T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROBLASTOM VE ASTROSİT HÜCRE HATLARINDA NARİNGİN İLE FARKLI KEMOTERAPİ AJANLARI ARASINDAKİ ETKİLEŞİMİN BELİRLENMESİ

NEBİYE PELİN TÜRKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

Edirne- 2017

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Figen ERTAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Zeynep Banu Doğanlar
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile Kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Abdullah OLGUN

Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

Yrd. Doç. Dr. Süleyman KÖK

24/03/2017

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

24/03/2017

Nebiye Pelin TÜRKER

Yüksek Lisans Tezi

Nöroblastom ve Astrosit hücre hatlarında naringin ile farklı kemoterapi ajanları arasındaki etkileşimin belirlenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Nöroblastom beş yaşın altındaki çocuklarda görülen bir kanser türüdür. Kemoterapi (doksorubisin, sisplatin ve etoposid), cerrahi, radyasyon ve kök hücre transplantasyonuna ek olarak tedavi için kullanılır. Kemoterapötik ajanların yan etkileri nedeniyle, sağlıklı hücrelerin korunması için bazı bitki türevli bileşenler kullanılmaktadır. Naringin turunçgillerde bulunan ve antioksidan, apoptotik, antiinflamatuar özelliklere sahip bir flavonoiddir.

Bu çalışmada, naringin ve kemoterapi ajanlarının (doksorubisin ve sisplatin) nöroblastom ve astrosit hücre serilerinde tek ve kombine etkilerinin belirlenmesini amaçladık. Bu amaçla, kombinasyonların sıralı ve aynı anda uygulamalarının apoptotik etkileri görüntü tabanlı sitometre ve apoptoz yolağının gen ekspresyonu ile analiz edilmiştir.

Çalışma sonuçlarına göre naringin, nöroblastom hücrelerinde p53, Bax, Cyc-c ve kaspaz-3'ü indükleyerek intrinsik apoptoz yolağını tetiklemiştir. Buna ilaveten, naringinin kemoterapi ajanı ile önce veya sonra uygulanması farklı apoptotik etkilere neden olmuştur.

Sonuç olarak, naringinin sisplatinden önce ve doksorubisinden sonra uygulanması nöroblastom hücrelerinde daha fazla apoptozise neden olmuştur. Ayrıca, naringinin ön-uygulaması astrosit hücre serilerinde sisplatin toksisitesine karşı koruyucu etki göstermiştir.

Yıl: 2017

Sayfa Sayısı: 133

Anahtar Kelimeler: Nöroblastom, Astrosit Hücre Döngüsü, Apoptoz

Master's Thesis
The determination of interaction between naringin and different chemotherapy agents in neuroblastoma and astrocyte cell lines
Trakya University Institute of Natural Sciences
Depermant of Biotechnology and Genetic

ABSTRACT

Neuroblastoma is a cancer type seen in children under five years old. Chemotherapy (doxorubicin, cisplatin and etoposide) use for the treatment in addition to surgery, radiation and stem cell transplantation. Because of the side effects of chemotherapeutic agents, some plant-derived components are used for protecting healthy cells. Naringin is a citrus flavonoid have antioxidant, apoptotic, antiinflamatuar properties.

In this study, we aimed that the determination of single and combine effects of naringin and chemotherapy agents (doxorubicin and cisplatin) in neuroblastoma and astrocyte cell lines. With this aim, the effects of the combinations following exposure to the sequentially and simultaneously on apoptosis analyzed by image-based cytometer and gene expressions of apoptosis pathway.

According to results of the study, naringin induced intrinsic apoptosis pathway as evidenced by the induction of p53, Bax, Cyt-c and caspase-3 in neuroblastoma cells. In addition, pre- or post treatment of naringin with chemotherapy agent caused different apoptotic effects.

In conclusion, naringin treatment before cisplatin and after doxorubicin caused more apoptosis in neuroblastoma cells. Furthermore pretreatment of naringin showed protective effect against cisplatin toxicity in astrocyte cell lines.

Year: 2017
Number of page: 133
Keywords: Neuroblastoma, Astrocyte, Cell Cycle, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim yüksek lisans eğitimim süresince bana emek veren ve beni yönlendiren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR (Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı) başta olmak üzere tez çalışmamda çok değerli katkıları olan hocam Sayın Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a (Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı),

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı doktora öğrencisi Uzman Biyolog Güldan VAPUR'a,

Tez çalışmamın projeye dönüşmesine destek veren Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje numarası: TUBAP 2016-231)'ne ve

Benden maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bugünlere gelmeme vesile olan annem Emine TÜRKER'e, babam Halil İbrahim TÜRKER'e, kardeşlerim Emre TÜRKER ve Tolga TÜRKER'e teşekkür ederim.

Nebiye Pelin TÜRKER

Edirne, Mart 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xi
Simgeler xi
Kısaltmalar xii
ŞEKİLLER xiv
TABLOLAR xx
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 3
KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. Kanser 3
2.2. Beyin Kanserleri ve Nöroblastom 5
2.2.1. Astrosit Hücreleri ve Yapıları 9
2.3. Nöroblastom Tedavisi ve Kemoterapi 10
2.4. Naringin 11
2.5. Doksorubisin ve Sisplatin 12
2.6. Apoptoz 13
2.6.1. Apoptoz Sinyal Yolakları 14
2.6.2. Apoptoz ve Kanser 16
BÖLÜM 3 19

MATERYAL VE METOD 19
3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları 19
3.2. Hücrelerin Kültüre Alınması, Pasajlanması ve Dondurulması 20
3.3. MTT (*3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5* diphenyl tetrazolium bromid) Yöntemi ile Hücre Hatlarına Uygulanacak Madde Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 21
3.4. TALİ Görüntü Tabanlı Sitometre ile Apoptoz Tayini 26
3.5. RNA İzolasyonu 27
3.6. Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit (cDNA) Sentezi 28
3.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) 29
3.8. Verilerin İstatistiksel Olarak Analizi 32
BÖLÜM 4 33
SONUÇLAR 33
4.1. Tek Olarak Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatinin Maddelerinin IC_{50} Değerleri 33
4.1.1. Naringin 33
4.1.2. Doksorubisin 37
4.1.3. Sisplatin 41
4.2. Kombine Halde Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatin Maddelerinin IC_{50} değerleri 45
4.2.1. Önce Naringin Ardından Doksorubisin 45
4.2.2. Önce Naringin Ardından Sisplatin 47
4.2.3. Önce Sisplatin Ardından Naringin 49
4.2.4. Önce Doksorubisin Ardından Naringin 51
4.2.5. Aynı Anda Sisplatin-Naringin 53
4.2.6. Aynı Anda Doksorubisin-Naringin 55
4.2.7. Aynı Anda Naringin-Doksorubisin-Sisplatin 57
4.3. TALİ Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi 59

4.3.1. Nöroblastom ve Astrosit Hücre Hatlarında Tek Olarak Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 60

4.3.2. Nöroblastom ve Astrosit Hücre Hatlarında Kombine Olarak Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 66

4.4. Tek Olarak Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatinin Gen İfadeleri Üzerine Etkisi 78

4.4.1. P53 Gen İfadesi 78

4.4.2. Sitokrom-c Gen İfadesi 80

4.4.3. Kaspaz-3 Gen İfadesi 81

4.4.4. Kaspaz-9 Gen İfadesi 82

4.4.5. Bax Gen İfadesi 83

4.4.6. Bcl-2 Gen İfadesi 84

4.4.7. Tümör Nekroz Faktör Alfa Gen İfadesi 85

4.4.8. $p21^{cip1}$ Gen İfadesi 86

4.4.9. $p27^{kip1}$ Gen İfadesi 87

4.5. Kombine Halde Uygulanan Naringin, Doksorubisin Ve Sisplatinin Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi 88

4.5.1. p53 Gen İfadesi 88

4.5.2. Sitokrom-c Gen İfadesi 90

4.5.3. Kaspaz-3 Gen İfadesi 92

4.5.4. Kaspaz-9 Gen İfadesi 93

4.5.5. Bax Gen İfadesi 94

4.5.6. Bcl-2 Gen İfadesi 96

4.5.7. Tümör Nekroz Faktör Gen İfadesi 97

4.5.8. $p21^{cip1}$ Gen İfadesi 99

4.5.9. $p27^{kip1}$ Gen İfadesi 100

BÖLÜM 5 102

TARTIŞMA 102
KAYNAKÇA 113
ÖZGEÇMİŞ 131
BİLİMSEL FAALİYETLER 132

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µM	: Mikro Molar
%	: Yüzde
µL	: Mikro Litre
°C	: Santigrat derece
CO_2	: Karbondioksit
dH_2O	: Saf su
Ca^{+2}	: Kalsiyum
KDa	: Kilo Dalton
mL	: Mili Litre
G	: Relatif Santrifüj Kuvveti
nm	: Nanometre

Kısaltmalar

dNTP	: Deoksinükleotitfosfat
RT	: Reverse Transkripsiyon
mRNA	: Mesajcı RNA
Cyc-c	: Sitokrom- c
PI	: Propodium İyodür
PS	: Fosfatidilserin
N1E-115	: Nöroblastom hücre hattı
C8-D1A	: Astrosit hücre hattı
IC_{50}	: Yüzde 50 canlılık oranı
EMEM	: Eagle's Minimum Essential Medium
DMEM	: DMEM–Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	: Fetal Bovine Serum
qRT-PCR	: Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Apoptoz	: Programlı Hücre Ölümü
cDNA	: Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
MYCN	: Miyelotasosis
p	: Kromozomun Kısa Kolu
q	: Kromozomun Uzun Kolu
UV	: Ultraviyole
NGF	: Sinir Büyüme Faktör
BDNF	: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
NT-3	: Nörotrofin-3
Trk	: Tirozin Kinaz
S100	: Kalsiyum Bağlayıcı Protein
PCD	: Programlı Hücre Ölümü
AIF	: Apoptoz İndüksiyon Faktör
C.elegans	: *Caenorhabditis elegans*
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa

TLR	: Toll Benzeri Reseptör
FADD	: Fas İlişkili Ölüm Alanı
ER	: Endoplazmik Retikulum
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
ATP	: Adenin Trifosfat
GAPDH	: Endojen Kontrol
MTT	: Metiltiazol Difenil Tetrazolyum

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.1. Karsinogenez ve Basamakları. 4
Şekil 2.2.1. Bir Nöronun Yapısı. 6
Şekil 2.2.2. Metastaz Yapmış Nöroblastom Tümörü. 7
Şekil 2.2.3. MYCN Onkogeni. 8
Şekil 2.2.4. Nörotrofin Reseptörleri. 9
Şekil 2.2.1.1. Astrositlerin Yapıları 10
Şekil 2.4.1. Naringin'in Kimyasal Yapısı 12
Şekil 2.5.1. Doksorubisin'in Yapısı. 12
Şekil 2.5.1. Sisplatin'in Yapısı 13
Şekil 2.6.1. Apoptoz Proteinleri. 14
Şekil 3.1.1. Nöroblastom Hücre Hattının Mikroskobik Görüntüsü 19
Şekil 3.2.2. Astrosit hücre hattının mikroskobik görüntüsü 20
Şekil 3.3.1. MTT' nin Formazana Dönüşümü 22
Şekil 3.4. Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Cihazı 27
Şekil 4.1. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 24 Saat Süreyle 1.56 µm İle 800 µm Konsantrasyonlarda Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi 34
Şekil 4.2. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 24 Saat Süre İle Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri 35
Şekil 4.3. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 48 Saat Süreyle 1.56 µm İle 800 Konsantrasyonlarda Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi 36
Şekil 4.4. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 48 Saat Süre İle Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri 37
Şekil 4.5. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 24 Saat Süreyle 0.39 µm İle 200 µm Konsantrasyonlarda Doksorubisin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. 38
Şekil 4.6. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 24 Saat Süre İle Doksorubisin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 39

Şekil 4.7. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 48 Saat Süreyle 0.39 µm İle 200 µm Konsantrasyonlarda Doksorubisin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. 40
Şekil 4.8. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 48 Saat Süre İle Doksorubisin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 41
Şekil 4.9. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 24 Saat Süreyle 0,09 µm İle 50 µm Konsantrasyonlarda Sisplatin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi 42
Şekil 4.10. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 24 Saat Süre İle Sisplatin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 43
Şekil 4.11. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 48 Saat Süre İle 0.09 µm İle 50 µm Konsantrasyonlarda Sisplatin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi 44
Şekil 4.12. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 48 Saat Süre İle Sisplatin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 45
Şekil 4.13. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Önce Naringin Ardından Doksorobisin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. 46
Şekil 4.14. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Önce Naringin Ardından Doksorubisin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 47
Şekil 4.15. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Önce Naringin Ardından Sisplatin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi 48
Şekil 4.16. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Önce Naringin Ardından Sisplatin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 49
Şekil 4.17. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Önce Sisplatin Ardından Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi 50
Şekil 4.18. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Önce Sisplatin Ardından Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 51
Şekil 4.19. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Önce Doksorubisin Ardından Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi 52
Şekil 4.20. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Önce Doksorubisin Ardından

Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 53
Şekil 4.21. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Aynı Anda Sisplatin-Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi 54
Şekil 4.22. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Aynı Anda Sisplatin-Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 55
Şekil 4.23. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Aynı Anda Doksorubisin-Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi 56
Şekil 4.24. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Aynı Anda Doksorubisin-Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 57
Şekil 4.25. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Aynı Anda Naringin-Doksorubisin-Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. 58
Şekil 4.26. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Aynı Anda Naringin-Doksorubisin-Sisplatin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri. 59
Şekil 4.27. N1E-115 Nöroblastom Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. a) Kontrol, b) Naringin Uygulaması, c) Doksorubisin Uygulaması, d) Sisplatin Uygulaması. 60
Şekil 4.28. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) Floresan Yoğunluğu. a) Kontrol, b) Naringin Uygulaması. 61
Şekil 4.29. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) Floresan Yoğunluğu. a) Doksorubisin Uygulaması, b) Sisplatin Uygulaması. 62
Şekil 4.30. C8-D1A Astrosit Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. a) Kontrol, b) Naringin Uygulaması, c) Doksorubisin Uygulaması, d) Sisplatin Uygulaması. 63
Şekil 4.31. C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan

Yoğunluğu. a) Kontrol, b) Naringin Uygulaması. 64
Şekil 4.32. C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu a) Doksorubisin Uygulaması b) Sisplatin Uygulaması. 65
Şekil 4.33. N1E-115 Nöroblastom Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. a) Önce Naringin Sonra Doksorubisin Uygulaması, b) Önce Naringin Sonra Sisplatin Uygulaması, c) Önce Sisplatin Sonra Naringin Uygulaması, d) Önce Doksorubisin Sonra Naringin Uygulaması. 66
Şekil 4.33. Devamı N1E-115 Nöroblastom Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. e) Aynı Anda Naringin, Sisplatin Uygulaması, f) Aynı Anda Naringin, Doksorubisin Uygulaması, g) Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin Uygulaması..... 67
Şekil 4.34. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) Ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu. a) Önce Naringin Sonra Doksorubisin Uygulaması, b) Önce Naringin Sonra Sisplatin Uygulaması. 68
Şekil 4.34. Devamı N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) Ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu. c) Önce Sisplatin Sonra Naringin Uygulaması, d) Önce Doksorubisin Sonra Naringin Uygulaması. 69
Şekil 4.34. Devamı N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) Ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu. e) Aynı Anda Naringin, Sisplatin Uygulaması, f) Aynı Anda Naringin, Doksorubisin Uygulaması. 70
Şekil 4.34. Devamı N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) Ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu. g) Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin Uygulaması. 71
Şekil 4.35 C8-D1A Astrosit Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı

(Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. a) Önce Naringin Sonra Doksorubisin Uygulaması, b) Önce Naringin Sonra Sisplatin Uygulaması, c) Önce Sisplatin Sonra Naringin Uygulaması, d) Önce Doksorubisin Sonra Naringin Uygulaması. 72
Şekil 4.35 Devamı C8-D1A Astrosit Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. e) Aynı Anda Naringin, Sisplatin Uygulaması, f) Aynı Anda Naringin, Doksorubisin Uygulaması, g) Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin Uygulaması. 73
Şekil 4.36. C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) floresan yoğunluğu. a) Önce Naringin Sonra Doksorubisin Uygulaması, b) Önce Naringin Sonra Sisplatin Uygulaması. 74
Şekil 4.36. Devamı C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) floresan yoğunluğu. c) Önce Sisplatin Sonra Naringin Uygulaması, d) Önce Doksorubisin Sonra Naringin Uygulaması. 75
Şekil 4.36. Devamı C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) floresan yoğunluğu. e) Aynı Anda Naringin, Sisplatin Uygulaması, f) Aynı Anda Naringin, Doksorubisin Uygulaması. 76
Şekil 4.37. Devamı C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) floresan yoğunluğu. g) Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin Uygulaması. .. 77
Şekil 4.38. N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında p53 Gen İfadesinin Değişimi 79
Şekil 4.39. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Sitokrom-c Gen İfadesinin Değişimi 80
Şekil 4.40. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kaspaz-3 Gen İfadesinin Değişimi 81
Şekil 4.41. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kaspaz-9 Gen İfadesinin Değişimi 82
Şekil 4.42. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Bax Gen İfadesinin

Değişimi 83
Şekil 4.43. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Bcl-2 Gen İfadesinin Değişimi.. 84
Şekil 4.44. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında TNF-α Gen İfadesinin Değişimi 85
Şekil 4.45. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında $p21^{cip1}$ Gen İfadesinin Değişimi 86
Şekil 4.46. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında $p27^{kip1}$ Gen İfadesinin Değişimi.. 87
Şekil 4.47. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kombinasyonlarda p53 Gen İfadesinin Değişimi 89
Şekil 4.48. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kombinasyonlarda Sitokrom-c Gen İfadesinin Değişimi 91
Şekil 4.49. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kombinasyonlarda Kaspaz-3 Gen İfadesinin Değişimi 92
Şekil 4.50. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kaspaz-9 Gen İfadesinin 94
Şekil 4.51. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kombinasyonlarda Bax Gen İfadesinin Değişimi 95
Şekil 4.52. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kombinasyonlarda Bcl-2 Gen İfadesinin Değişimi 96
Şekil 4.53. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kombinasyonlarda TNF-α Gen İfadesinin Değişimi 98
Şekil 4.54. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kombinasyonlarda $p21^{cip1}$ Gen İfadesinin Değişimi 100
Şekil 4.55. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kombinasyonlarda $p27^{kip1}$ Gen İfadesinin Değişimi 101

TABLOLAR

Tablo 3.1.1. N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarına Ait Bilgiler 20
Tablo 3.3. Çalışmada Kullanılan Uygulama Grupları 22
Tablo 3.6. cDNA Sentez Protokolü..... 28
Tablo 3.7.1. qRT-PCR Karışım İçeriği 29
Tablo 3.7.2. qRT-PCR' da Kullanılan Genler ve Sekansları 30
Tablo 3.7.3. Çalışmada Kullanılan Genlerin Plaka Dizaynı 31

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bütün canlılar hücrelerden oluşurlar ve insanlar gibi karmaşık olan hayvanlarda da trilyon sayıda hücre vardır. Hücreler, kalp, karaciğer ve cilt gibi organları oluşturmak için birlikte çalışırlar. Hücre içerisinde bulunan genler, hücrelere ne yapılacağını ve ne zaman büyüyüp bölünmeleri gerektiğinin sinyalini veren, her hücrenin içinde bulunan deoksiribonükleik asit (DNA) parçacıklarıdır [1, 2]. Her bir gen, protein kodu (talimatları) içeren belirli bir DNA dizisinden oluşur. Kanser, bir hücredeki genlerin anormal hale gelmesi ile başlayan, hücrelerin kontrolden çıkarak büyümesi ve çoğalması ile meydana gelen kompleks bir hastalıktır [3].

Günümüzde kanser konusunda yapılan yoğun araştırmalar ve bu araştırmalara harcanan kaynakların artmasına rağmen kanser hala en yaygın ölümcül hastalıklardan biridir [4]. Uluslararası kanser araştırmaları ajansı (IARC) tarafından 184 ülkede yapılan araştırmalara göre 2008 yılında 12.7 milyon olan kanser insidansının 2012 yılında 14.1 milyona çıktığı bildirilmiştir. Bu araştırmalara göre önümüzdeki 20 yıl içerisinde kanser vakalarının 25 milyona yakın olacağı tahmin edilmektedir. Ülkemizde de her yıl yaklaşık 150.000 kanser hastası tespit edilmektedir [5].

Nöroblastom çoğunlukla 5 yaşın altındaki çocuklarda görülen ve çocukluk çağı kanserlerinin %7' sini oluşturan bir beyin kanseri türüdür. Bu kanser tipi çocukluk kanserleri arasında dördüncü en sık görülen kanser türü olmakla birlikte bu çağdaki kanser ölümlerinin %15'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir [6, 7]. Nöroblastom tedavisi hastalığın evresine bağlı olmakla birlikte tedavide cerrahi, kemoterapi, radyasyon terapisi, yüksek dozda kemoterapi/radyasyon terapisi ve kök hücre transplantasyonu ve immünoterapi yöntemleri kullanılmaktadır [8].

Nöroblastomda tedavi yaklaşımlarından istenilen sonucun alınamaması, bu tümörlerin oluşumu üzerinde daha detaylı çalışma ihtiyacı doğurmuştur [9, 10].

Flavonoidler bitkisel kökenli polifenolik bileşiklerdir, özellikle meyve, sebze, buğdaygiller ayrıca bir çok tıbbi ve aromatik bitkilerde bulunurlar. Flavonoidler yapılarında bulundurdukları çok sayıda hidroksil grupları nedeniyle birincil derecede antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir [11]. Naringin özellikle turunçgillerde bulunan bir biyoflavonoiddir [11]. İçerdiği halkalı yapı ve çok sayıdaki aktif grup sebebiyle naringinin antioksidan ve antiinflamatuar özellikleri belirlenmiştir [12, 13]. Diğer taraftan naringinin insan kanserlerinde tümör oluşumunu baskıladığı bildirilmekle birlikte farklı kanser tiplerinde hem anti-apoptotik ve hem de anti-karsinojenik etkileri bildirilmiştir [14, 15, 16, 17, 18]. Servikal, mesane, mide, karaciğer, kolon ve meme kanserlerinde naringinin antikanser aktivitesinin olduğu ve antitümöral aktivitesini hücre döngüsü modülasyonu, antianjiyonenik etki veya apoptozun indüklenmesi ile yaptığı bildirilmiştir [19].

