kültür flask)	90026	TPP
96 Kuyucuklu Petri	92096	TPP
Fetal Bovin Serum	10500-064	Gibco
DMEM besiyeri	41966-029	Gibco
100 mm petri	93100	TPP
Steril pipet (10ml)	94010	TPP
Steril pipet (5ml)	94005	TPP
Etüv	Heracell 1150	Thermp
Hemositometre	-	Neubauer
Pipet Uçlar	-	CAPP
Laminar flow	12469.2	Thermo
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco

### 6.3.KULLANILAN KİMYASALLAR

Tez kapsamında kullanılan kimyasallar Tablo 6.3 de gösterilmiştir.

**Tablo 6.3.** Kullanılan kimyasal maddeler.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Celastrol	3203/10	Tocris biotechne
PBS (Phosphate Buffer Saline)	BE17-51-5F	LONZA
DMSO	K46505343517	Merck
H2O2 Hidrojen Peroksi	K39218400838	Merck
Fetal Bovin Serum	10500-064	Gibco
İzopropanol	K44518295321	Merck
Luminol	A2185	Applichem
Metanol	24229	Sigma-Aldrich
MTT	M2128-5G	Sigma-Aldrich
Page ruler Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
TEMED	A1148,0100	Applichem
Tris-baz	648310	Calbiochem
Tris-HCL	648317	Caliochem
Yağsız süt tozu	SC-2325	Snta Cruz Biotechnology
Tween 20	S6740684348	Merck
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Kristal viyole	FN1048735	Merck
Agaroz	A9539	Sigma-Aldrich
DİOC6 Boya	2129966	Flıka
DCFH-DA Boya	C6827	İnvitrogen
Coomassie brillant	A3480	Applichem
SDS (Sodum Dedosil Sülfat)	UN1888	Applichem
Laemmli	S3401-1V	Sigma
Oil-Red-O	O1391	Sigma



EtOH	CAS 64-17-5	AlkoMed
PI Boya	P4170-100 MG	Sigma-Aldrich
Kloroform	UN1888	Applichem

#### 6.4.KULLANILAN PRİMERLER

**Tablo 6.4.** çalışma kapsamında kullanılan antikor ve primerler

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
B-actin (Rabbit))	4970	CST
Cyclin E2(Rabbit)	4132	CST
Cyclin A1 (Mouse)	4656	CST
Cdk2 (Rabbit)	2546	CST
Cdk4 (Rabbi)	12790	CST
Cdk6 (Mouse)	3136	CST
P27 (Rabbit)	2552	CST
Acetyl-Coa (Rabbit)	8178	CST
Perilipin (Rabbit)	9349	CST
C/EBPa (Rabbit)	8178	CST
FABP4 (Rabbit)	3544	CST

Tablo 6.5. SDS page %12 jel içerikler (2 jel için)

Alt jel(seprating gel)

Su	3,4
1,5M Tris-Hcl, ph 8,8	2,5
%10 SDS	0,1
Acrylamide/bisacry (30%, 0,8% w/v)	4
%10 (w/v) Ammonium persulphate (APS)	80
TEMED	10

Üst jel (stacking gel)

Su	3,075
0,5M Tris-Hcl, ph 6,8	1,25
%10 SDS	0,05
Acrylamide/bisacry (30%, 0,8% w/v)	0,67
%10 (w/v) Ammonium persulphate (APS)	0,025
TEMED	0,005

## ÖZGEÇMİŞ

FARENGİZ GHODRATI

### KİŞİSEL BİLGİLER

Cinsiyet	:	Kadın
Uyruğu	:	İran
T.C. Kimlik No	.	99151264164
Doğum Yeri	:	Erdebil
Doğum Tarihi	:	20.071985

### İLETİŞİM BİLGİLERİ

Adres: Bahçeşehir 2. Kısım Mah. Okyanus Cad Pasifik Sok Funda Evler D13, D 70

Başakşehir-İstanbul

Cep Tel: 0538 989 07 85

E posta: [ghodrati.farangiz01@gmail.com](mailto:ghodrati.farangiz01@gmail.com)

### EĞİTİM BİLGİLERİ

2006-2008	DANESHGHAHE ULUM PEZESHKİ ERDEBİL ÜNİVERSİTESİ-İRAN Laboratuvar Bilimleri- Ön Lisans
2008-2009	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ Türkçe Dil Eğitimi-TOMER
2009-2010	FATİH ÜNİVERSİTESİ İngilizce Hazırlık
2011-2015	FATİH ÜNİVERSİTESİ Genetics and Bioengineering Department
2015-2017	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İşletme Fakültesi Inovation and Enterprenurship Department
2016-2019	İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ YÜKSEK LİSANS