Karsinogenezin kompleks ve çok aşamalı bir süreç olduğu ve kanserin önlenmesinde özellikle doğal besin maddeleri gibi farmakolojik ajanların kullanımı son yıllarda oldukça kabul gören bir yaklaşımdır. Bu nedenle insanlar tarafından yüksek miktarlarda ve düzenli olarak tüketilen besinlerde bulunan doğal bileşikler düşük toksisiteleri nedeni ile antikanserojen ve antitümör aktivite araştırmalarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışma ile nöroblastom tedavisinde kullanılan kemoterapi ajanları ile birlikte naringin flavonoidinin uygulamasının kemoterapi ajanlarının etkinliği üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kanser hücresi olarak fare (*Mus musculus*) beyin dokusu kökenli nöroblastom (N1E-115 ATCC® CRL-2263™) ve sağlıklı hücre olarak yine fare beyin kökenli astrosit (C8-D1A ATCC® CRL-2541™) hücre hatlarına kemoterapi ilacı (sisplatin ve doksorubisin) uygulamasından önce, ilaçlar ile aynı anda ve ilaç uygulamalarından sonra naringin uygulaması yapılmış ve içsel apoptoz yolağından sorumlu genlerin (p53, Tnf-α, Bax, Bcl-2, sitokrom C, kaspaz-3, kaspaz-9, $p21^{cip1}$ ve $p27^{kip1}$) ifadeleri ile canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları belirlenmiştir.

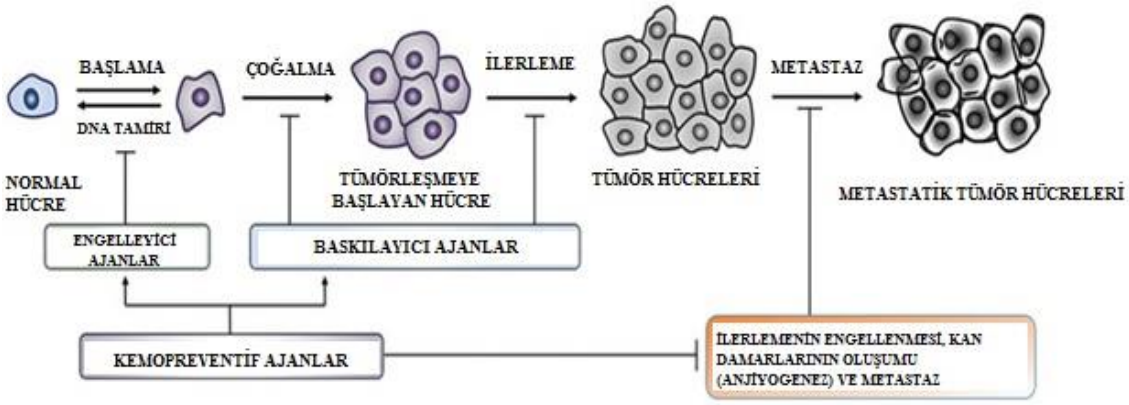
BÖLÜM 2

KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanserin vücut hücrelerinin kontrolsüz çoğalmaları sonucunda oluşan bir hastalık olması nedeni ile hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olan etmenlerin belirlenmesi gerekmektedir. Bu durumda araştırmacılar ilk olarak normal çoğalma mekanizmalarının aydınlatılması yoluna gitmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda normal hücre döngüsü süreçleri ve bu süreçlerin nasıl ters gittiğinin anlaşılması kanseri tetikleyen mekanizmalar hakkında önemli bilgiler edinilmesini sağlamıştır. Her ne kadar kanserin birçok farklı çeşidi olsa da, tüm kanser hücrelerinin en belirgin ortak özelliği normal hücrelerin bölünmesini düzenleyen süreçlerin bozulduğu anormal hücrelerin varlığıdır. Yani, kanser, normal hücrelere anormal fonksiyon kazandıran değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Bu değişiklikler çoğunlukla ya kalıtsal mutasyonların sonucu ya da UV ışığı, X-ışınları, kimyasallar, tütün ürünleri ve virüsler gibi çevresel faktörler tarafından tetiklenir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular kanserin tek bir olay veya faktörün sonucu olmadığını yönündedir [20, 21].

Kanser, hücrelerin normal özelliklerini değiştiren bir dizi moleküler olaydan kaynaklanmaktadır. Kanser hücrelerinde, normal kontrol sistemleri devre dışı bırakılır ve hücreler, aşırı çoğalma ve büyüme göstererek diğer dokulara istila ederler. Bu durum karsinogenez olarak adlandırılır ve başlama, çoğalma, ilerleme ve metastaz olmak üzere dört ana basamaktan meydana gelir (Şekil 2.1.1).



Şekil 2.1.1. Karsinogenez ve Basamakları [22].

Başlama aşaması, genlerde spontan olarak veya kimyasal bir ajana maruziyet sonucu ortaya çıkan mutasyon veya değişimi içermektedir. Genetik değişiklikler, kanserojen metabolizmasının hızı, türü ve DNA onarım fonksiyonunun yanıtını içeren bir dizi faktörden etkilenebilen, hücre çoğalması, hayatta kalma ve farklılaşma ile ilişkili biyokimyasal sinyal yollarının düzensizleşmesine neden olabilir. Çoğalma aşaması, aktif olarak çoğalan tümörleşmeye başlayan hücrelerin birikmesi ile oluşan uzun ve geri dönüşümlü bir süreç olarak kabul edilir. Bu süreç, kemopreventif ajanların etkisi ile değiştirilebilir. İlerleme aşaması, genetik ve fenotipik değişikliklerin ve hücre çoğalmasının meydana geldiği aşamadır. Kanser hücreleri normalde hücre büyümesini inhibe eden sinyaller varlığında bölünürler ve büyürler. Hücreler büyüdükçe, hücre yapısındaki değişiklikler, hücre adezyonundaki azalmalar ve yeni enzimlerin üretimi de dahil olmak üzere yeni özellikler geliştirirler. Bu tür değişiklikler kanser hücrelerinin yayılmasına ve diğer dokuları istila etmesine neden olur [23, 24]. Metastatik kanser hücreleri, kan dolaşımı veya lenf sistemi yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılım gösterirler. Kemoterapötik ajanların, anjiogenez ve primer tümörlerin istilasını önlediği bilinmektedir. Bu nedenle kanser metastazını engellemek için kullanılabilirler.

Kanser hücrelerindeki anormallikler genellikle hücre bölünmesini düzenleyen ve protein kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır. Zamanla, daha fazla gen mutasyon geçirir. Genellikle, DNA hasarını onaran proteinleri oluşturan genler, mutasyona uğramış oldukları için normal olarak çalışmazlar. Sonuç olarak, mutasyon hücrede artmaya başlar, bu hücre ve bağlantılı olduğu hücrelerde başka

anormalliklere neden olur [24]. Mutasyona uğramış hücrelerin bazıları ölür ancak diğer değişiklikler anormal hücrelerin normal hücrelere kıyasla çok daha hızlı çoğalmasına izin veren seçici bir avantaj sağlayabilir. Bu hücreler yerinde kaldıkça benign oldukları düşünülür; eğer invaziv olursa, habis olarak kabul edilirler. Habis tümörlerdeki kanser hücreleri sıklıkla metastaz yaparak yeni tümörlerin oluşabileceği vücudun uzak bölgelerine kanser hücreleri gönderir.

2.2. Beyin Kanserleri ve Nöroblastom

Beyin tümörleri birincil (beyin dokusundan oluşmaya başlayan) ve ikincil veya metastatik (vücudun başka bir bölümünden beyne yayılmış olan) tümörler olarak sınıflandırılmaktadır. Akciğer kanseri, göğüs kanseri, böbrek kanseri, melanoma ve diğer kanser türleri beyne yayılırlar [25]. Primer beyin tümörleri benign veya habis olabilirler. Benign beyin tümörleri kanser hücreleri içermezler ve genellikle iyi huylu tümörlerdir. Benign beyin tümörleri genellikle belirgin bir kenarlığa veya kenara sahiptirler. İyi huylu tümörlerdeki hücreler nadiren etrafındaki dokuları istila eder ve vücudun diğer bölümlerine yayılmazlar. Bununla birlikte, benign tümörler beynin hassas bölgelerine baskı oluşturabilir ve bu da ciddi sağlık sorunlarına neden olabilir. Kanser hücreleri içeren malign beyin tümörleri (beyin kanseri) sağlıklı beyin dokusunu istila eder ve yaşam için bir tehdit oluştururlar. Malign beyin tümörlerinin tedavisinde, cerrahi, radyasyon terapisi ve kemoterapi gibi yöntemler uygulanmaktadır.

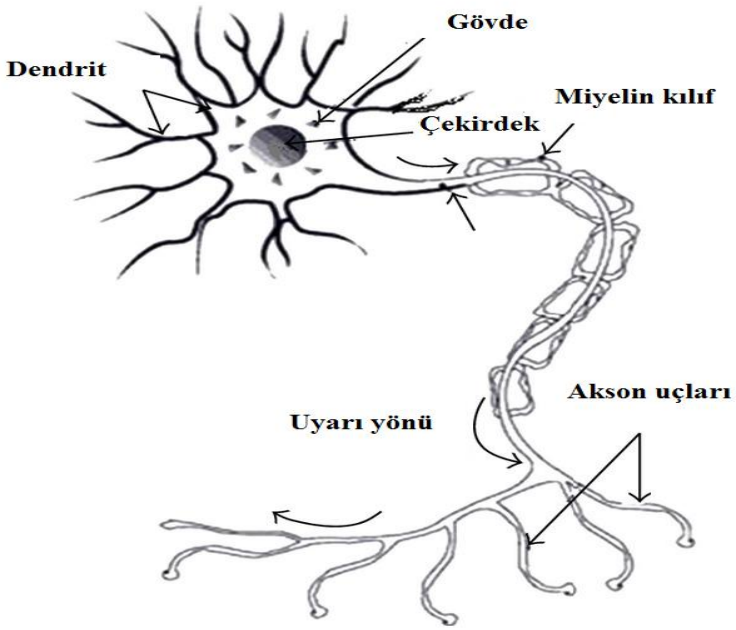
Nöroblastom ve glioma yaygın olarak bilinen beyin tümörlerindendir. Nöroblastom sinir hücrelerinden, gliomalar ise glial destek hücrelerden köken alırlar. Gliomaların birkaç çeşidi olmakla birlikte en çok bilineni küçük yıldız şekilli astrosit denilen hücrelerden köken alan “Astrositoma” dır [26].

Nöroblastomlar, sempatik sinir sisteminin nöroblastlar olarak adlandırılan erken sinir hücrelerinde başlayan kanserlerdir. Genellikle, böbreküstü bezlerinde, karındaki sempatik sinir ganglialarında, alt karın, boyun, göğüs veya omurga yakınında başlayabilir. Nöroblastom agresif bir tümör olduğundan dolayı başlama noktası tam olarak bilinmemektedir ve vücudun hemen hemen her bölgesine metastaz yapabilmektedir. Nöroblastomayı anlamak için tümörlerin başladığı yerdeki sempatik sinir sistemi hakkında bilgi sahibi olmak gerekir [3, 27, 28].

Vücudun bütün bölgelerini kapsayan sinirler, omurilik ve beyinden oluşan

sinir sistemi düşünme, his ve hareketin temelini oluşturur. Ayrıca kalp atışı, solunum, kan basıncı, sindirim ve diğer fonksiyonlar gibi vücut fonksiyonlarını da kontrol eder. Sinir sisteminin bu kısmı otonom sinir sistemi olarak bilinir. Sempatik sinir sistemi de otonom sinir sisteminin bir kısmıdır. Sempatik sinir sistemi; omurilik boyunca uzanan sinir liflerini, ganglia olarak adlandırılan sinir uzantılarını ve böbrek üstü bezlerinin medullasında bulunan sinir benzeri hücreleri içerir.

Sinir sistemini oluşturan ana hücreler, sinir hücreleri ya da nöron olarak adlandırılır (Şekil 2.2.1.). Bu hücreler vücuttaki kimyasal hormonların salınımını sağlayan diğer hücre tipleriyle bağlantı halindedir. Bu oldukça önemlidir, çünkü nöroblastom hücreleri bu semptomlara neden olarak bazı hormonların salınımını sağlar.

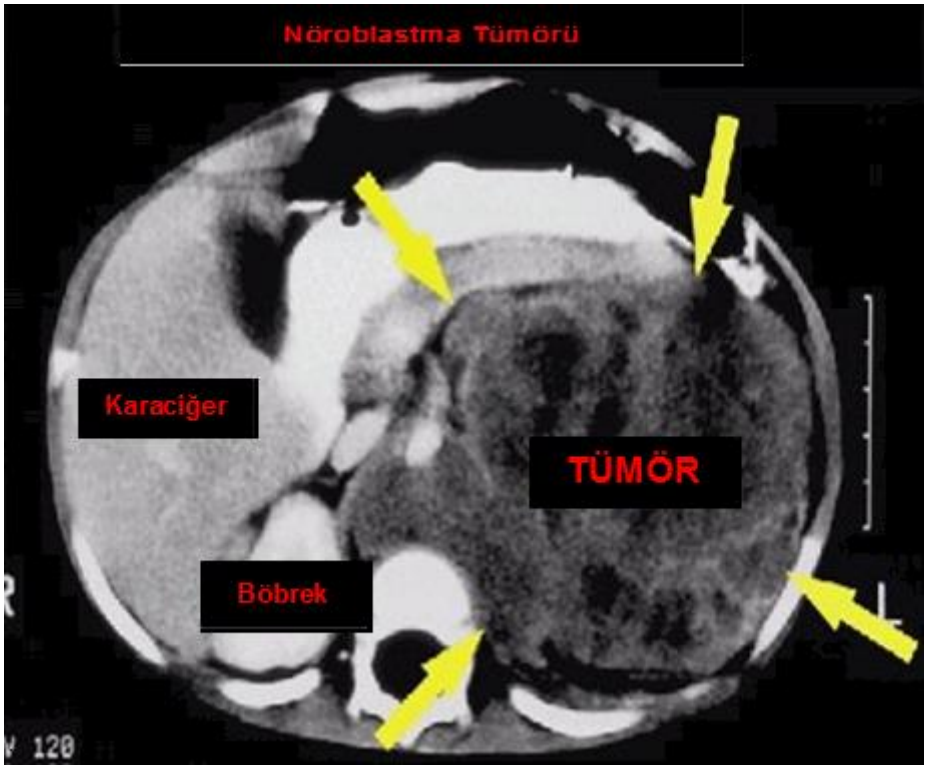


Şekil 2.2.1. Bir Nöronun Yapısı [29].

Nöroblastom dışındaki çoğu kanser türünde çevresel faktörler (kilo artışı, diyet, sigara alışkanlığı ve fiziksel aktivite gibi) önemli rol oynarken nöroblastom gibi çocukluk çağı kanserlerinde bu faktörler risk oluşturmamaktadır. Nöroblastomanın embriyonel kökenli olması çevresel olmayan faktörlerin bu kanserin üzerinde daha etkili olmasına neden olmaktadır [3, 30].

Tüm çocukluk çağı kanserlerinin %8-10'unu oluşturan nöroblastomlar, en çok lenf nodlarına, kemiklere, kemik iliğine ve karaciğere metastaz yapar (Şekil

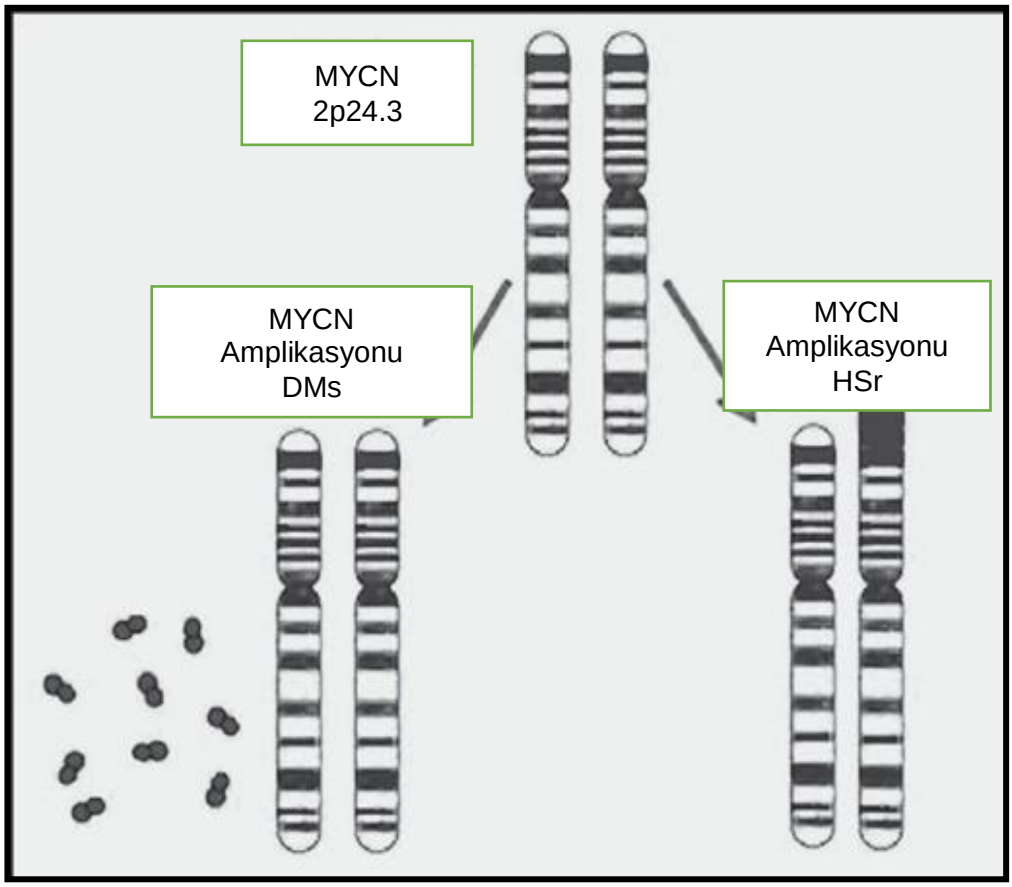
2.2.2.) [31, 32]. Nöroblastomlar, embriyonal hücrelerden köken aldıklarından dolayı küçük yaştaki çocuklarda görülme oranı daha yüksektir [33].



Şekil 2.2.2. Metastaz Yapmış Nöroblastom Tümörü [34].

Nöroblastomda meydana gelen birçok değişiklik hastalığın seyri üzerinde oldukça önemlidir. Bu değişikliklerden birkaçı; MYCN onkogeninin amplikasyonu, nötrofil reseptörlerinin etkisi, "17q dengesiz fazlalığı", telomeraz aktivitesi, "1p veya 11q allelik kaybı" dır [33].

MYCN onkogeni nöroblastom tedavisinin en önemli göstergelerinden biridir. İkinci kromozomun kısa kolunun 2p24 bölgesinde yerleşmiş olan bu onkogenin (Şekil 2.2.3.) amplikasyonu, farklı moleküler tekniklerle (southern blot, kantitatif PCR, FISH, immunhistokimya gibi) gösterilebilir [35].



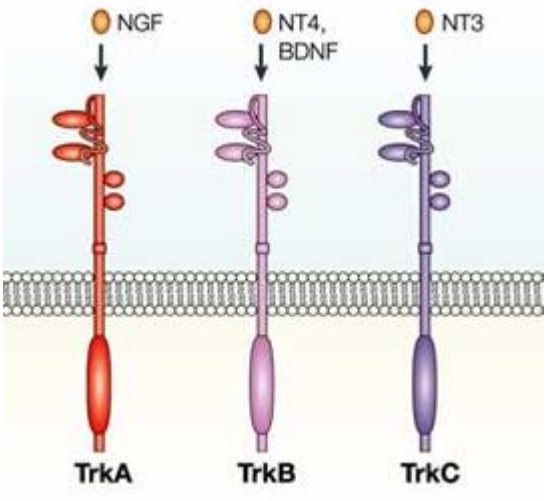
Şekil 2.2.3. MYCN Onkogeni [36].

Günümüzde nöroblastomların çoğunda 17q bölgesinde allelik fazlalık saptanmaktadır. Bu alellik fazlalığı, (+17 q) veya t (1;17) şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu durum kötü prognoz göstergesi olup hastalığın seyri üzerinde oldukça büyük önem taşımaktadır. Tümör dokusunda oldukça sık rastlanan 1p delesyonu ise nöroblastomların ileri evresinde sık görülmekte ve MYCN onkogeninin amplifikasyonu ile birliktelik sağlamaktadır. 1p36 bölgesinde meydana gelen herhangi bir delesyon 1p bölgesindeki tümör supresör genin ifadesinde azalışa neden olmaktadır.

11q delesyonuna ise nöroblastom olgularında oldukça sık rastlanmaktadır. 1p delesyonunun aksine, 11q delesyonu varsa MYCN amplifikasyonundan bahsetmek söz konusu değildir. Bazı durumlarda (ileri evre, kötü prognoz) hastalığın seyri üzerinde oldukça önemlidir.

Sempatik sinir sistemine ait nöroblastların, nöroblastom hücrelerine nasıl dönüştüğü tam olarak bilinmemekle birlikte nöroblastların uyarılmasında görevli olan nörotrofin reseptörler yolağında meydana gelen olumsuzlukların nöroblastların

nöroblastomlara dönüşümünde rol oynadığı bildirilmiştir (Şekil 2.2.4.) [37, 38].

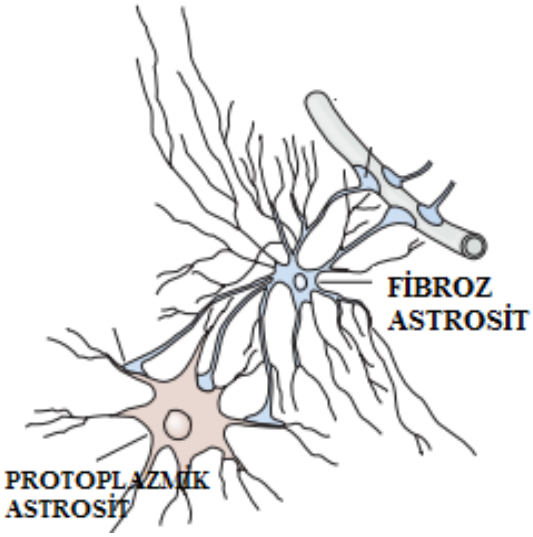


Şekil 2.2.4. Nörotrofin Reseptörleri (NGF: Sinir Büyüme Faktörü, BDNF: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör, NT-4: Nörotrofin 4, NT-3: Nörotrofin-3, Trk: Tirozin Kinaz) [39].

2.2.1. Astrosit Hücreleri ve Yapıları

Astrosit hücreleri yıldız şeklindeki büyük uzantılara sahip olan glial hücreleridir ve kan beyin bariyeri oluşumunu sağlayan yapılardır. Astrositler, fibröz ve protoplazmik olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Uzun, ince ve az dallanma gösteren fibröz astrositlerin diğer bir adı spiderdır. Protoplazmik astrositler ise fibröz astrositlerin tam tersine kısa, kalın ve çok dallanma gösterirler (Şekil 2.2.1.1.). Astrositler tüm kan damarlarını çevreleyen yapıya sahiptirler [40].

Merkezi sinir sisteminde en bol hücre türü olan astrositler, beynin korunması, homeostazı, enerji maddelerinin dağılımı, sinaptogenezis gibi çeşitli temel işlevleri yerine getirirler. Astrositler, nöronların besin kaynağı, serebral kan akışının düzenlenmesi, nöronal büyüme ve farklılaşmanın düzenlenmesi, hücre dışı glutamat seviyelerinin korunması ve iyon dengesinin düzenlenmesi gibi çok sayıda fonksiyona hizmet eden ayrıştırılmış hücrelerdir. Buna ek olarak, son yıllarda yapılan çalışmalarda normal astrosit fonksiyonlarının nörolojik hastalıklarda, alzheimer ve parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıklarda kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir [41, 42, 43].



Şekil 2.2.1.1. Astrositlerin Yapıları [44].

2.3. Nöroblastom Tedavisi ve Kemoterapi

Nöroblastom tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi kullanılmaktadır. Cerrahi operasyon tümörü çıkarmak ve hastalığı evrelendirmek için yapılmaktadır ve hastalığın evresine ve hastalığın risk grubuna göre belirlenir. Radyoterapi ise cerrahi operasyon ve kemoterapi tedavisi olmasına rağmen hastalığın ilerlemesi durumunda uygulanmaktadır. Bazı çocuklar; ya cerrahi öncesi yada cerrahi sonrası kemoterapi ile tedavi edilir. Kemoterapi, nöroblastomda cerrahi işlemin tam olarak yapılamadığı veya kanserin metastaz yaptığı durumlarda uygulanan en iyi tedavi yöntemlerinden birisidir. Nöroblastom tedavisinde kullanılan kemoterapi ajanları aşağıda verilmiştir [45, 46, 47, 48].

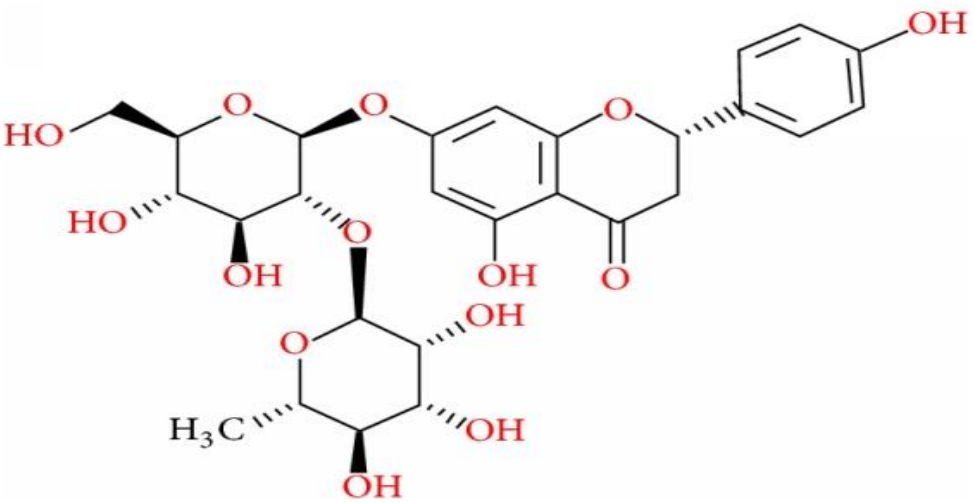
- Sisplatin ya da Karboplatin
- Vincristine
- Doksorubisin
- Etoposide
- Topotecan
- Busulfan ve Melphalan

Nöroblastom tedavisinde kemoterapi ilaçları genellikle kombinasyon şeklinde uygulanmakla birlikte bu kombinasyonlar ve yüksek doz ilaç kullanımı küçük

çocuklarda büyük risk oluşturmaktadır [49, 50]. Kemoterapi ilaçları kanser hücrelerini öldürmesinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir [51, 52]. Kemoterapinin yan etkileri, verilen ilacın dozuna, veriliş zamanına ve ilacın tipine bağlı olmakla birlikte genel olarak saç dökülmesi, ağız yaraları, iştah kaybı, bulantı ve kusma, ishal ve kabızlık, enfeksiyonların artması, kanama (lökositlerin artması) ve yorgunluk şeklinde görülmektedir. Bu yan etkilerin çoğu kısa sürelidir ya da kemoterapi tedavisinden sonra kaybolur [53, 54, 55].

2.4. Naringin

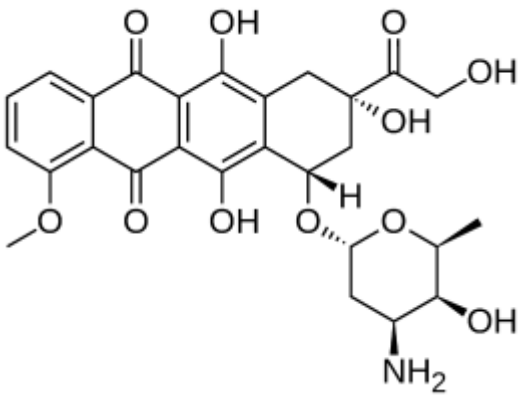
Bitkisel fenolik maddelerin en büyük sınıflarından biri olan flavonoidler meyve, sebze, tahıl taneleri, kabuk, kök, gövde gibi bitki kısımlarında bulunabilirler [56]. Flavonoidler bitkilerde polinasyon, tohum yayılması, polen tüp büyümesi, mineral besinlerin rezorpsiyonu, abiyotik stres toleransı, ultraviyole ve allelopatik etkileşimlere karşı koruma gibi çok çeşitli fonksiyonlara sahiptirler [57, 58, 59]. Flavonoidler flavonollar, flavononlar, flavanollar, antosiyaninler ve izoflavonlar olmak üzere farklı gruplara ayrılırlar. Insan diyetinde nispeten bol olarak tüketilen flavanol, flavonol ve antosiyaninlerin kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejenerasyonun önlenmesinde önemli olduğu bilinmektedir [60, 61, 62, 63, 64]. Bir flavonon glikoziti olan naringin (4, 5, 7- trihidroksi flavonon- 7- ramnoglikozit) beş halkalı yapısıyla dikkat çeken ve yapısındaki şeker molekülüyle büyük önem taşıyan bir flavonoiddir (Şekil 2.4.1) [65]. Turunçgillerde bol olarak bulunan naringin oral olarak alındığında naringenine metabolize edilir ve böbrek tarafından atılır. Naringin'in farklı kanser türlerinde antikanser etkilerinin yanı sıra antiapoptotik etkileri de rapor edilmiştir [17, 18, 66]. Servikal, mesane, mide, karaciğer, kolon ve meme kanserlerinde naringinin antikanser aktivitesinin olduğu ve antitümöral aktivitesini hücre döngüsü modülasyonu, antianjiyojenik etki veya apoptozun indüklenmesi ile yaptığı bildirilmiştir. Ancak naringinin sitotoksisitesi ve kanser hücre büyümesini nasıl inhibe ettiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [67, 68, 69, 70]. Bununla birlikte SiHa insan servikal kanser hücrelerinde naringinin kaspazların (kaspaz-3, 8 ve 9) ifadesini artırarak hücre apoptozunu uyardığı rapor edilmiştir [70]. Bir diğer çalışmada naringinin triple negatif meme kanseri hücrelerinde kaspazları aktive ederek pro-apoptotik aktivitesini gösterdiği bildirilmiştir [69].



Şekil 2.4. Naringin'in Kimyasal Yapısı [71].

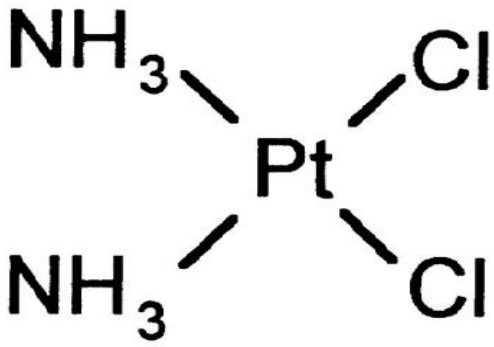
2.5. Doksorubisin ve Sisplatin

Kemoterapi ilaçlarından olan ve nöroblastom tedavisinde sıklıkla kullanılan doksorubisinin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, DNA'nın biyosentezini engellediği bilinmektedir. Ayrıca doksorubisin, DNA, kalp ve cilt hasarına da neden olabilmektedir (Şekil 2.5.1.) [72, 73].



Şekil 2.5.1. Doksorubisin'in Yapısı [74].

Sisplatin, içinde bulunan platinin 2 farklı pozisyonda DNA'ya bağlanarak DNA replikasyonunu engellemesi nedeniyle hücrede apoptoza neden olan, ayrıca böbrekler üzerinde olumsuz etki gösterebilen ve işitme duyusunda gerilemelere neden olabilen bir kemoterapi ilacıdır (Şekil 2.5.2.) [75].



Şekil 2.5.2. Sisplatin'in Yapısı [76].

2.6. Apoptoz

Yunanca'dan köken alan ve bir çiçeğin yapraklarının dökülmesi anlamına gelen "Apoptosis" kelimesi, fizyolojik ve patolojik uyarı ile tetiklenen hücre ölümünü ifade etmek için kullanılmaktadır. Apoptoz, ilk kez Alman Bilim Adamı Carl Vogt tarafından 1842 yılında tanımlanmışken, 1972 yılına kadar apoptoz terimi ilk kez John Foxton Ross Kerr grubu tarafından doku hücresi ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır [77, 78]. Bu dönemde insanlar apoptozun, hücre zarı buruşması, DNA parçalanması, sitozol kalsiyumu ile birlikte arttığını bilmekte iken son yıllarda yapılan apoptoz araştırmaları ile apoptozun moleküler mekanizması araştırmaya ve böylece klinik tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Apoptoz ile ilgili çalışmalarda ilk olarak Bcl-2 Aile proteini, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, Bid ve Bax gibi bazı önemli proteinler bulunmuş ve kaspaz üzerine odaklanılmıştır (Şekil 2.6.1) [79, 80]. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda apoptoz yolağını bloke etmek için kaspaz inhibitörünün kullanıldığı çalışmalar sonucunda apoptozun başlaması için kaspazdan bağımsız bir yol daha olduğu bulunmuştur. Günümüzde apoptoz, tip I klasik apoptoz (kaspaz bağımlı apoptoz), tip II apoptoz (kaspazdan bağımsız apoptoz) olmak üzere 2'e ayrılır. Örneğin, mitokondriden serbest bırakılan apoptoz indükleyici faktör (AIF), kaspazdan bağımsız bir biçimde bulunur [81].

Yapılan araştırmalara göre hücre ölümü, apoptoz, nekroz ve piroptoz olarak sınıflandırılır. İlk bulunan hücre ölüm şekli nekrozdur ve daha sonra apoptoz terimi kullanılmaya başlanmıştır. Piroptoz ise son yıllarda, hücre zarından salınan inflamatuar faktörlerin etkisi ile bilinen ölüm şeklidir. Kanser tedavisinde, apoptoz

sinyal yollarının değiştirilmesinin büyük önem taşıdığı bilinmektedir. Ayrıca apoptozun, tümör gelişiminde rol oynamanın yanı sıra, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, inme ve benzeri hastalıklarda da etkili olduğu yapılan birçok çalışma ile belirlenmiştir.



Şekil 2.6.1. Apoptoz Proteinleri [82].

2.6.1. Apoptoz Sinyal Yolakları

Çok karmaşık ekstrinsik ve intrinsik ligandlarla düzenlenen, farklı hücre sinyal yolakları tarafından kontrol edilen ve hücre ölümünün veya hayatta kalmanın düzenlenmesinde rol oynayan apoptoz yolakları kaspazların dahil olup olmamasına göre ayırt edilen iki büyük yolağa ayrılmaktadır. Bununla birlikte mitokondri farklı apoptoz yolaklarını birbirine bağlayabilir [78, 80].

2.6.1.1 Kaspaz bağımlı yolak

Kaspaz-bağımlı apoptoz klasik programlanmış hücre ölüm yoludur, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-12, kaspaz-7, kaspaz-3 kaskadı genellikle bu tür apoptoz yolağına katılır, Tnf-alfa reseptörü, FasL reseptörü, ölüm reseptörü gibi çeşitli reseptörler apoptoz yolağında yer alır. Bazı demir kanalları, apoptoz yolunda da rol oynayabilir. Tipik demir kanalı, kalsiyum kanalıdır. Sitosol içerisindeki kalsiyum konsantrasyonu sinyal iletiminde önemli rol oynar ve hücre proliferasyonuna ve hücre ölümüne

katılır, hücre kaderi kalsiyum kanalı açılıp kapanarak kontrol edilebilir [78, 83]. Tnf-alfa ile indüklenen kaspaz-8'e bağımlı yol, Tnf-alfa reseptörüne bağlanır. Ölüm kompleksi vasıtasıyla kaspaz-8'i aktive eder ve daha sonra Bcl-2 proteini aktive olur, Bcl-2 familyası protein aktivasyonu, mitokondriyal membranın değişmesine neden olur ve salınan sitokrom c'yi uyarır [78, 81]. Sitokrom c, kaspaz kaskadı reaksiyonunu aktive edebilen ve sonunda apoptozu indükleyebilen proapoptoz sinyal molekülüdür. Bazı radyasyon UV veya X ışını mitokondriyal depolarizasyonu ve membran permeabilizasyonunu sağlayabilir, daha sonra reaktif oksijen türleri artar; Sitokrom c salınır ve ardından kaspaz-9, kaspaz-3 aktivasyonu başlar ve bu döngü apoptoz ile sonuçlanır. Örneğin, yabancı patojenler FasL reseptörü tarafından algılanabilir ve FADD ve kaspaz-8'i aktif ederek hücre içi patojen herpervirus enfeksiyonu, kaspaz-8'e bağlı apoptozu indükleyebilir. Kaspaz-8'e bağlı apoptozun yanı sıra, bazı patojenler kaspaz bağımlı apoptoz yolağını tetikleyebilir. Örneğin, *Mycobacterium tuberculosis,* makrofaj üzerinde programlanmış hücre ölümünü indükleyebilir ve bu apoptoz yolu, kaspaz-12'ye bağımlıdır [84, 85, 86].

Endoplazmik retikulum (ER) stresi ile uyarılan reaktif oksijen türlerinin üretimi, *Mycobacterium tuberculosis*'in tetiklediği apoptoza da katılmaktadır. Bakteriler dışında, virüsler de apoptozu indükleyebilir. En son yapılan araştırmalarda, Kaposi sarkomuyla ilişkili herpesvirüs replikasyonunun konakçı hücre apoptozunu kaspaz bağımlı biçimde tetiklediği bulunmuştur. Apoptozun birçok mekanizması vardır ve in vitro- in vivo hücre ligandları tarafından tetiklenebilen farklı sinyal iletim yollarına sahiptir [87].

2.6.1.2. Kaspaz bağımsız yolak

Kaspaz bağımsız yolaktaki mitokondrial değişiklikler, enerji tükenmesi, serbest radikal oluşumu ve apoptozu indükleyici faktör gibi sitotoksik proteinlerin salınmasını içerebilir. Hücrede çok sayıda ligand mitokondriyal membranın potansiyel değişimini indükleyebilir. Kaspazdan bağımsız apoptozu indüklemek için bir faktör olan reaktif oksijen türleri mitokondriyal hasarın oluşması ile artar. Örneğin, Denis Martinvelet, granzim A'nın doğrudan reaktif oksijen türlerini arttırdığını ve kaspaz bağımsız mitokondri hasarını indüklediğini rapor etmiştir [81]. Bu ölüm yolu, metafaz sırasında p53'ten bağımsız bir şekilde hücrenin ölmesi ile veya başarısız bir mitoz bölünmeden sonra p53'e kısmen bağımlı bir poliploidi

kontrol noktasının aktivasyonuyla oluşur. Plazmid transfeksiyonu ile zorlanmış BNIP-3 ifadesi, mitokondrial Endo G salınımı ve nükleer translokasyon ile sonuçlanır. BNIP-3 AIF'in mitokondriden salınımına öncülük eder ve apoptoz başlar [83, 88, 89].

2.6.1.3. Mitokondriyal yolak

Bcl-2 familyası proteinleri mitokondriyal geçirgenliği kontrol ederek apoptozu düzenler. Anti-apoptotik proteinler Bcl-2 ve Bcl-xL dış mitokondriyal duvarda bulunur ve sitokrom c salımını inhibe eder. Apoptoz öncesi Bcl-2 proteinleri Bad, Bid, Bax ve Bim, sitozole yerleşebilir, ancak ölüm sinyali verdikten sonra mitokondriye translokasyon yaparak sitokrom c salınmasını teşvik eder. Bad, mitokondriye translokasyon yapar ve Bcl-xL ile pro-apoptotik bir kompleks oluşturur. Bu translokasyon, Bad'in fosforilasyonunu başlatan ve sitozolik ayrılmaya yol açan sağ-kalım faktörleri tarafından engellenir. Sitozolik Bid, Fas yoluyla sinyal gönderdikten sonra kaspaz-8 ile parçalanır; aktif fragmanı (tBid) mitokondriye translokasyon yapar. Bax ve Bim mitokondriye geri taşınırlar. DNA hasarını takiben aktive olan p53, Bax, Noxa ve Puma'nın transkripsiyonunu indükler. Mitokondriden salındığı zaman, sitokrom c apaf-1'e bağlanır ve kaspaz-9 ile bir aktivasyon kompleksi oluşturur [84, 90, 91, 92].

2.6.2. Apoptoz ve Kanser

Son on yılda, temel kanser araştırmaları kanser biyolojisi ve kanser genetiği konusundaki anlayışımızda kayda değer gelişmeler sağlamıştır. Bu gelişmelerin en önemlileri arasında, apoptozun ve onu kontrol eden genlerin habis fenotip üzerinde derin etkisi olduğudur. Örneğin, bazı onkojenik mutasyonların apoptozu bozduğu ve tümörde başlangıç, ilerleme veya metastaza yol açtığı bilinmektedir. Tersine, güçlü kanıtlar, diğer onkojenik değişikliklerin apoptozu teşvik ettiğini, böylece çok aşamalı karsinogenez sırasında apoptozun önüne geçmek için seçici bir baskı oluşturduğunu gösterir [93, 94]. Ayrıca çoğu sitotoksik anti kanser ajanının apoptozu indüklediği, apoptotik süreçte meydana gelen kusurların tedavide başarısızlığa neden olduğu bilinmektedir. Çünkü tümör gelişimi boyunca apoptozu baskılayan mutasyonlar aynı zamanda tedaviyi de etkiler. Araştırmalar, önümüzdeki on yılda, apoptozun terapötik fayda sağlamak için kullanması için yeni stratejiler üreteceğini öngören, apoptoz

mekanizmalarını ortaya çıkarmaktır [95].

Apoptoz başlangıçta hücre büzülmesi, hücre yüzeyinde kabarcıklanma, kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma gibi morfolojik özellikleriyle tanımlanmıştır [77]. Aslında, apoptotik yolaklardaki kusurların, nörodejeneratif bozukluklardan maligniteye kadar değişen bir takım insan hastalıklarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir [93, 94, 95].

Tümör gelişiminde Bcl-2 onkogeninin karakterizasyonu, apoptoz için oldukça önemlidir. Bcl-2 tipik bir onkojen gibi davranmak ve hücre proliferasyonunu bozmak yerine, programlanmış hücre ölümünü bloke ederek, hücre sağ kalımını arttırmaktadır. Bcl-2'ye ek olarak, Bcl-xL, bazı tümör tiplerinde upregüle edilmiş güçlü bir ölüm baskılayıcıdır. Bcl-2 ve Bcl-xL'ın tam tersine Bax, apoptozu teşvik edici bir gendir. p53 ise apoptoz ile bağlantılı ilk tümör baskılayıcı gendir. p53 mutasyonları insan tümörlerinin çoğunda görülür ve sıklıkla ilerlemiş tümör evresi ve kötü hasta prognozu ile ilişkilendirilmektedir [78, 81, 96].

Kaspaz-9 ve apaf-1'in inaktivasyonu, c-Myc ve Ras tarafından hücrelerin kanserojen dönüşümünü teşvik etmektedir. Apaf-1, hücre dışı sistemlerde, apoptoz için önemli olan bir protein olarak belirlenmiştir. Çünkü sitokrom c, apaf-1/kaspaz-9 proteaz kompleksinin aktivasyonu için gerekli olan bir ko-faktör olduğundan bu çalışmalar, onkogenin, apoptozun efektör fazına nasıl bağlantılı olduğunu göstermektedir. Onkogen kaynaklı apoptozu modüle eden birkaç molekül, insan tümörleri içerisinde mutasyona uğramıştır ve tümör baskılayıcı olarak apaf-1 ve kaspaz-9'u tanımlamaktadır. Bununla birlikte bugüne kadar, apaf-1 ya da kaspaz-9' da mutasyon tanımlanmamıştır [77, 78].

Klasik kemoterapi ajanları bir çok kanser türü üzerinde başarılı bir etki gösterse de özellikle sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkileri bu ajanların kanser tedavisinde kullanımını sınırlamaktadır [69, 98,99]. Bu sebeple son yıllarda alternatif tedavi seçeneklerinin artışı kanser tedavisinde bitkisel kaynaklı bileşenlerin kullanımını arttırmıştır. Ancak bitksel kaynaklı bu maddelerin kullanımında hem bu maddelerin sağlıklı hücreler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve hem de kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanılması durumunda etkinliklerinin araştırılması gerekmektedir. Nitekim bazı maddelerin kemoterapi ilaçlarından önce, sonra veya aynı anda uygulanmasının hücrelerin ölümü veya kemoterapi ilaçlarına duyarlılığı

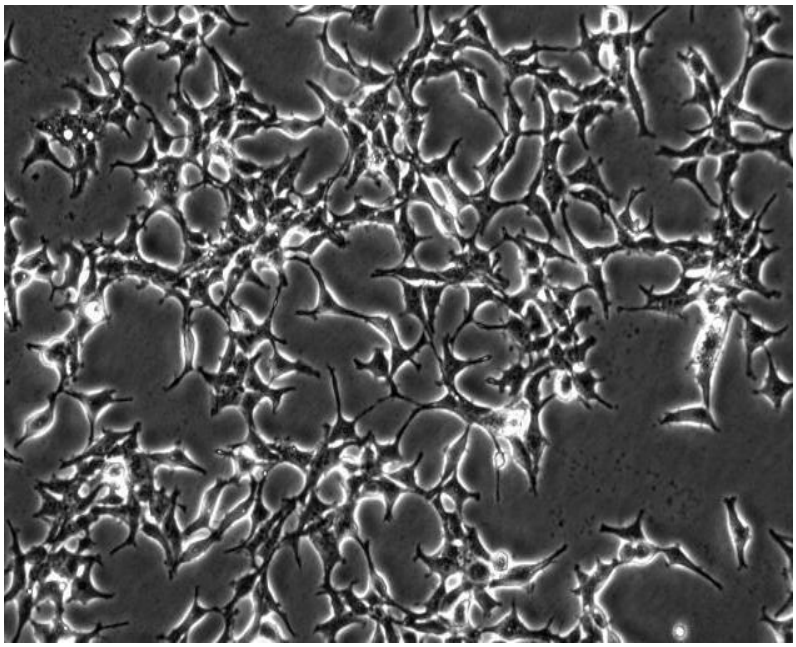
üzerinede farklı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Yapılan bu çalışma ile nöroblastom ve sağlıklı hücre hatlarında naringin flavonoidinin kemoterapi ilaçlarından önce, sonra ve aynı anda uygulanmasının nöroblastom ve astrosit hücre hatlarında canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları üzerine ve apoptoz yolağındaki bazı genlerin ifadeleri üzerine etkileri belirlenmiştir.

BÖLÜM 3

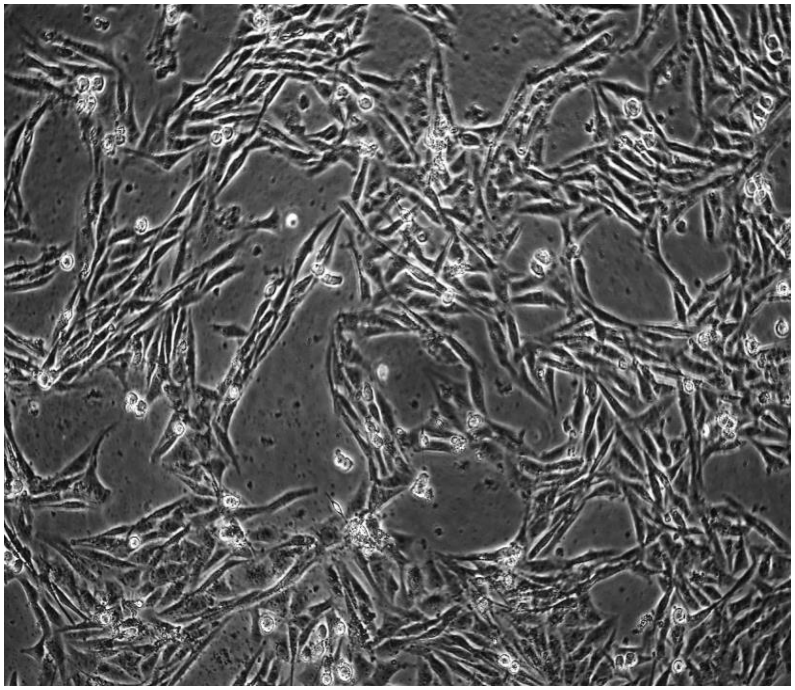
MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmamızda kullanılan nöroblastom (N1E-115; ATCC® CRL-2263™) hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonundan (ATCC) satın alınmış, sağlıklı hücre hattı olarak astrosit (C8-D1A; ATCC® CRL-2541™) Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nden temin edilmiştir. Kullanılan hücrelerin ZEISS (Observer.Z1) mikroskopta alınan görüntüleri Şekil 3.1.1. ve Şekil 3.1.2.'de, diğer özellikleri ise Tablo 3.1.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1.1. Nöroblastom Hücre Hattının Mikroskobik Görüntüsü (10X)



Şekil 3.2.2. Astrosit hücre hattının mikroskobik görüntüsü (10X)

Tablo 3.1.1. N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarına Ait Bilgiler

	Nöroblastom (N1E-115)	*Astrosit (C8-D1A)*
Organizma	Fare	Fare
Tipi	Nöroblastom	Astrosit
Elde Edildiği Doku	Beyin	Beyin
Kültür Özellikleri	Gevşek Yapışkan	Yapışkan

3.2. Hücrelerin Kültüre Alınması, Pasajlanması ve Dondurulması

Çalışmamızda kullanılan hücre hatlarının kültüre alınması, pasajlanması ve kültür devamlılığı işlemlerinin tümü steril kültür odasında ve laminar kabin (Safe Fast Elite (EN 12469 2000)) içerisinde yapılmıştır. Hücreler temin edildikten sonra %5 yeni doğan sığır serumu (FBS) (MULTICELL (FBS-HI-IIA)) 100 IU/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin (MULTICELL (450-201-Z2) ve %1 L-glutamin (MULTICELL (609-065-E2)), içeren EMEM: DMEM: HAMS F12 (MULTICELL) besin ortamı flasklara ekilerek 37°C de %95 nem ve %5 CO_2 içeren etüve (PANASONIC) alınmıştır. Hücrelerin yapışması ve diğer özellikleri invert mikroskop (OLYMPUS) ile belirli zaman aralıklarında kontrol edilerek kültür devamlılığı sağlanmıştır. Flask tabanına yapışan, sağlıklı bir şekilde çoğalan hücreler

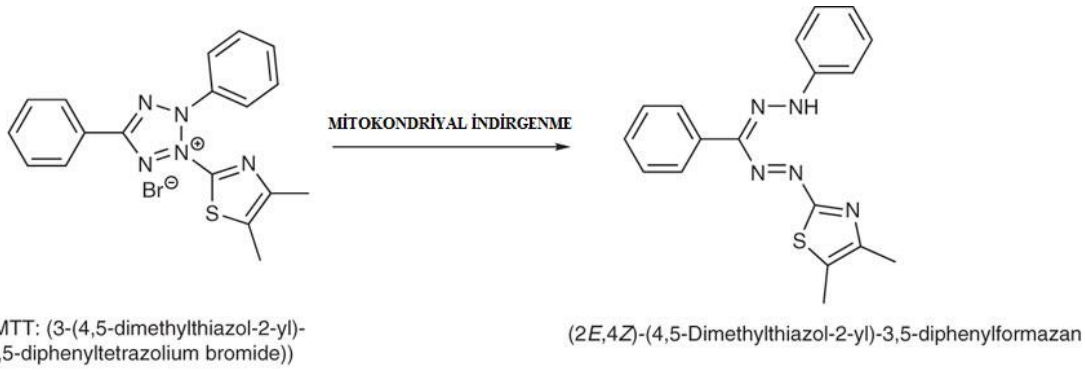
üç günde bir pasajlanmıştır. Pasajlama işlemi için flaskta bulunan besiyeri uzaklaştırılarak içerisine 37°C sıcaklığa getirilmiş olan tripsin-EDTA (MULTICELL 352-542-EL) eklenmiş ve 5 dk. süre ile hücrelerin flask tabanından kalkması beklenmiştir. Mikroskop ile tabandan kalktığı belirlenen hücre tripsin karışımı 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. Bu tüpler daha sonra 2500g'de 2.30 dakika santrifüj (HERMLE) edilerek santrifüj sonunda tripsin uzaklaştırılmış ve dipte kalan hücreler besiyeri ile karıştırılarak yeni flasklara (NEST) ekilmiştir.

Hücrelerin gerekli olduğu takdirde yeniden kullanılmak üzere dondurulması işleminde hücreler tripsin ile kaldırılarak santrifüj edildikten sonra %5 DMSO (MERCK 67-68-15) içerecek şekilde hücre besiyeri karışımı eklenmiş ve -150°C'de (PANASONIC) muhafaza edilmiştir. Dondurulan hücreler yeniden kullanılacağı zaman ise 37°C' de etüvde çözündürülüp önce 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınmış ve santrifüj (2.30 dk) işlemi ile içerisinde bulunan dimetil-sülfoksit (DMSO) uzaklaştırılmıştır. Yeni besin ortamı eklenmesinden sonra hücre kültürü flasklarına ekilerek uygun şartlar altında inkübe edilmiş ve kültür devam ettirilmiştir.

3.3. MTT (*3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5* diphenyl tetrazolium bromid) Yöntemi ile Hücre Hatlarına Uygulanacak Madde Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Naringin, doksorubisin ve sisplatinin hücrelere uygulanacak konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin belirlenmesi amacı ile ilk olarak MTT testi yapılmıştır (1983, J. Immunol. Methods).

Bu yöntemde canlı hücrelerin mitokondri enzimleri tarafından indirgenen sarı renkli MTT maddesi mor renkli suda çözünmeyen kristallere dönüşmektedir (Şekil 3.3.1.). Meydana gelen kristallerin üzerine DMSO eklenmekte ve 492 nm'de absorbanslar belirlenmektedir. Belirlenen absorbanslara göre % hücre canlılıkları ve hücrelerin % 50'sinin canlı kaldığı doz (IC_{50}) değerleri hesaplanmaktadır.



Şekil 3.3.1. MTT' nin Formazana Dönüşümü [99].

Bu çalışma kapsamında naringinin kemoterapi ilacından önce, ilaç ile aynı anda ve kemoterapi ilacından sonra uygulamasının bu ilaçlar üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amacı ile MTT yöntemi iki aşamada uygulanmıştır. İlk olarak Tablo 3.3'te verilen 2. 3. ve 4. grupların yani maddelerin tek başına uygulamalarının MTT testleri yapılmıştır. İkinci aşamada ise ilk aşamada elde edilen konsantrasyonlara bağlı olarak yine Tablo 3.3'te verilen 5-11. grupların yani maddelin kombine halde uygulamalarının MTT testleri yapılmıştır.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan uygulama grupları;

1. grup:	Kontrol,
2. grup:	Naringin,
3. grup:	Doksorubisin,
4. grup:	Sisplatin,
5. grup:	Önce naringin ardından doksorubisin,
6. grup	Önce naringin ardından sisplatin,
7. grup:	Önce sisplatin ardından naringin,
8. grup:	Önce doksorubisin- ardından naringin,
9. grup:	Aynı anda naringin- sisplatin,
10. grup:	Aynı anda naringin- doksorubisin,
11. grup:	Aynı anda naringin- sisplatin-doksorubisin

3.3.1.1. Tek Olarak Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatin Maddelerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak tüm maddelerin IC_{50} değerlerinin belirlenmesi için hücreler her bir kuyucukta $1x10^5$ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 180 µL ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılarak hücrelerin plakalara yapışması beklenmiştir. Hücrelerin yapışmasının ardından maddeler tek başlarına 8 tekrarlı olacak şekilde uygulanarak IC_{50} değerleri belirlenmiştir.

Naringin (Sigma-71162) içerisinde %0.1 DMSO olacak şekilde steril suda çözülmüştür. Ardından son konsantrasyonlar 1.56 µM, 3.125 µM, 6.25 µM, 12.5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM ve 800 µM olacak şekilde her bir kuyucuğa 20 µL uygulanmıştır.

Doksorubisin (Koçak Farma) (10mg/5mL) konsantrasyonda bulunan stok şişesinden steril su ile sulandırılarak son konsantrasyonları 0.39 µM, 0.78 µM, 1.56 µM, 3.125 µM, 6.25 µM, 12.5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM olacak şekilde her bir kuyucuğa 20 µl uygulanmıştır.

Sisplatin (Koçak Farma) (10mg/20mL) konsantrasyonda bulunan stok şişesinden steril su ile sulandırılarak son konsantrasyonları 0.09 µM, 0.19 µM, 0.39 µM, 0.78 µM, 1.56 µM, 3.125 µM, 6.25 µM, 12.5 µM, 25 µM, 50 µM olacak şekilde her bir kuyucuğa 20 µl uygulanmıştır.

Naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarından 24 ve 48 saat sonra her bir kuyuya 20 µL MTT solüsyonu (5mg/mL) eklenmiş 2-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda plakalardaki sıvı uzaklaştırılıp plakanın her bir kuyusuna 200 µL DMSO eklenerek mikroplaka okuyucu cihazda (Thermo Scientific Multiskan Go) 492 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir. Belirlenen absorbans değerlerine göre % hücre canlılıkları ve hücrelerin % 50'sinin canlı kaldığı doz (IC_{50}) değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

% Hücre Canlılığı: Örnek absorbans değeri / Kontrol absorbans değeri * 100

Elde edilen verilere göre;

Naringin için IC_{50} değeri 112 µM, Doksorubisin için IC_{50} değeri 6.431 µM (6.25 µM olarak değerlendirmeye alınmıştır), Sisplatin için ise IC_{50} değeri 7.135 µM (7 µM olarak değerlendirmeye alınmıştır).

Bu çalışma sonucunda elde edilen IC_{50} değerleri ikinci aşamada kullanılmıştır.

3.3.1.2. Kombine Halde Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatin Maddelerinin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmada tek olarak uygulanan ve IC_{50} değerleri belirlenen maddelerin kombine halde uygulandığındaki etkilerinin belirlenmesi amacı ile ikinci kez MTT testleri yapılmıştır. Bu MTT testlerinde Tablo 3.4.'te verilen 5-11 arası gruplar için IC_{50} değerleri belirlenmiştir.

Bu aşamada Naringin için belirlenen IC_{50} dozu 112 µM 96'lı plaklara kontrol grubu hariç tüm kuyucuklara 8 tekrarlı olacak şekilde uygulanmış ve 6 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda doksorubisin için bir önceki bölümde belirlenen IC_{50} değerinden (6,25 µM) başlanılarak 3.125 µM, 1.57 µM, 0.78 µM, 0.39 µM, 0.19 µM 0.097 µM, 0.048 µM, 0.024 µM, 0.012 µM konsantrasyonlarında uygulama yapılmıştır (Toplam 10 doz ve 1 Kontrol). Sisplatin için ise bir önceki bölümde belirlenen IC_{50} değerinden (7 µM) başlanılarak 3.5 µM, 1.75 µM, 0.875 µM, 0.437 µM, 0.218 µM, 0.109 µM, 0.054 µM, 0.027 µM, 0.013 µM konsantrasyonlarında yapılmıştır (Toplam 10 doz ve 1 kontrol).

Naringinin sonra yapıldığı uygulamalarda, sisplatinin belirlenen 7 µM IC_{50} değerinden başlanarak 3.5 µM, 1.75 µM, 0.875 µM, 0.437 µM, 0.218 µM, 0.109 µM, 0.054 µM, 0.027 µM, 0.013 µM ve doksorubisinin belirlenen 6.25 µM IC_{50} değerinden başlanılarak 3.125 µM, 1.57 µM, 0.78 µM, 0.39 µM, 0.19 µM 0.097 µM, 0.048 µM, 0.024 µM, 0.012 µM dozlarının uygulamaları yapılmış (Toplam 10 doz ve 1 Kontrol) ve 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra naringinin belirlenen 112 µM IC_{50} dozu uygulanarak 6 saat bekletilmiştir.

Kemoterapi ajanları ve naringinin aynı anda uygulamalarının yapıldığı gruplarda ise, naringinin belirlenen 112 µM IC_{50} dozu sabit tutularak, sisplatin belirlenen 7 µM IC_{50} değerinden başlanarak 3.5 µM, 1.75 µM, 0.875 µM, 0.437 µM, 0.218 µM, 0.109 µM, 0.054 µM, 0.027 µM, 0.013 µM ve doksorubisinin belirlenen

6,25 µM IC_{50} değerinden başlanılarak 3.125 µM, 1.57 µM, 0.78 µM, 0.39 µM, 0.19 µM 0.097 µM, 0.048 µM, 0.024 µM, 0.012 µM dozlarının uygulamaları aynı anda yapılmıştır (Toplam 10 doz ve 1 Kontrol). Uygulamalar bittikten sonra MTT yöntemi için 20 µL MTT solüsyonu eklenmiş (5mg/mL) ve 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonunda mikroplaka okuyucuda absorbans değerleri belirlenerek daha önce belirtilen formüle göre % hücre canlılıkları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

Bu değerlere göre IC_{50} değerine bağlı olarak çalışmada uygulanacak ilaç konsantrasyonları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

Önce Naringin ardından Doksorubisin uygulaması: 112 µM Naringin, 0.341 µM Doksorubisin

Önce Naringin ardından Sisplatin uygulaması: 112 µM Naringin, 0.023 µM Sisplatin

Önce Sisplatin ardından Naringin uygulaması: 0.499 µM Sisplatin, 112 µM Naringin

Önce Doksorubisin ardından Naringin uygulaması: 0.075 µM Doksorubisin, 112 µM Naringin

Aynı anda Naringin-Sisplatin uygulaması: 1.481 µM Sisplatin, 112 µM Naringin

Aynı anda Naringin-Doksorubisin uygulaması: 0.306 µM Doksorubisin, 112 µM Naringin.

Aynı anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin uygulaması: 112 µM Naringin, 0.473 µM Doksorubisin ve 0.533 µM Sisplatin bulunmuştur.

Naringin, doksorubisin ve sisplatinin kombine uygulamalarında yukarıda belirlenen konsantrasyonlar bu aşamadan sonra sağlıklı astrosit hücre serilerine de ugulanarak maddelerin sağlıklı hücrelerdeki etkileri de belirlenmiştir.

3.4. TALİ Görüntü Tabanlı Sitometre ile Apoptoz Tayini

Apoptoz, çekirdek kromatinin sıkıştırılması ve parçalanması, sitoplazmanın büzüşmesi ve membran asimetrisinin kaybı da dahil olmak üzere, karakteristik, morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle nekrozdan ayırt edilir. Sağlıklı hücrelerde fosfatidilserin (PS) hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunur. İnsan antikoagülanı olan Anneksin V, PS için yüksek afiniteye sahip 35-36 kDa büyüklüğünde olan Ca^{+2}'ye bağlı bir fosfolipid bağlama proteinidir. Bir fluorofor veya biotin ile etiketlenmiş Annexin V, PS'ye bağlanarak apoptotik hücreleri tanımlayabilir [100, 101, 102].

Propidyum iyodür (PI), nekrotik hücrelerin tanımlanması için kullanılan, bir hücreye bulaşan ve flüorojenik DNA bağlama boyasıdır. PI canlı hücrelere karşı geçirimsizdir, ancak nükleik asitlere bağlandığında ölü hücrelere kolayca girer ve flüoresan hale gelir. Annexin V ve PI boyalarının bu özellikleri kullanılarak hücrelerin canlı, ölü ve apoptotik durumları belirlenebilmektedir. Bunun için kullandığımız Tali® Apoptoz Test Kiti-Annexin V Alexa Fluor® 488 ve Propidium Iodide kit ile boyanan apoptotik hücreler yeşil floresan, ölü hücreler kırmızı floresan vermekte ve sayıları belirlenmektedir.

Çalışmamızda madde uygulamalarının canlı, ölü ve apoptotik hücre sayıları üzerine etkilerinin belirlenmesinde Tali Apoptosis Kit–Annexin V Alexa Flour 488 ve Propodium Iodide (Cat. No. A 10788) kullanılmıştır. TALİ testi için N1E-115 nöroblastom ve C8-D1A astrosit hücreleri 24 kuyucuklu plakalara (NEST) ekilmiştir. Her bir kuyucuk içine $4x10^3$ hücre 2 tekrarlı olarak MTT sonucunda belirlenen IC_{50} dozlarında uygulama yapılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kullanılan kitte belirlenen protokole göre aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

- Uygulama süresinin bitiminde hücreler tripsinle muamele edilip plaka tabanından uzaklaştırılmıştır.
- Tripsinli hücreler ependorf tüplere (1.5 mL'lik) alınarak 700 g'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda üstteki supernatant uzaklaştırılmıştır.
- Üstteki supernatant uzaklaştırıldıktan sonra üzerine kit içerisinde bulunan 5X'lik Annexing Binding Buffer (ABB) 5 kat seyreltilerek 1X yapılmış ve bu 1X'lik ABB'den 200 µL eklenmiştir. Ardından 10 µL Annexin V Alexa Flour koyularak vortekslenmiş ve 20 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.

- İnkübasyon sonunda, 750 g’ de 2 dakika santrifüj edilerek üstteki supernatant uzaklaştırılmıştır.
- Altta kalan kısım üzerine, 100 µL Annexing Binding Buffer eklenerek vortekslenmiştir.
- Vorteks işleminden sonra 1 µL Tali Propidium Ioidide eklenmiş ve tekrar vortex işlemi yapılarak 1-5 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra Tali Apoptosis cihazında (Şekil 3.4.) okumaları yapılmıştır.



Şekil 3.4. Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Cihazı

3.5. RNA İzolasyonu

Gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacı ile kontrol ve doza bağlı uygulamaların yapıldığı gruplardan RNA izolasyonu için ilk olarak nöroblastom ve astrosit hücreleri $3x10^6$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekilmiş ve MTT testi ile belirlenen IC_{50} değerleri uygulanmıştır. Uygulama sonucu elde edilen hücrelerden toplam RNA izolasyonu kit (Ambion by life Technologies) kullanılarak izole edilmiştir. Kit yöntemine göre aşağıda belirtilen aşamalarda izolasyon gerçekleştirilmiştir.

- İnkübasyon bitiminde 6'lık hücre kültürü plakalarının üzerlerindeki sıvı uzaklaştırılarak üzerlerine 500 µL olacak şekilde %1 merkaptoetanol içeren lizis tamponu ilave edilmiş ve bir süre bekletildikten sonra, ependorf tüplere (1.5 mL'lik) alınmıştır,

- Üstteki homojenattan 400 µL alınıp ependorf tüplerine konulmuş, üzerine 400 µL %70'lik etanol kullanılarak vortekslenmiştir.
- Elde edilen karışım, kitte bulunan kolonlu tüplere aktarılarak 12.000 g'de 15 saniye (sn) santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Kolon üzerine kit içerisinde bulunan yıkama tamponu 1'den 700 µL ilave edilerek 12.000 g'de 15 sn santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı yine uzaklaştırılmıştır.
- Kolon üzerine 500 µL kit içerisinde bulunan yıkama tamponu 2'den ilave edilerek 12.000 g'de 15 sn santrifüj edilmiş ve altta kalan sıvı uzaklaştırılmıştır (Bu işlem 2 sefer yapılmıştır).
- Kolon kurutma amacı ile boş olarak 12.000 g'de 1-2 dk santrifüj edilmiş, alttaki tüp atılarak yeni bir kapaklı tüp konulmuştur.
- Kolonun tam ortasına 60 µL RNaz içermeyen su pipetlenmiş ve 2 dakika inkübe edildikten sonra 2.30 dakika 12.000 g'de santrifüj edilmiştir.

Elde edilen RNA örneklerinden, 2 µL alınarak Nanodrop cihazı (NaNoQ OPTIZEN) üzerine pipetlenip 260-280 nm'de okunmuş, miktar ve saflık değerleri belirlenmiştir.

3.6. Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi, izole edilen RNA'lardan High-Capacity cDNA Reverse Transcription sentez kiti (Cat No: 4368814) ile uygun protokol adımları yapılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.6.). Sentezlenen cDNA'lar, -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.6. cDNA sentez protokolü

Madde	**Hacim**
Total RNA	10
10 X RT tampon	2 µL
25 X dNTP mix (100 mM)	0.8 µL
10 X RT Random Primer	2 µL
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1 µL
Nukleaz free su	4.2 µL
Son hacim	20 µL

3.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Çalışmamızda 384 kuyucuklu mikroplaka okuyabilen Quant Studio 6 Flex qRT-PCR sistemi kullanılmıştır. Endojen gen olarak GAPDH kullanılmış ve örnekler analize alınmıştır.

Quant Studio 6 Flex gerçek zamanlı bir PCR cihazı olup, örneklerdeki değişimleri eş zamanlı görebilmeyi sağlamaktadır. 384 örnek çalışılan cihazda yapılan işlemler yaklaşık iki saat içerisinde sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda genlerin ekspresyon düzeylerinin tayini için SYBR Green yöntemi kullanılmıştır. SYBR Green uzun süre etkisini sürdüren oldukça dayanıklı bir boyadır. qRT-PCR karışımı; cDNA, SYBR Green ve ilgili genleri içermektedir. SYBR Green boyası cDNA ve genlere bağlanarak reaksiyonun başlamasını sağlar. Reaksiyon eş zamanlı olarak bilgisayar ekranında görüntülenir.

Kontrol grubu ve belirlenen dozlardaki gruplar (Tablo 3.3.) arasındaki genlerin değişimleri qRT-PCR ile belirlenmiştir. qRT-PCR reaksiyonu karışımının içeriği, 384 kuyucuklu plakanın her bir kuyusu için 6 µl SYBR Green Master Mix, 2 µl cDNA ve 2 µl RNaz free su ve primer forward 0,5 µl, reverse 0,5 µl olacak şeklinde plakalara pipetlenmiştir (Tablo 3.7.1.).

Tablo 3.7.1. qRT-PCR Karışım İçeriği

384' lü plakanın her bir kuyusu için	
Sybr Green Master Mix	**6 µL**
cDNA	**2 µL**
RNaz free su	**2 µL**
F Primer	**0.5 µL**
R Primer	**0.5 µL**
Son Hacim	**11 µL**

Çalışmada kullanılan primerlerin baz dizileri Tablo 3.7.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.7.2. qRT-PCR' da Kullanılan Genler ve Sekansları

Primer ismi	Baz dizisi
p53	F: CACGAGCGCTGCTCAGATAGC R: ACAGGCACAAACACGCACAAA
Kaspaz-3	F: GGTATTGAGACAGACAGTGG R: CATGGGATCTGTTTCTTTGC
Kaspaz-9	F: GAGTCAGGCTCTTCCTTTG R: CCTCAAACTCTCAAGAGCAC
Sitokrom-c	F: AGTGGCTAGAGTGGTCATTCATTTACA R: TCATGATCTGAATTCTGGTGTATGAGA
Bax	F: TTCATCCAGGATCGAGCAGA R: GCAAAGTAGAAGGCAACG
Bcl-2	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA R: ACAGTTCCACAAAGGCATCC
Tümör Nekroz Faktör Alfa	F: TCAGCCTCTTCTCC R:TCAGCTTGAGGGTT
P21 ^{cip1}	F: GGCGTTTGGAGTAGAAA R: GACTCTCAGGGTCGAAAACG
P27 ^{kip1}	F: CCGGCTAACTCTGAGGACAC R: TTGCAGCTCCCTTCCTTATT

qRT-PCR program: 1 döngü 2 dakika 50ºC ve 10 dakika 95ºC, bunu takiben, 50 döngü denaturasyon (95ºC 15 sn) ve annelling ve uzatma (60ºC 'de 1 dakika) ile çoğaltılmıştır. qRT-PCR sonucu elde edilen veriler kontrol olarak kullanılan GADPH'a göre normalize edilmiştir (Doğanlar ve Doğanlar, 2014).

Çalışmada ekspresyonları analiz edilen genlerden oluşan plaka Tablo 3.7.3.' de belirtilmiştir.

Tablo 3.7.3. Çalışmada Kullanılan Genlerin Plaka Dizaynı

Kontrol	**Nar**	**Dox**	**Sis**	**Nar-Dox**	**Nar-Sis**	**Sis-Nar**	**Dox-Nar**	**NS**	**ND**	**NSD**
GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH
β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin	β-aktin
p53	p53	p53	p53	p53	p53	p53	p53	p53	p53	p53
Cyc-c	Cyc-c	Cyc-c	Cyc-c	Cyc-c	Cyc-c	Cyc-c	Cyc-c	Cyc-c	Cyc-c	Cyc-c
Kaspaz3	Kaspaz3	Kaspaz3	Kaspaz3	Kaspaz3	Kaspaz3	Kaspaz3	Kaspaz3	Kaspaz3	Kaspaz3	Kaspaz3
Bax	Bax	Bax	Bax	Bax	Bax	Bax	Bax	Bax	Bax	Bax
Bcl-2	Bcl-2	Bcl-2	Bcl-2	Bcl-2	Bcl-2	Bcl-2	Bcl-2	Bcl-2	Bcl-2	Bcl-2
Tnf-α	Tnf-α	Tnf-α	Tnf-α	Tnf-α	Tnf-α	Tnf-α	Tnf-α	Tnf-α	Tnf-α	Tnf-α
Kaspaz9	Kaspaz9	Kaspaz9	Kaspaz9	Kaspaz9	Kaspaz9	Kaspaz9	Kaspaz9	Kaspaz9	Kaspaz9	Kaspaz9
p-21 ^{cip1}	p-21 ^{cip1}	p-21 ^{cip1}	p-21 ^{cip1}	p-21 ^{cip1}	p-21 ^{cip1}	p-21 ^{cip1}	p-21 ^{cip1}	p-21 ^{cip1}	p-21 ^{cip1}	p-21 ^{cip1}
p-27^{kip1}	p-27^{kip1}	p-27^{kip1}	p-27^{kip1}	p-27^{kip1}	p-27^{kip1}	p-27^{kip1}	p-27^{kip1}	p-27^{kip1}	p-27^{kip1}	p-27^{kip1}

Nar: Naringin, Dox: Doksorubisin, Sis: Sisplatin, Nar-Dox: Önce Naringin Ardından Doksorubisin, Nar-Sis: Önce Naringin Ardından Sisplatin, Sis-Nar: Önce Sisplatin Ardından Naringin, Dox-Nar: Önce Doksorubisin Ardından Naringin, NS: Aynı Anda Naringin-Sisplatin, ND: Aynı Anda Naringin-Doksorubisin, NSD: Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin.

3.8. Verilerin İstatistiksel Olarak Analizi

Real Time PCR çalışmalarında gruplar arasında gen ekspresyon farklarının belirlenmesinde ▲▲Ct metodu ayrıca kalibrosyon eğrisi ve düzeltme faktörü olarak GADPH gen ekspresyonu kullanılmıştır. Kontrol ve deneme gruplarının karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi yapılmış ve ortalamaların girdiği gruplar Duncan Testi ($p \leq 0.05$) ile belirlenmiştir. Yapılan analizlerin tamamında SPSS 20 (üniversite lisanslı), XLSTAT ve PAUP demo version istatistik paket programları kullanılmıştır.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

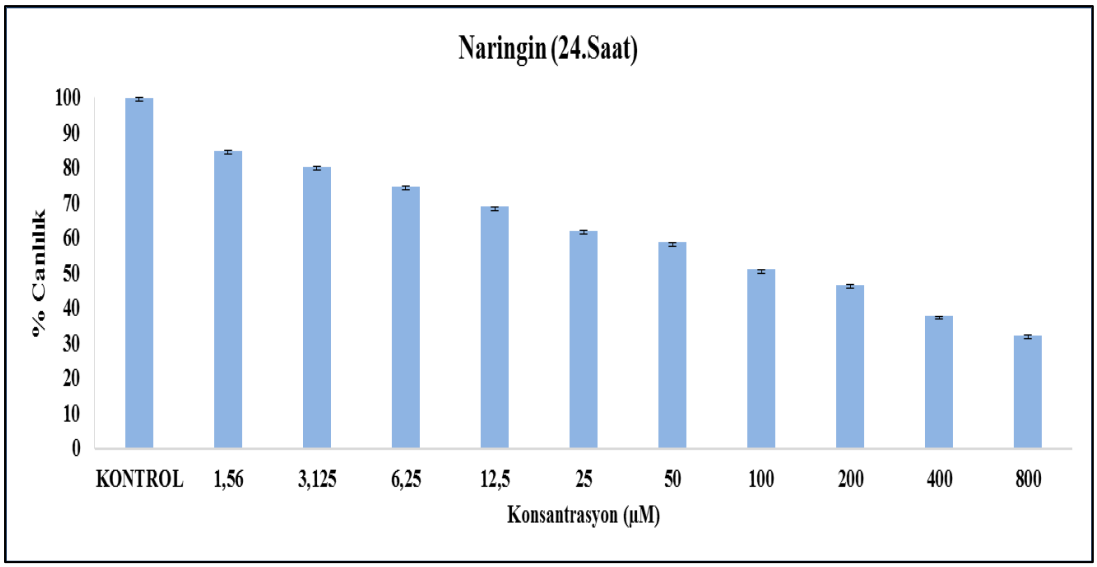
4.1. Tek Olarak Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatinin Maddelerinin IC_{50} Değerleri

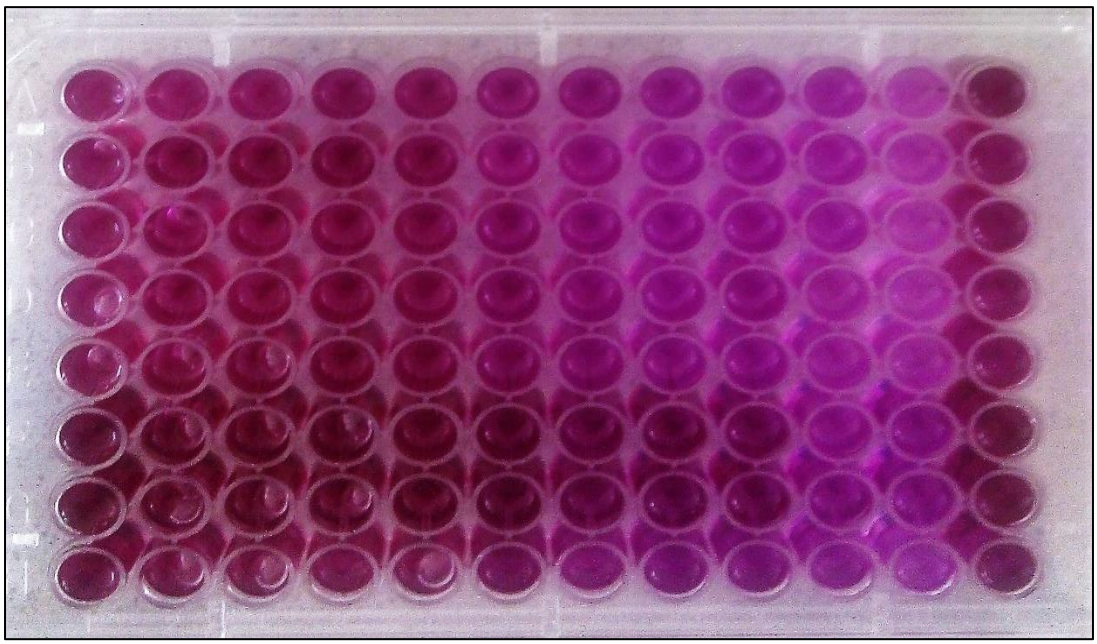
Çalışma kapsamında ilk olarak N1E-115 nöroblastom hücre hatlarında naringin, doksorubisin ve sisplatinin tek olarak uygulamasının 24 ve 48. saatlerde hücre canlılığı üzerine etkisi Materyal ve Yöntem bölümünde açıklandığı şekilde MTT testi ile saptanmıştır.

4.1.1. Naringin

Naringin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 1.56 μM ile 800 μM arasında uygulanan naringinin 24 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 4.1.'de verilmiştir.

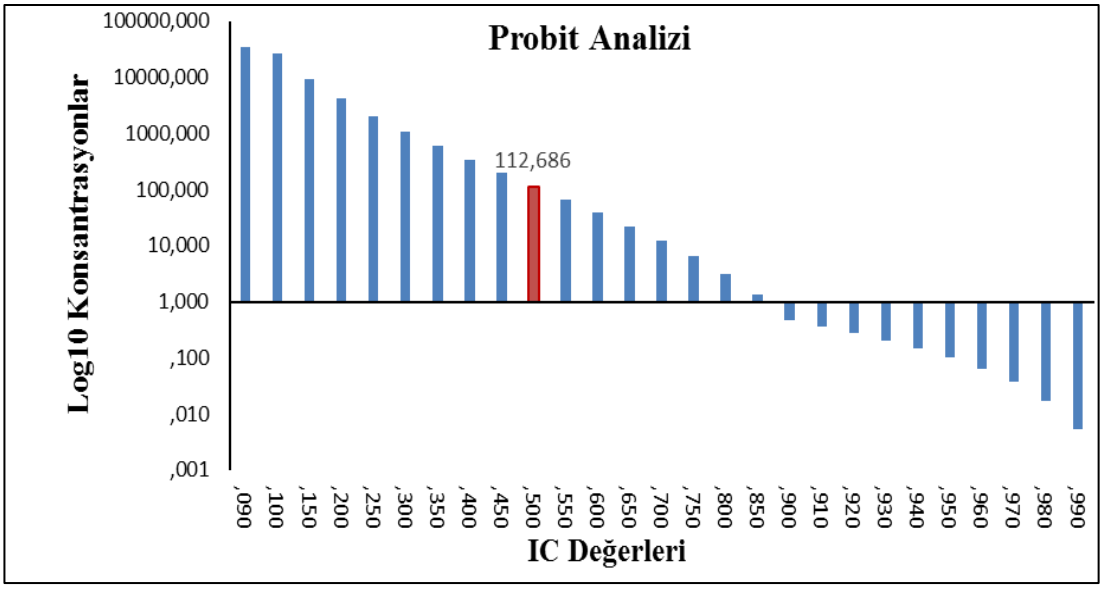
Naringin uygulamasından 24 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F= 736.224$; sd=10-77; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 800 μM konsantrasyonda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %32.1±0.03'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 1.56 μM naringin konsantrasyonunda %84.87±0.02 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1.).





Şekil 4.1. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 24 Saat Süreyle 1.56 µm İle 800 µm Konsantrasyonlarda Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı, Veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma

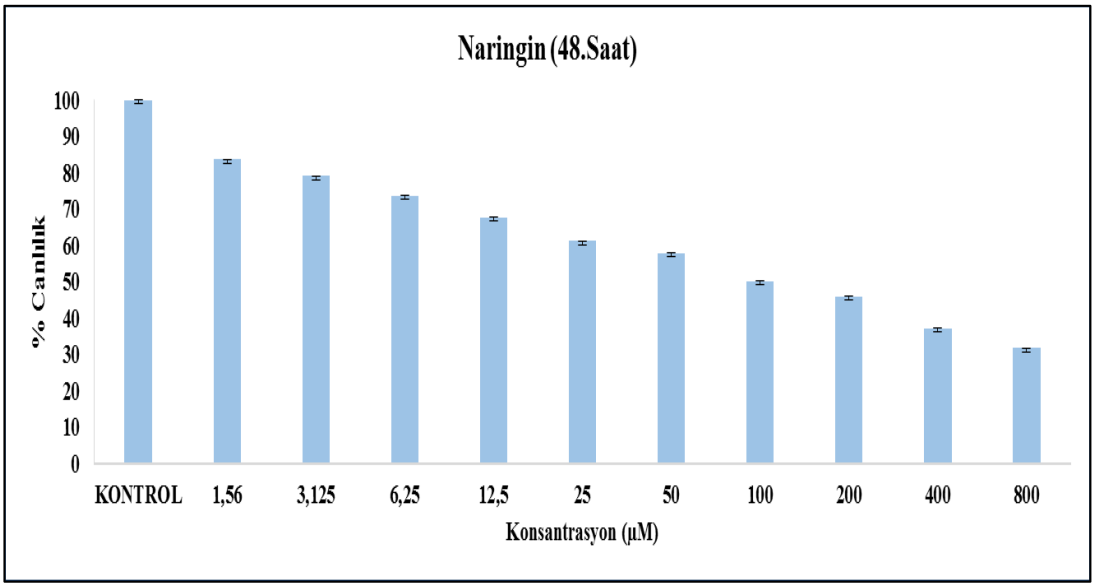
Çalışmada farklı konsantrasyonlarda naringin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 112,686 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2.).

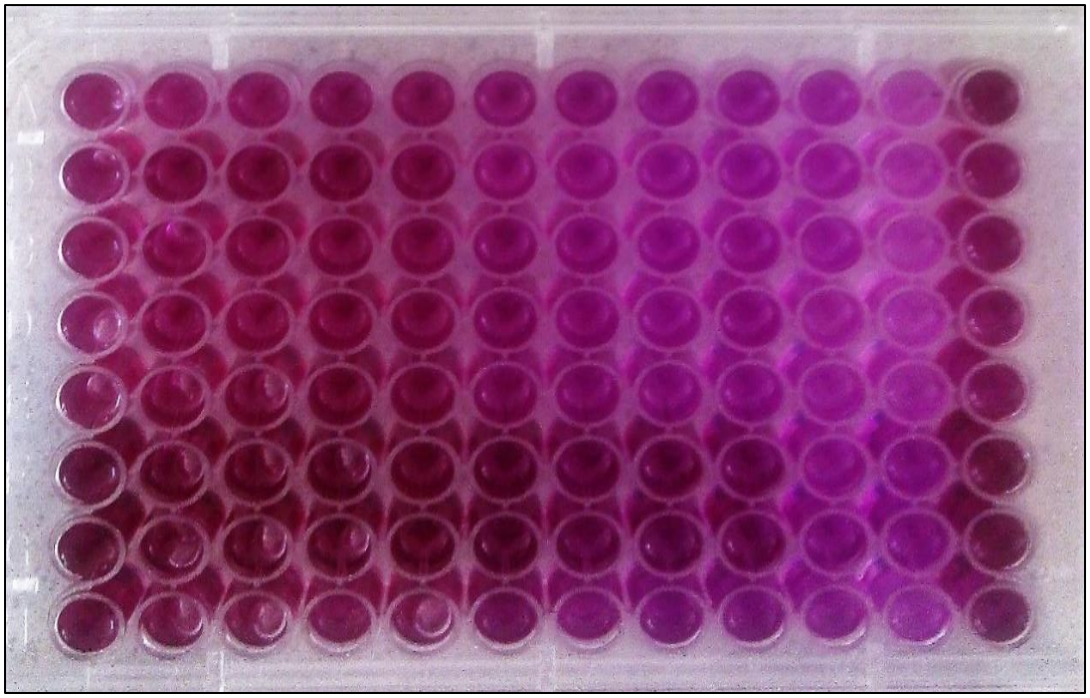


Şekil 4.2. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 24 Saat Süre İle Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri

Tek başına naringin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 1.56 µM ile 800 µM arasında uygulanan naringinin 48 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 4.3.'de verilmiştir.

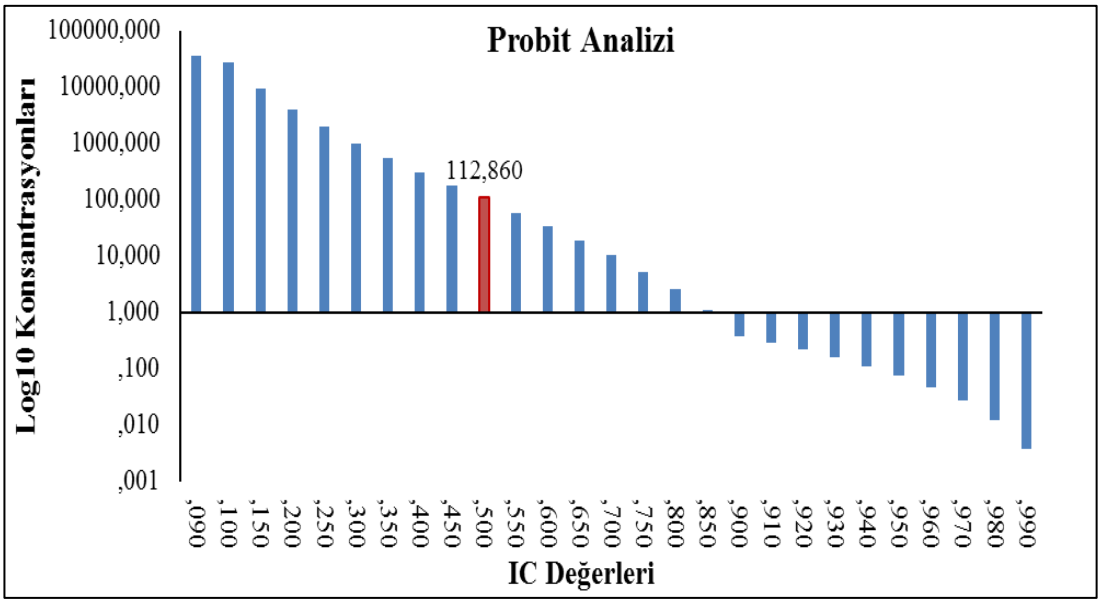
Naringin uygulamasından 48 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F= 802.370$; sd= 10-77; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 800 µM konsantrasyonda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %31.60±0.009'unun canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 1.56 µM naringin konsantrasyonunda %83.58±0.036 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).





Şekil 4.3. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 48 Saat Süreyle 1.56 µm İle 800 Konsantrasyonlarda Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı, Veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma.

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda naringin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 48. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 112.860 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4.).

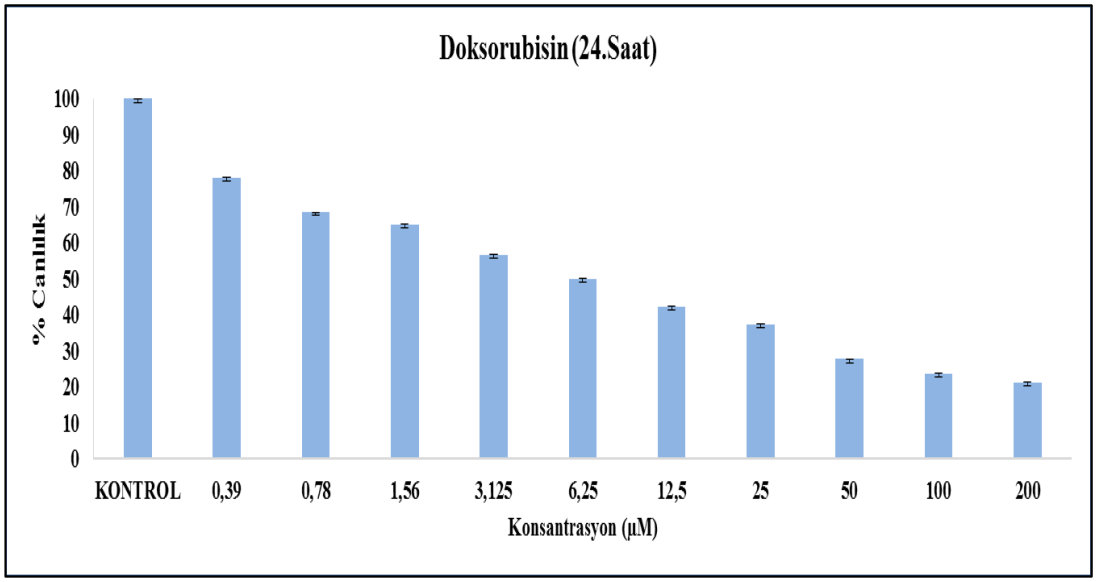


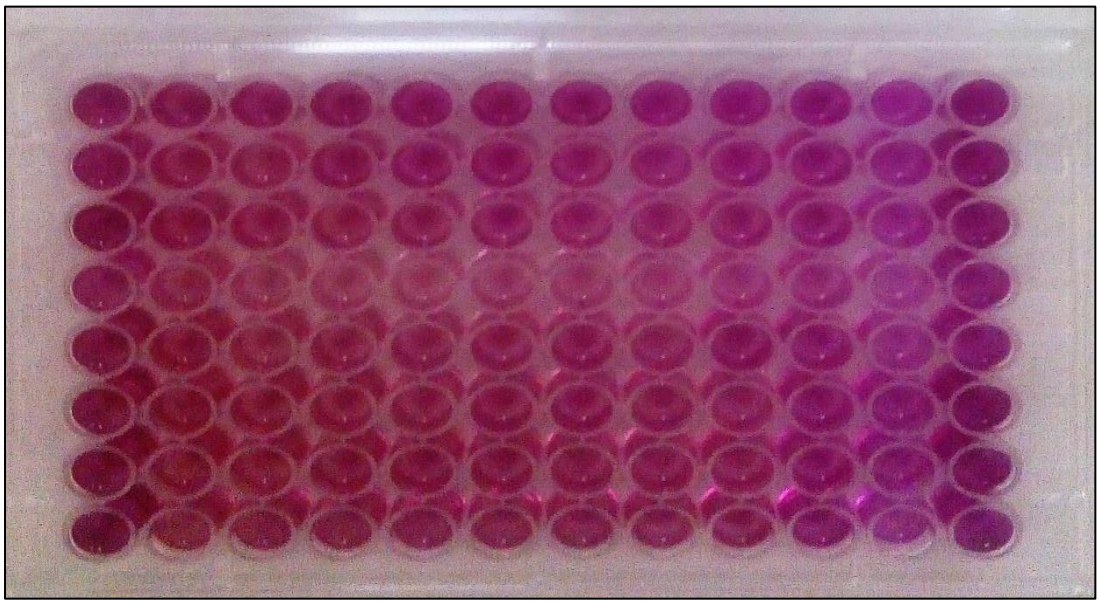
Şekil 4.4. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 48 Saat Süre İle Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri

4.1.2. Doksorubisin

Doksorubisin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 0.39 µM ile 200 µM arasında uygulanan doksorubisinin 24 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 4.5.'de verilmiştir.

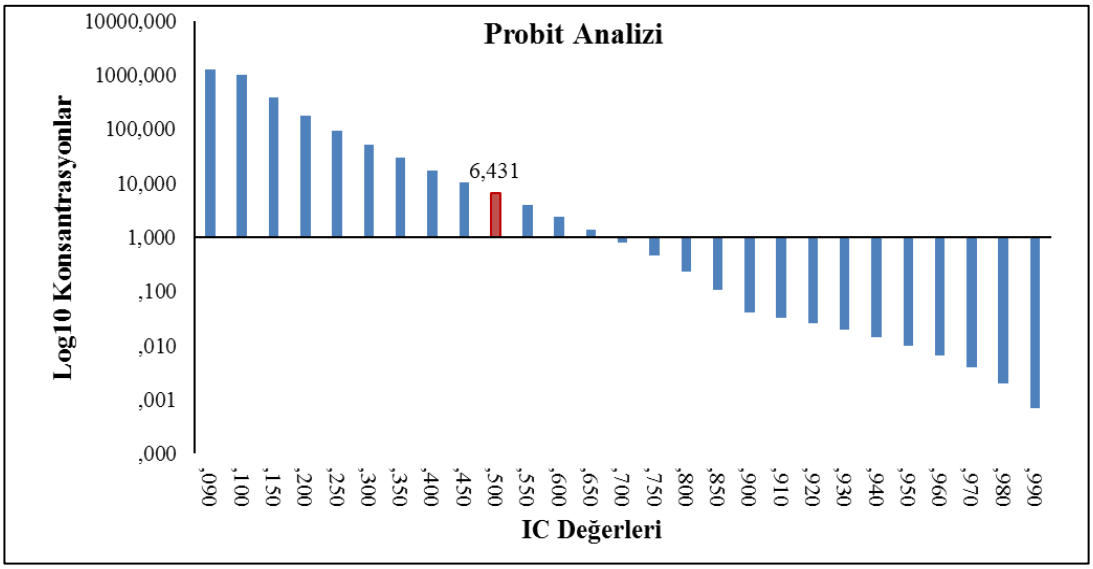
Doksorubisin uygulamasından 24 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F= 277.787$; sd=10-77; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 200 µM konsantrasyonda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %21.35±0.03'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.39 µM doksorubisin konsantrasyonunda %78.07±0.029 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5.).





Şekil 4.5. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 24 Saat Süreyle 0.39 µm İle 200 µm Konsantrasyonlarda Doksorubisin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı, Veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma.

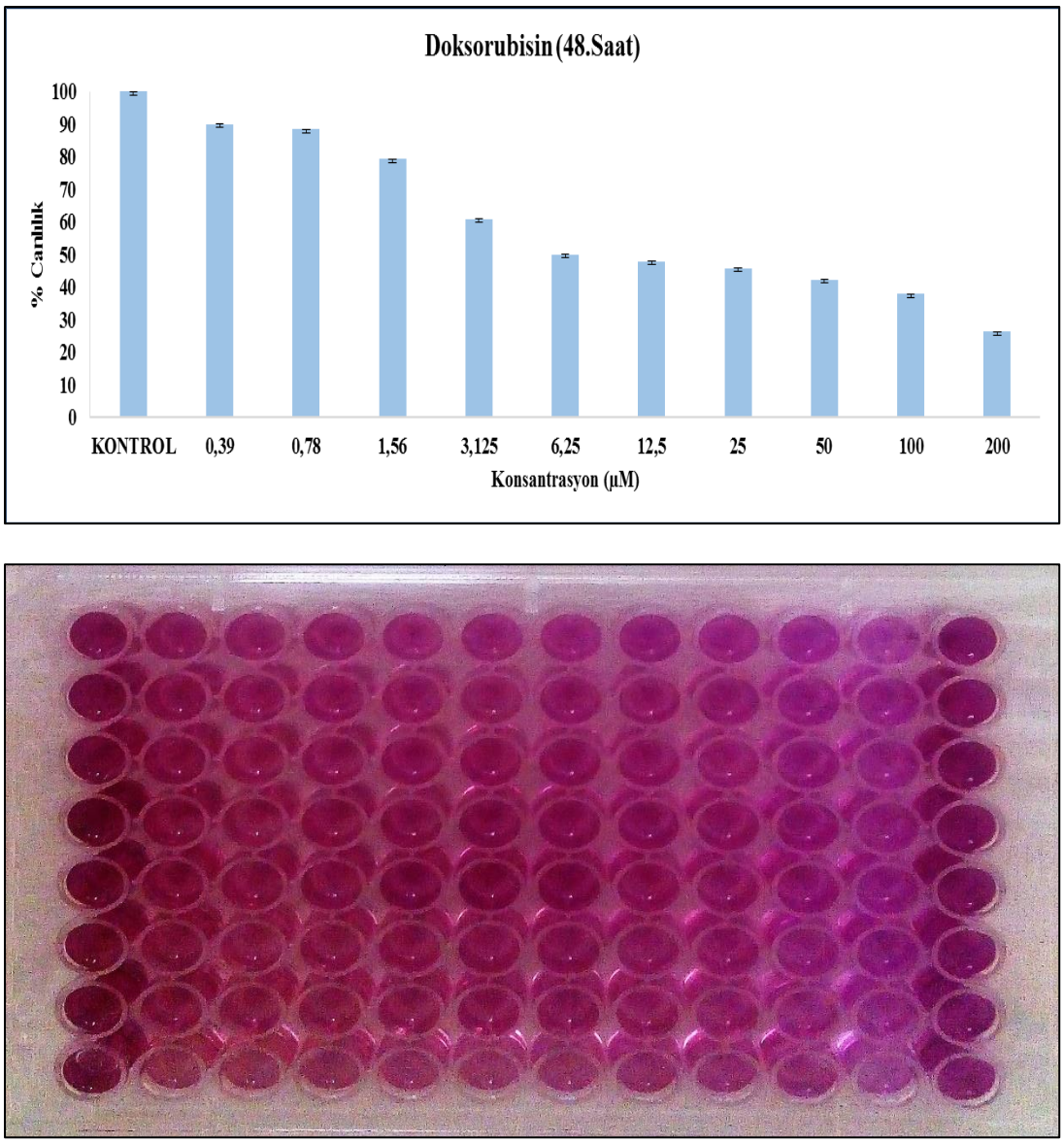
Çalışmada farklı konsantrasyonlarda doksorubisin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 6.431 µM doksorubisin olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 24 Saat Süre İle Doksorubisin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

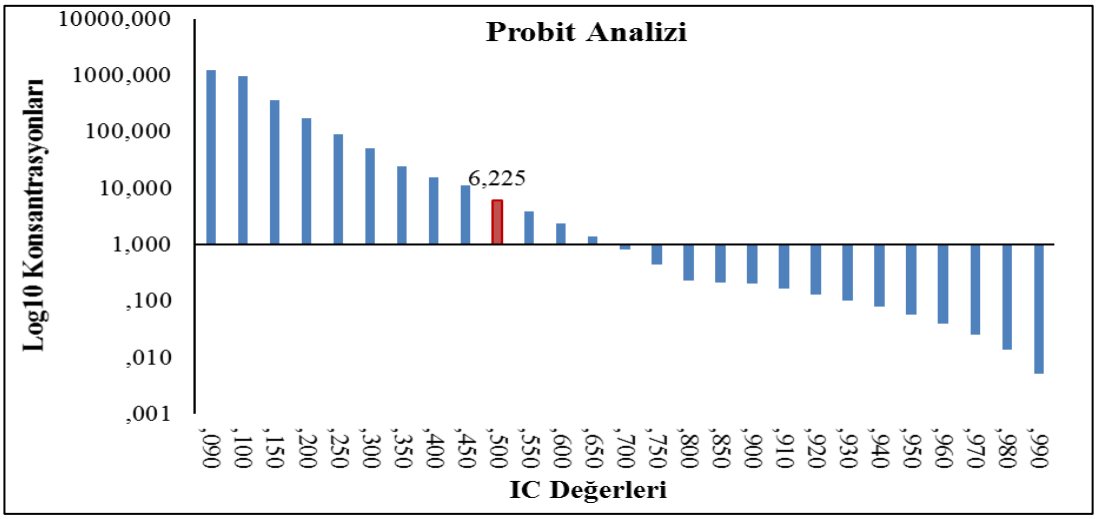
Doksorubisin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 0.39 µM ile 200 µM arasında uygulanan doksorubisinin 48 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 4.7.'de verilmiştir.

Doksorubisin uygulamasından 48 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F= 302.765$; $sd=10\text{-}77$; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 200 µM konsantrasyonda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %26.38±0.03'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.39 µM doksorubisin konsantrasyonunda %90.07±0.029 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 48 Saat Süreyle 0.39 µm İle 200 µm Konsantrasyonlarda Doksorubisin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı, Veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma.

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda doksorubisin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 48. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 6.225 µM doksorubisin olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8.).

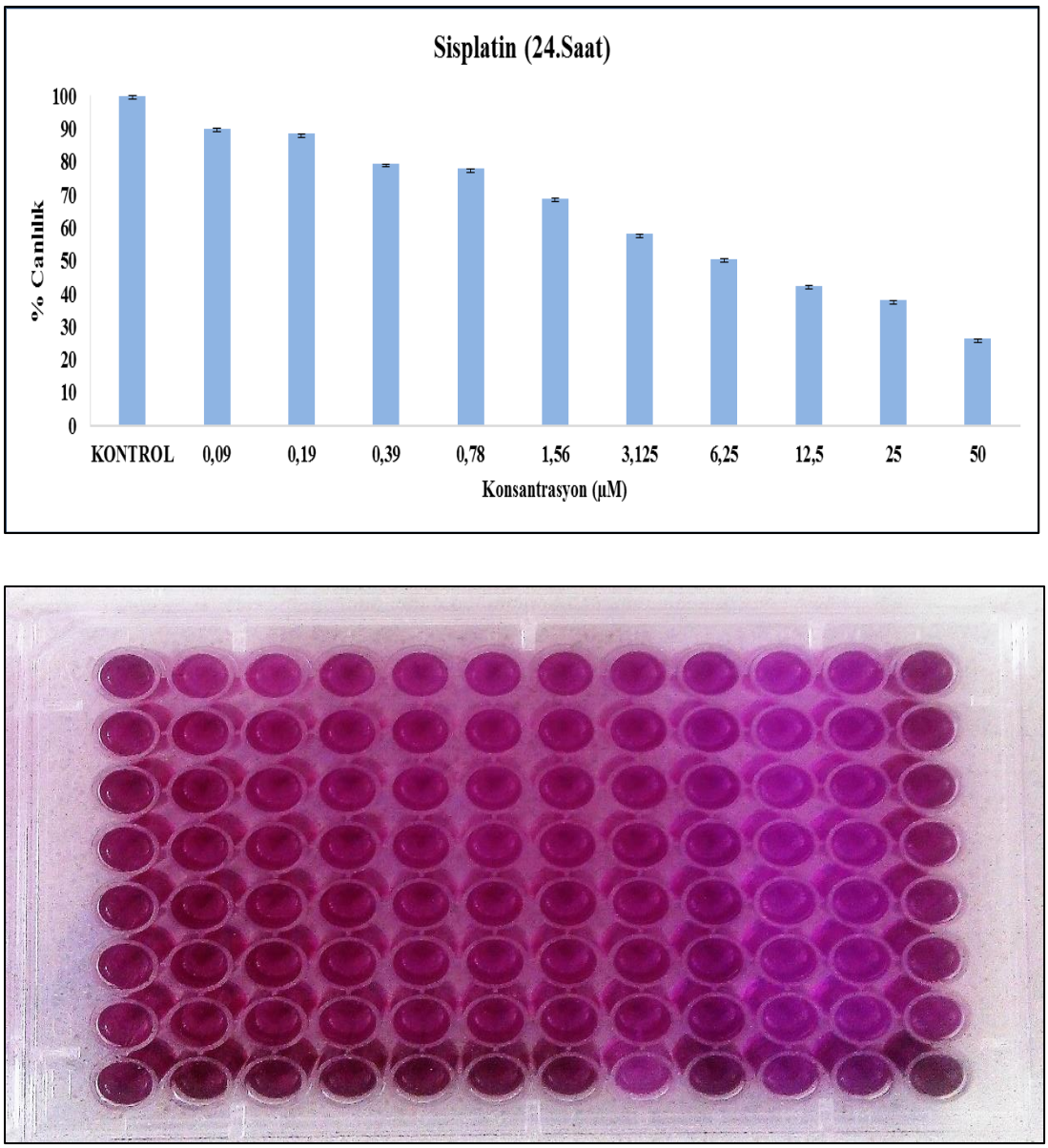


Şekil 4.8. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 48 Saat Süre İle Doksorubisin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

4.1.3. Sisplatin

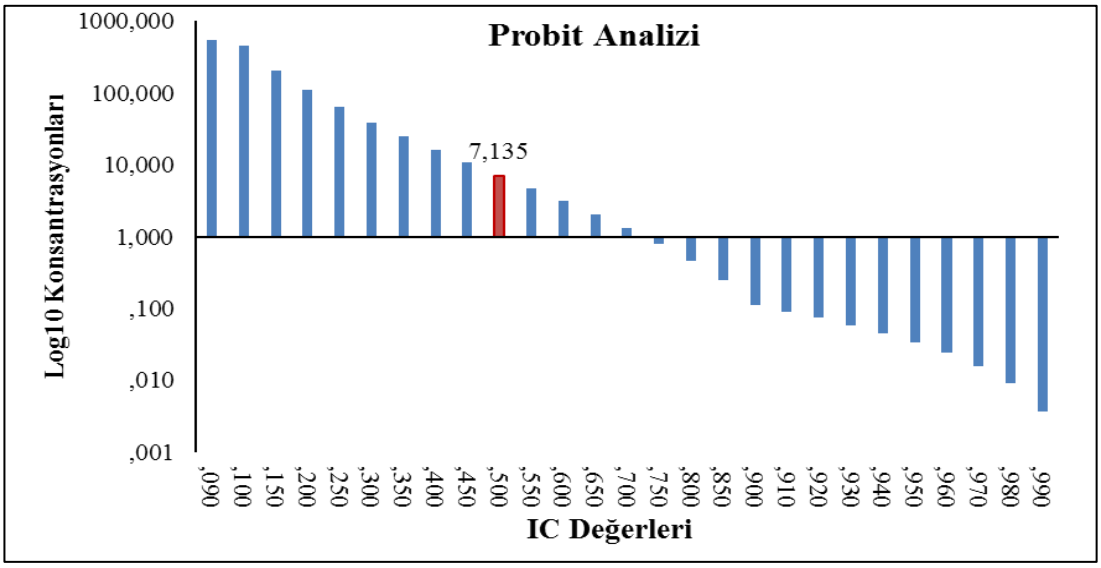
Sisplatin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 0.09 µM ile 50 µM arasında uygulanan sisplatin 24 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 4.9.'da verilmiştir.

Sisplatinin uygulamasından 24 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F= 637.431$; sd=10-77; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 50 µM konsantrasyonda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %26.32±0.03'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.09 µM doksorubisin konsantrasyonunda %90.12±0.029 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 24 Saat Süreyle 0,09 µm İle 50 µm Konsantrasyonlarda Sisplatin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı, Veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma.

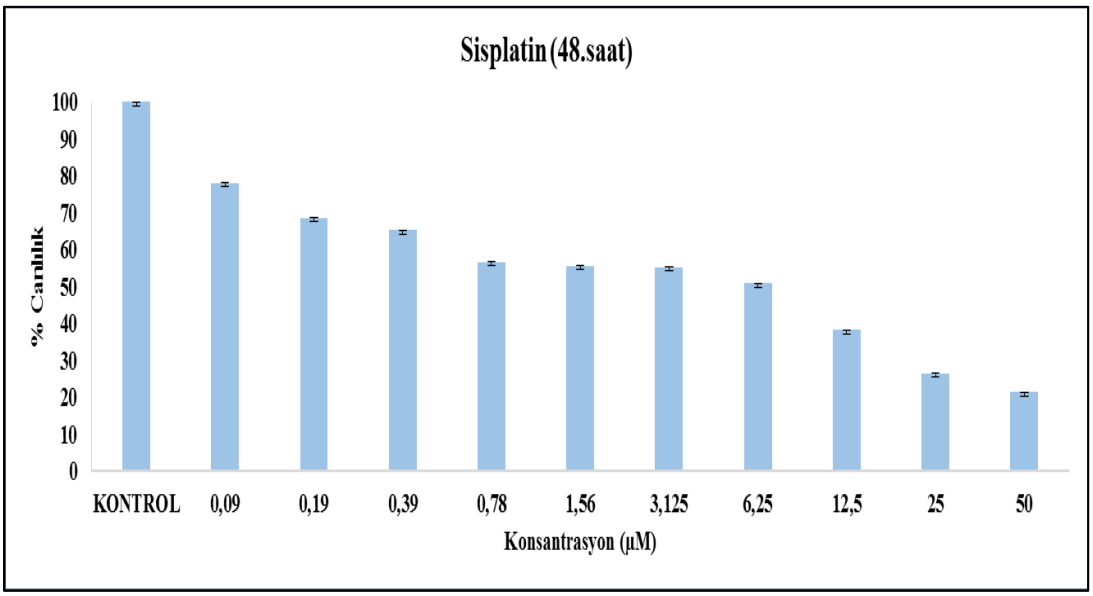
Çalışmada farklı konsantrasyonlarda sisplatin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 7.135 µM sisplatin olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10.).

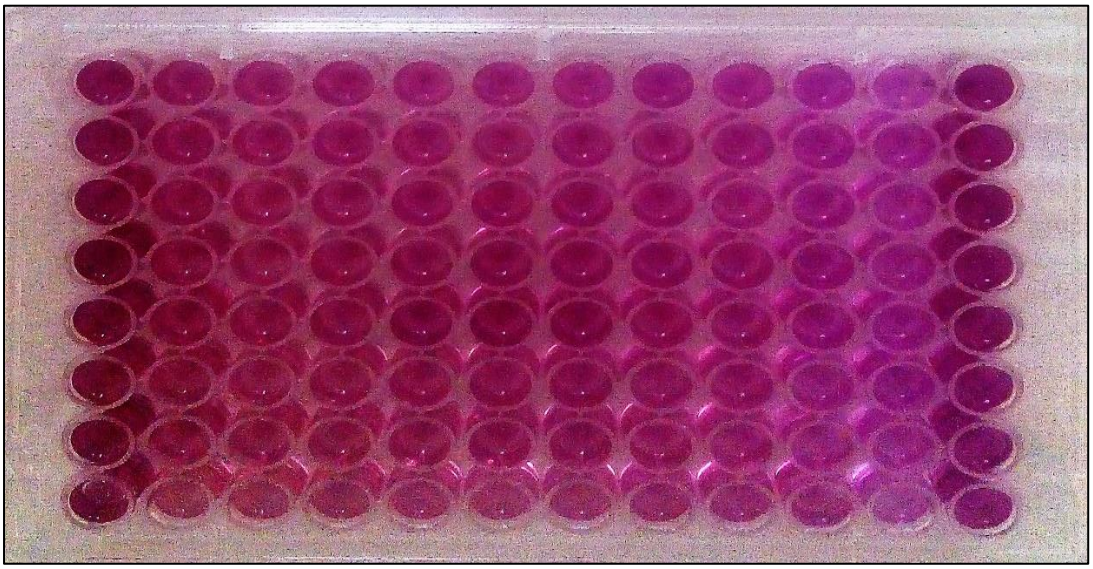


Şekil 4.10. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 24 Saat Süre İle Sisplatin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

Sisplatin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 0.09 µM ile 50 µM arasında uygulanan sisplatinin 48 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 4.11.'de verilmiştir.

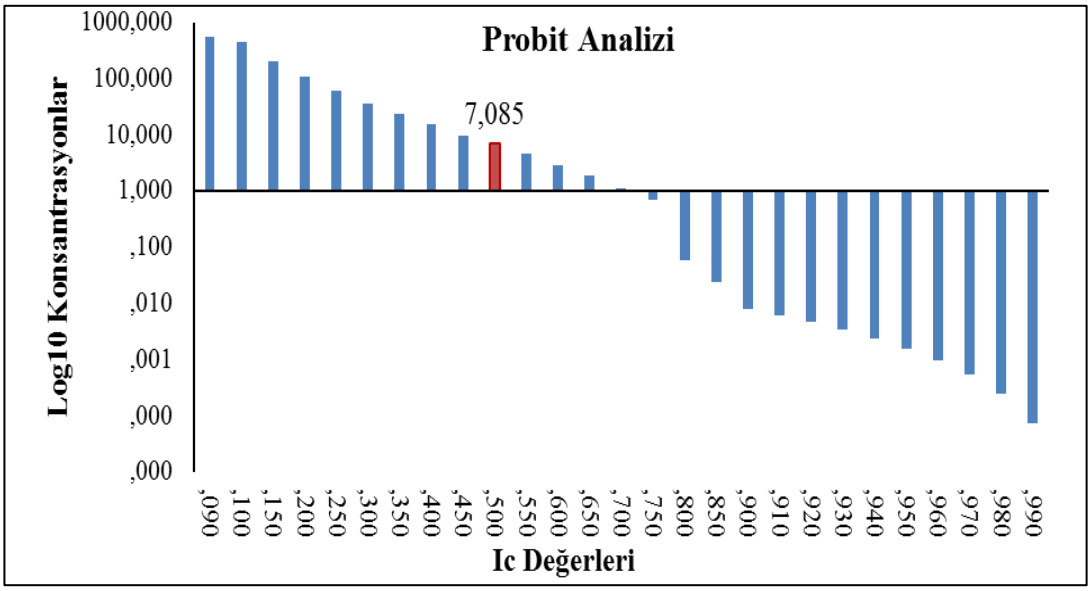
Sisplatin uygulamasından 48 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F= 254.910$; sd=10-77; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 50 µM konsantrasyonda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %21.35±0.03'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.09 µM sisplatin konsantrasyonunda %78.07±0.029 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11.).





Şekil 4.11. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında 48 Saat Süre İle 0.09 µm İle 50 µm Konsantrasyonlarda Sisplatin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı, Veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma.

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda naringin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 48. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 7.085 µM sisplatin olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında 48 Saat Süre İle Sisplatin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

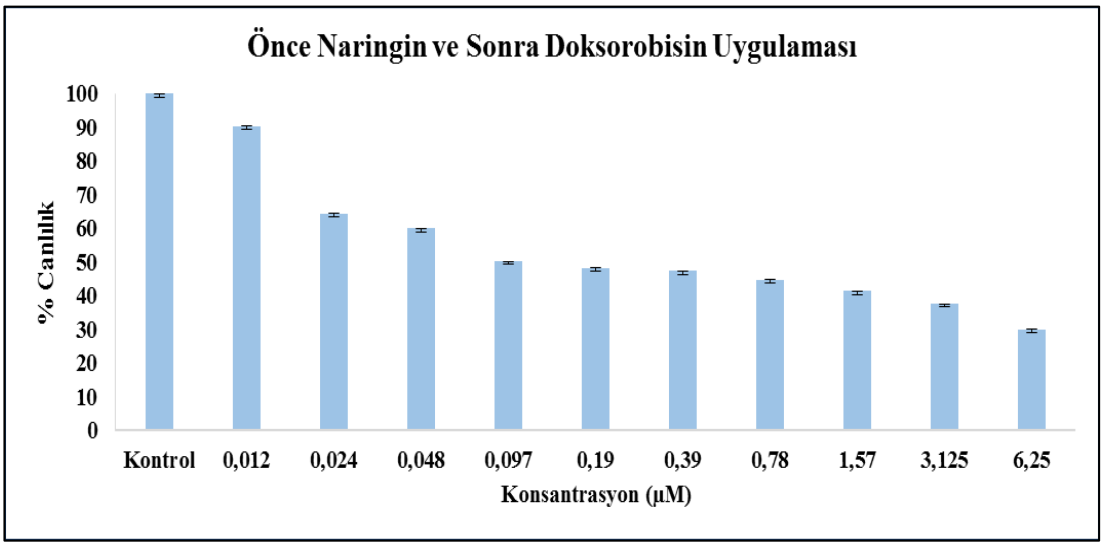
4.2. Kombine Halde Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatin Maddelerinin IC_{50} değerleri

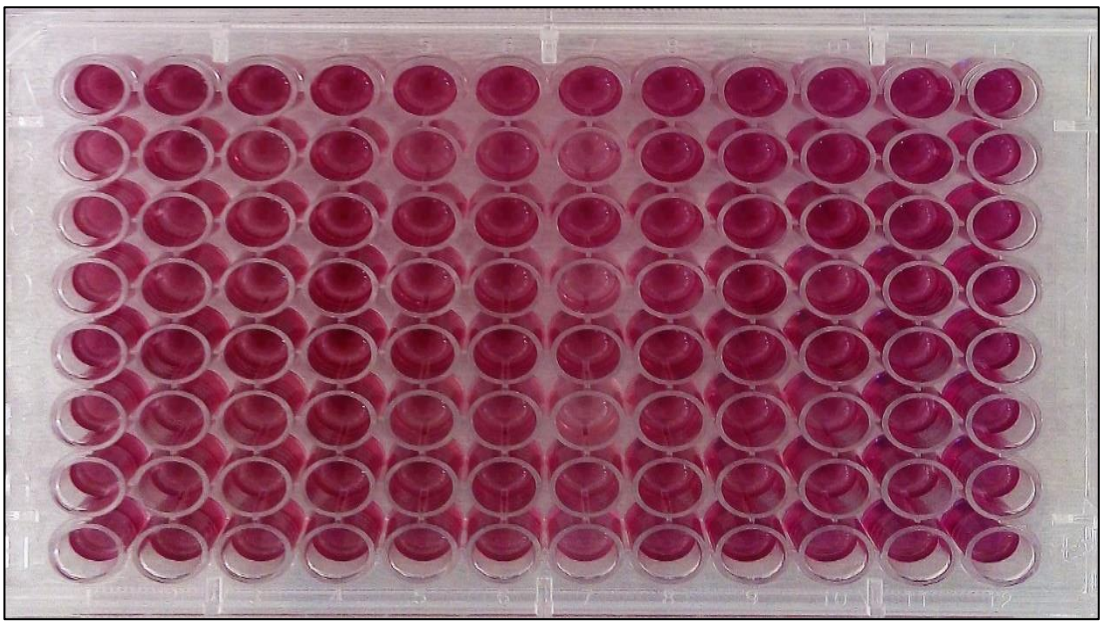
N1E-115 nöroblastom hücre hatlarında naringin, doksorubisin ve sisplatinin tek olarak uygulamasının 24 ve 48. saatlerde hücre canlılığı üzerine etkisi belirlenmiş ve maddelerin tek uygulamalarında 24 ve 48. Saatlerde belirlenen IC_{50} değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmadığı için bundan sonraki tüm çalışmalar 24 saat süre ile yapılmıştır. Materyal ve Yöntem bölümünde de belirtildiği gibi maddelerin tek olarak uygulamalarında elde edilen IC_{50} değerleri kombine olarak uygulamaları için bir ön çalışma olarak değerlendirilmiş ve bu konsantrasyonlar kombine uygulamalarda kullanılmıştır.

4.2.1. Önce Naringin Ardından Doksorubisin

Önce naringin ardından doksorubisin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerine 6 saat süre ile 112 µM naringin (IC_{50}) uygulaması yapılmıştır. Bu sürenin sonunda 0.012 µM ile 6.25 µM arasında doksorubisin uygulaması yapılan hücrelerde 24 saat sonra maddelerin hücre canlılığına etkisi Şekil 4.13.'de verilmiştir.

Önce naringin ardından doksorubisin uygulamasından 24 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (F=54.725; sd=10-77; p<0.0001). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 6.25 µM doksorubisin konsantrasyonunda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %30.05±0.03'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.012 µM doksorubisin konsantrasyonunda %90.46±0.029 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13.).

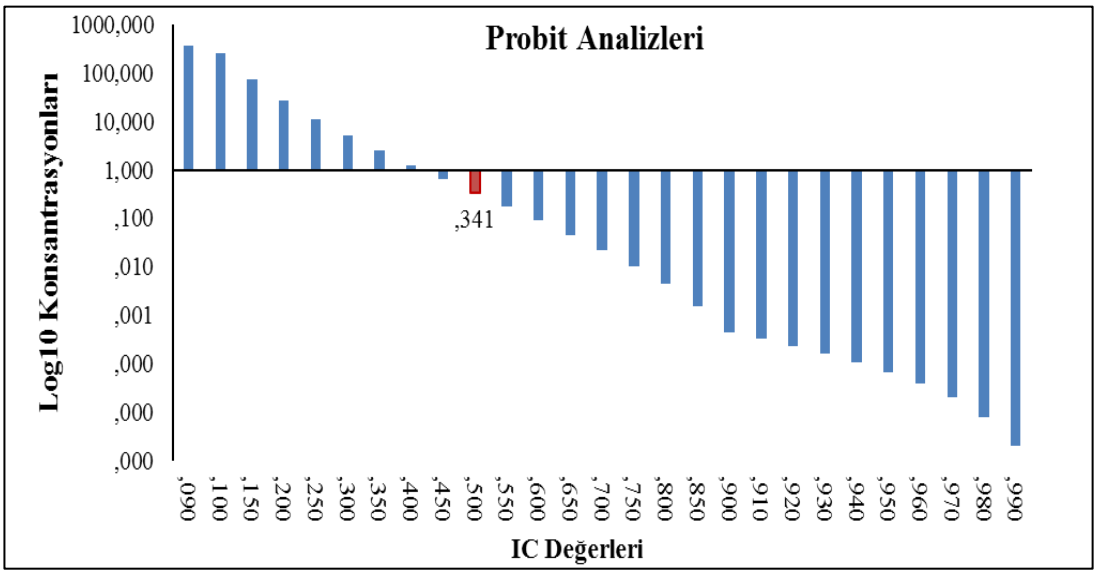




Şekil 4.13. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Önce Naringin Ardından Doksorobisin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı. Veriler %

Canlılık Ortalama±Standart Sapma.

Çalışmada önce naringin ardından doksorubisin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değerinin 0.341 µM doksorubisin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14.).

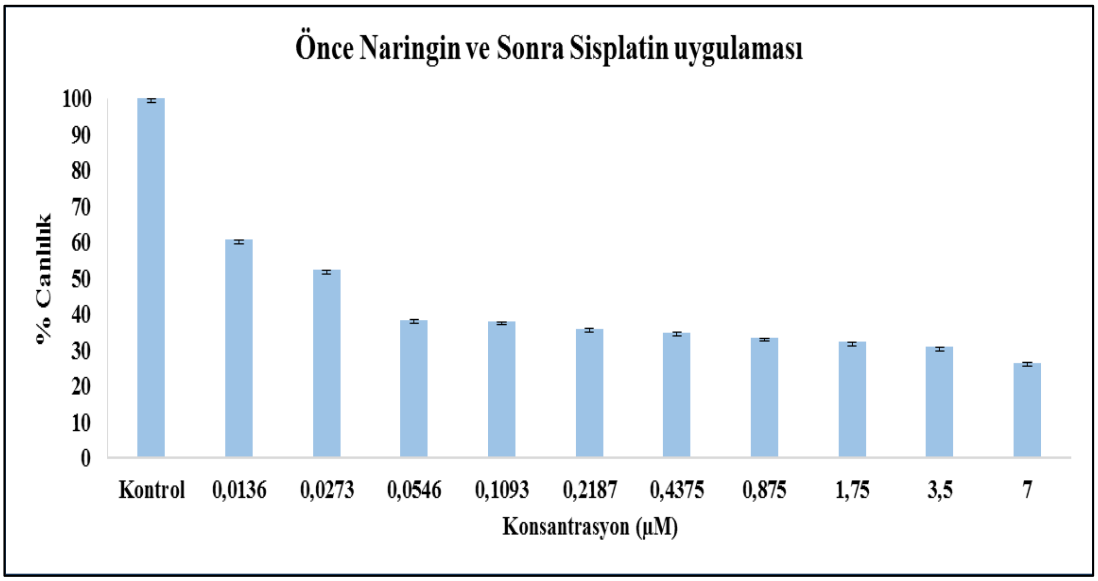


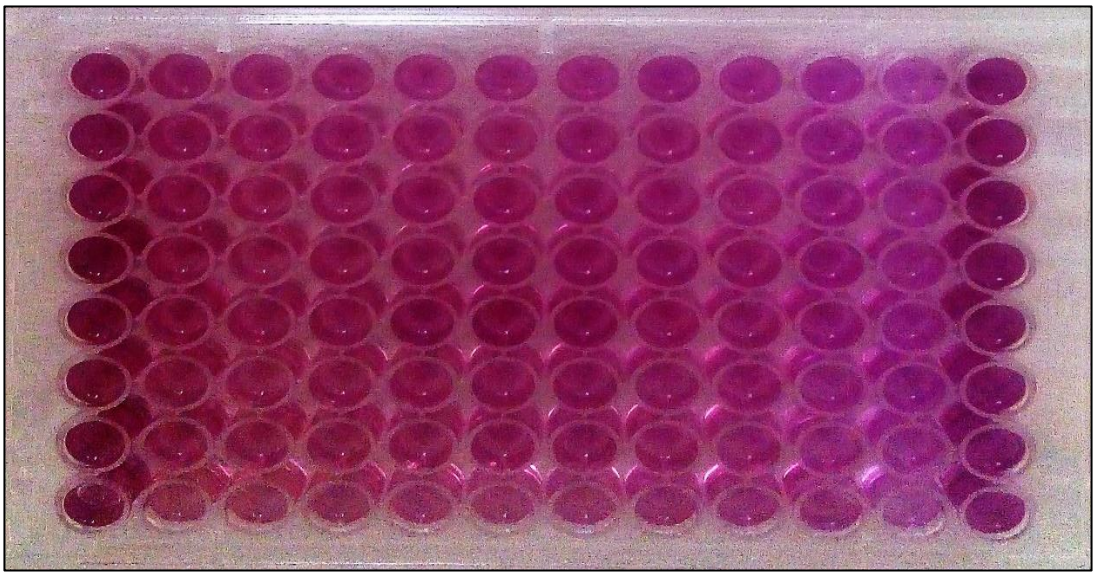
Şekil 4.14. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Önce Naringin Ardından Doksorubisin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

4.2.2. Önce Naringin Ardından Sisplatin

Önce naringin ardından sisplatin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerine 6 saat süre ile 112 µM naringin (IC_{50}) uygulaması yapılmıştır. Bu sürenin sonunda 0.0136 µM ile 7 µM arasında sisplatin uygulaması yapılan hücrelerde 24 saat sonra maddelerin hücre canlılığına etkisi Şekil 4.15.'de verilmiştir.

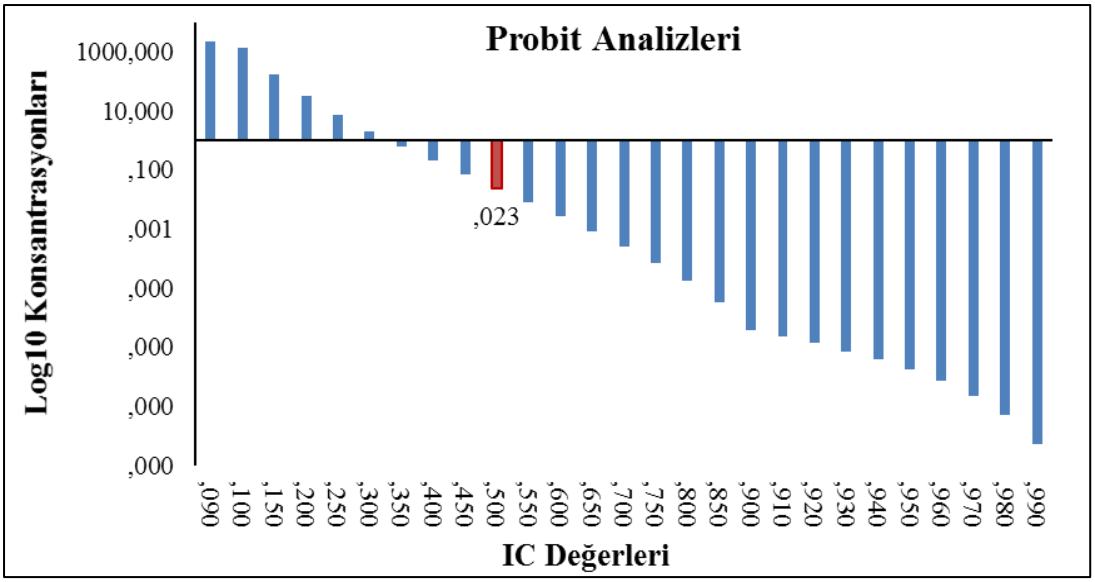
Önce naringin ardından sisplatin uygulamasından 24 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F=54.725$; sd=10-77; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 7 µM sisplatin konsantrasyonunda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %26.55±0.03'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.0136 µM sisplatin konsantrasyonunda %60.72±0.029 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15.).





Şekil 4.15. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Önce Naringin Ardından Sisplatin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı. Veriler % Canlılık Ortalama±Standart Sapma.

Çalışmada önce naringin ardından sisplatin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 0.023 µM sisplatin olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.16.).

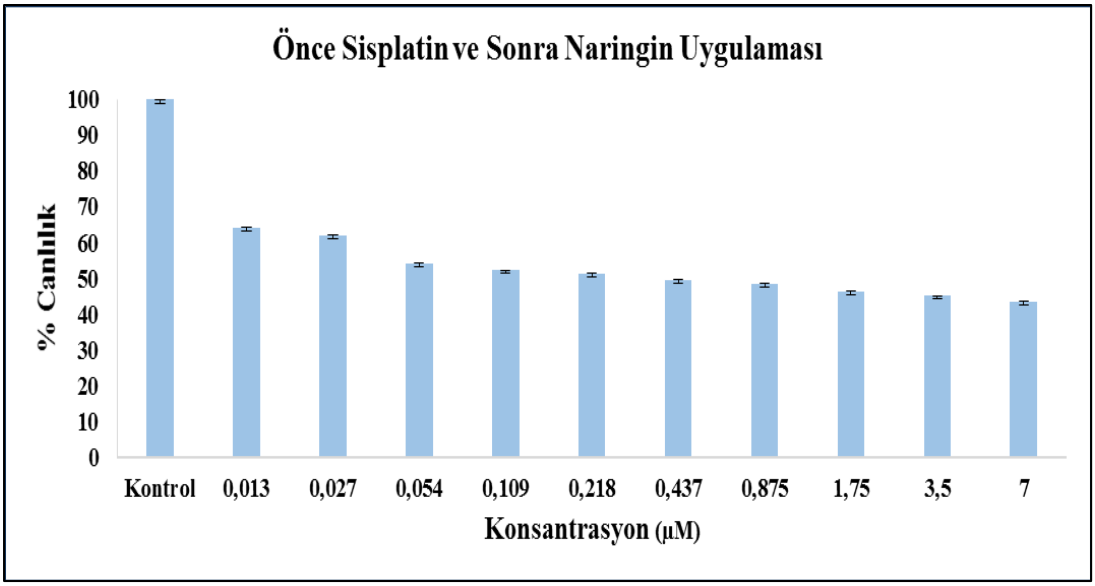


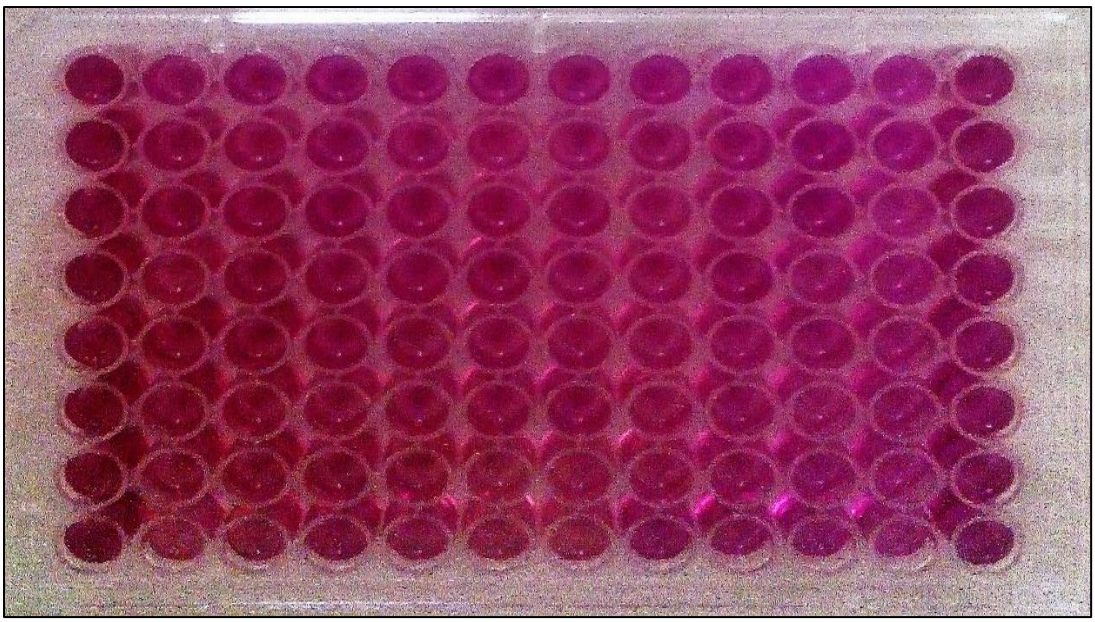
Şekil 4.16. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Önce Naringin Ardından Sisplatin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

4.2.3. Önce Sisplatin Ardından Naringin

Önce sisplatin ardından naringin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 24 saat süre ile 0.0136 µM ile 7 µM arasında sisplatin ve 6 saat süre ile IC_{50} konsantrasyonda (112 µM) naringin uygulamasının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.17.'de verilmiştir.

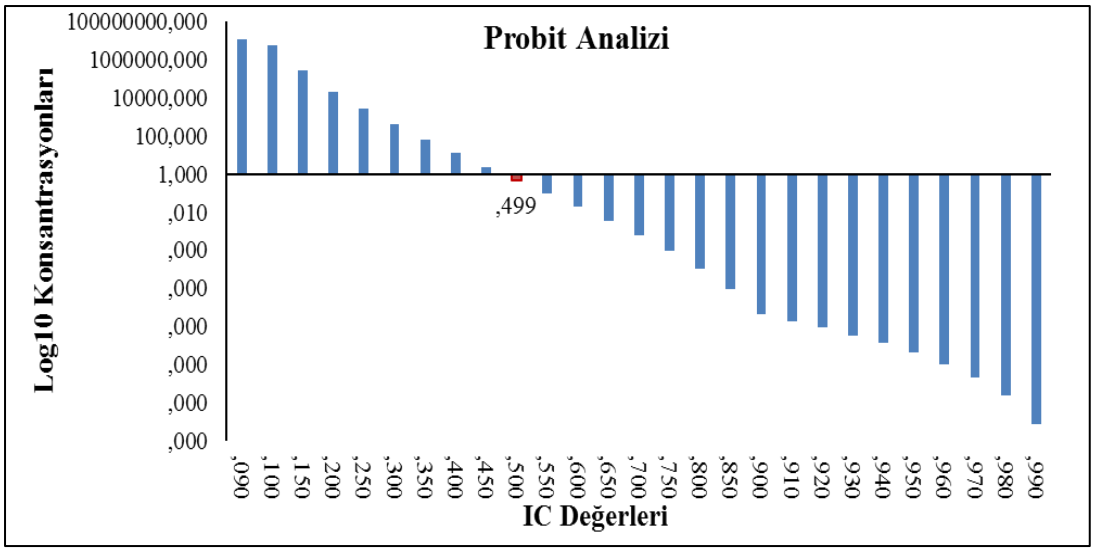
Önce sisplatin ardından naringin uygulamasından 24 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F=51.918$; sd=10-77; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 7 µM sisplatin konsantrasyonunda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %43.49±0.03'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.0136 µM sisplatin konsantrasyonunda %64.27±0.029 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17.).





Şekil 4.17. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Önce Sisplatin Ardından Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı. Veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma.

Çalışmada önce sisplatin ardından naringin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 0.499 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.18.).

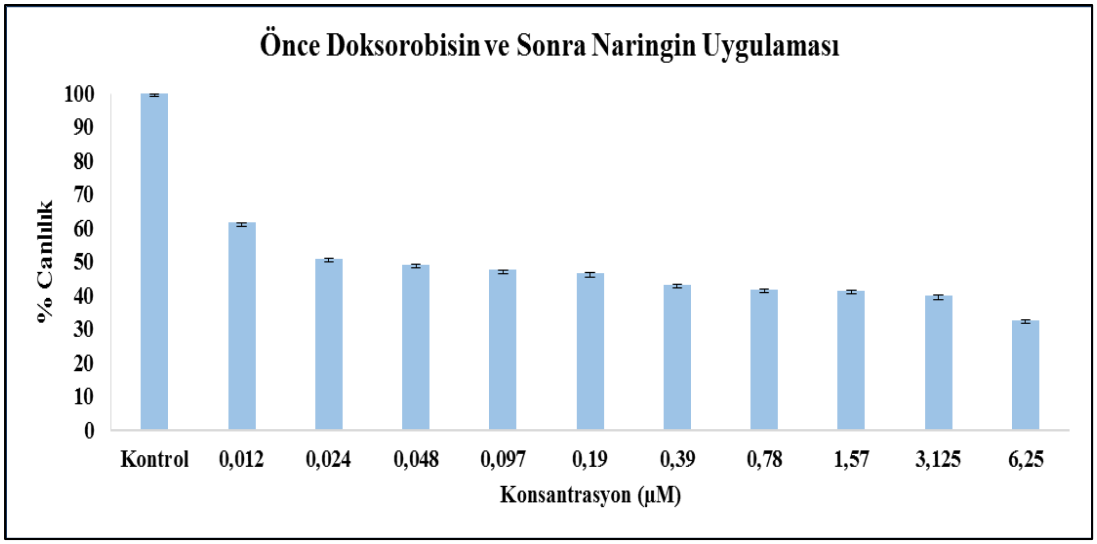


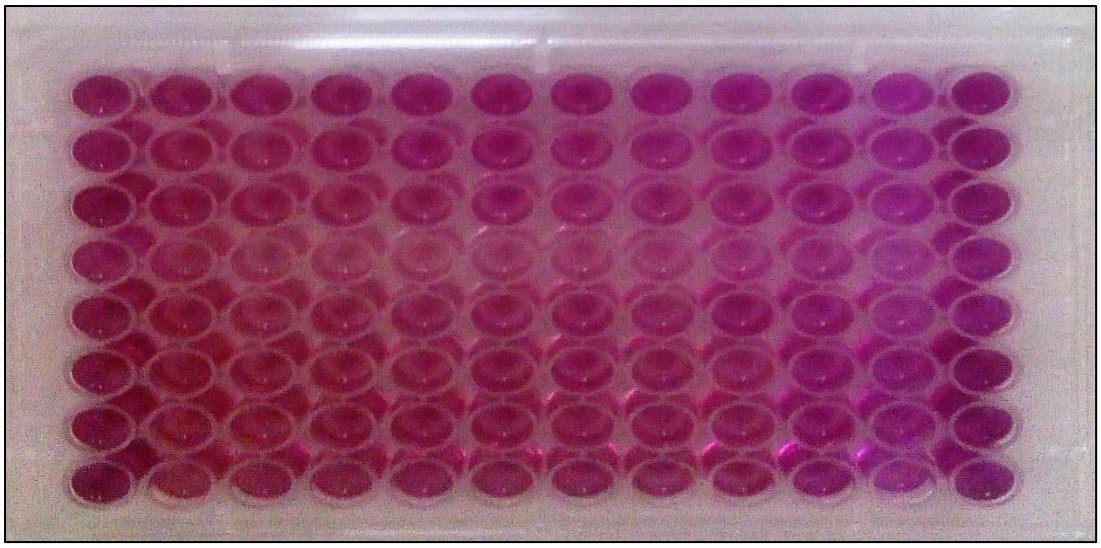
Şekil 4.18. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Önce Sisplatin Ardından Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

4.2.4. Önce Doksorubisin Ardından Naringin

Önce doksorubisin ardından naringin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 24 saat süre ile 0.012 µM ile 6.25 µM arasında doksorubisin ve 6 saat süre ile IC_{50} konsantrasyonda (112 µM) naringin uygulamasının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.19.'da verilmiştir.

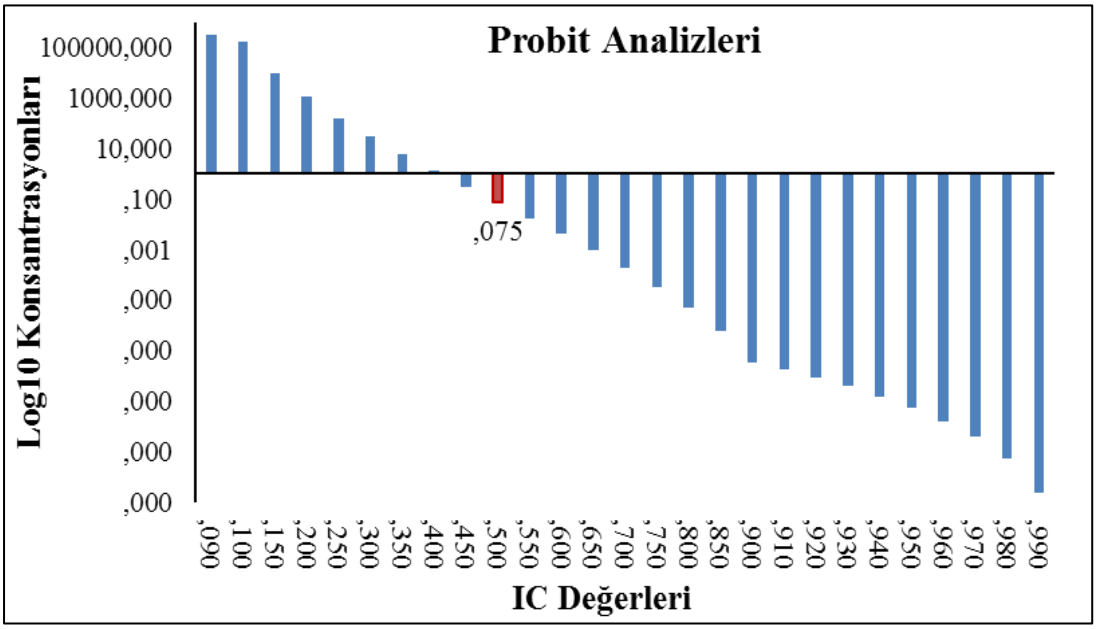
Önce doksorubisin ardından naringin uygulamasından 24 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F=26.612$; sd=10-77; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 6.25 µM doksorubisin konsantrasyonunda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %32.69±0.03'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.012 µM doksorubisin konsantrasyonunda %61.63±0.029 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19.).





Şekil 4.19. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Önce Doksorubisin Ardından Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı, Veriler % Canlılık Ortalama±Standart Sapma

Çalışmada önce doksorubisin ardından naringin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 0.075 µM doksorubisin olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.20.).

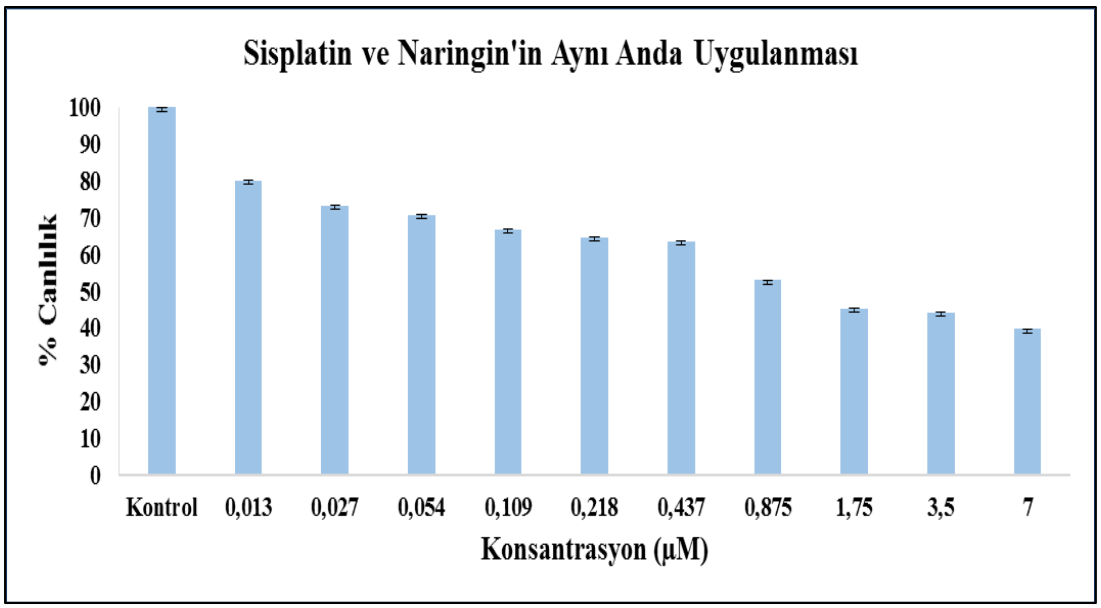


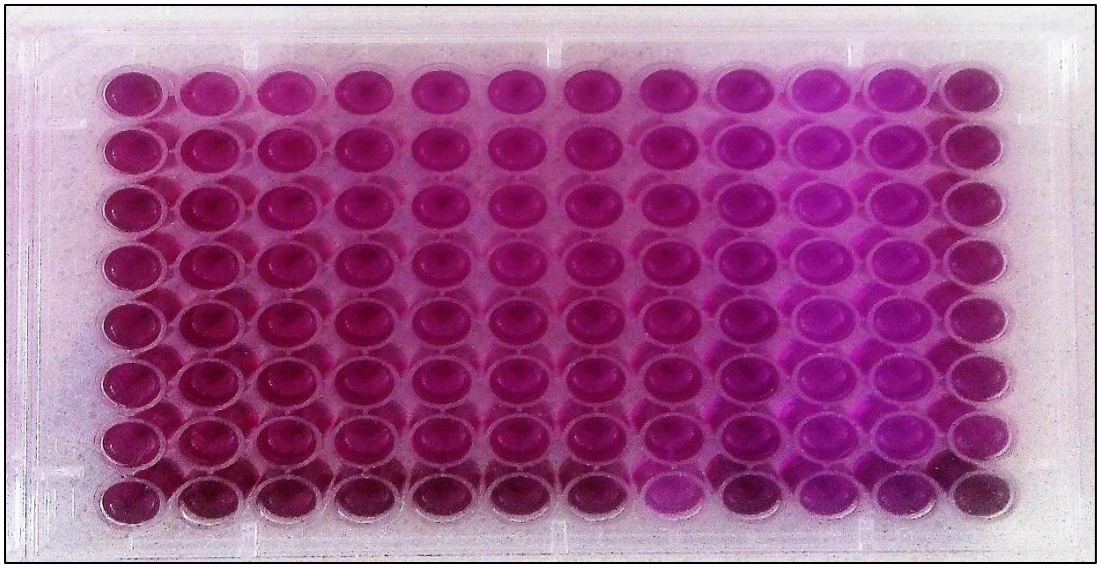
Şekil 4.20. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Önce Doksorubisin Ardından Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

4.2.4. Aynı Anda Sisplatin-Naringin

Aynı anda naringin-sisplatin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 112 µM naringin konsantrasyonu sabit tutularak, 0.013 µM ile 7 µM arasında uygulanan sisplatinin 24 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 4.21.'de verilmiştir.

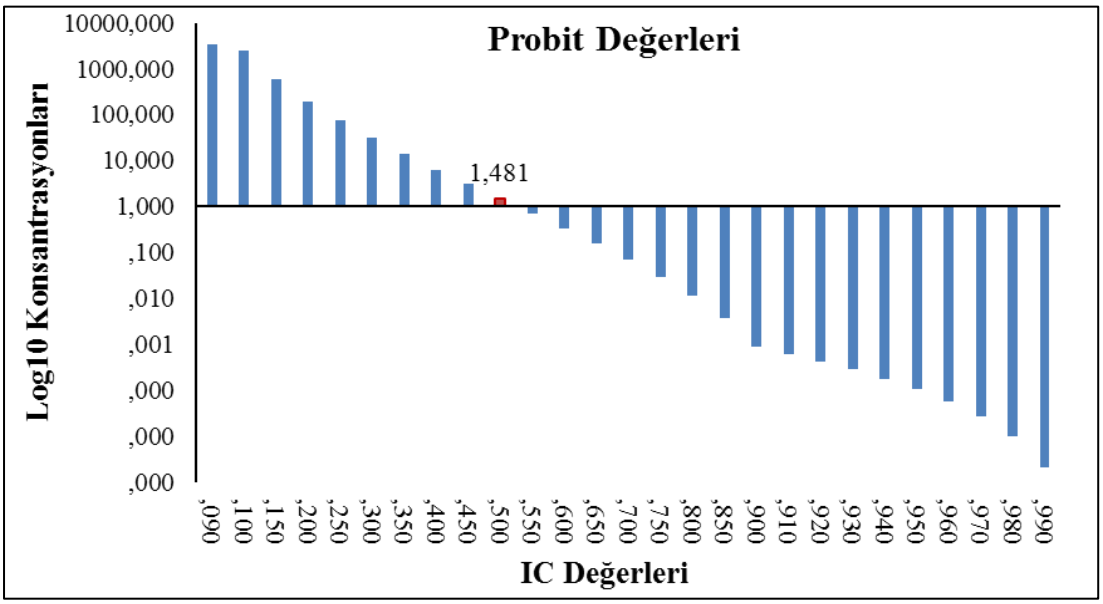
Aynı anda naringin-sisplatin uygulamasından 24 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F=15.821$; $sd=10\text{-}77$; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 7 µM sisplatin konsantrasyonunda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %39.66±0.06'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.013 µM sisplatin konsantrasyonunda %80.14±0.096 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21.).





Şekil 4.21. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Aynı Anda Sisplatin-Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı, Veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma.

Çalışmada aynı anda sisplatin-naringin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 1.481 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.22.).

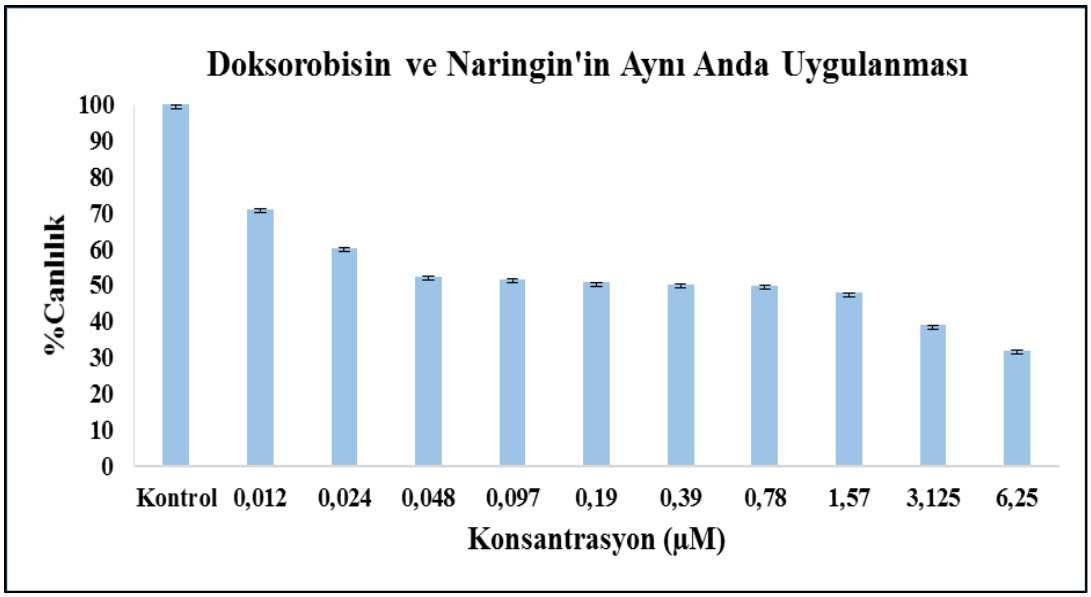


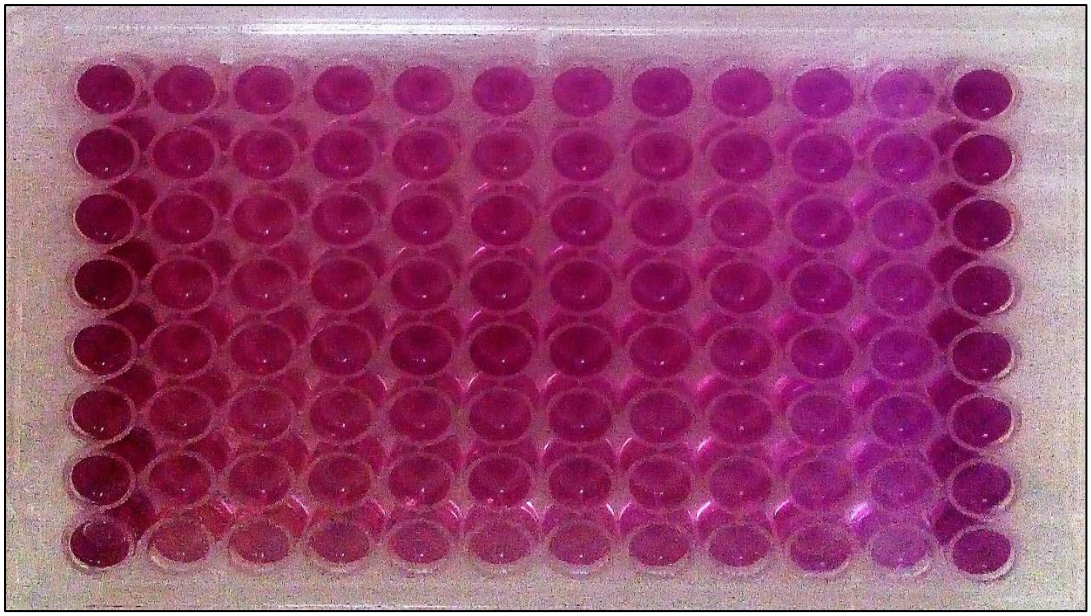
Şekil 4.22. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Aynı Anda Sisplatin-Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

4.2.5. Aynı Anda Doksorubisin-Naringin

Aynı anda doksorubisin-naringin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 112 µM naringin konsantrasyonu sabit tutularak, 0.012 µM ile 6.25 µM arasında uygulanan doksorubisin 24 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 4.23.'de verilmiştir.

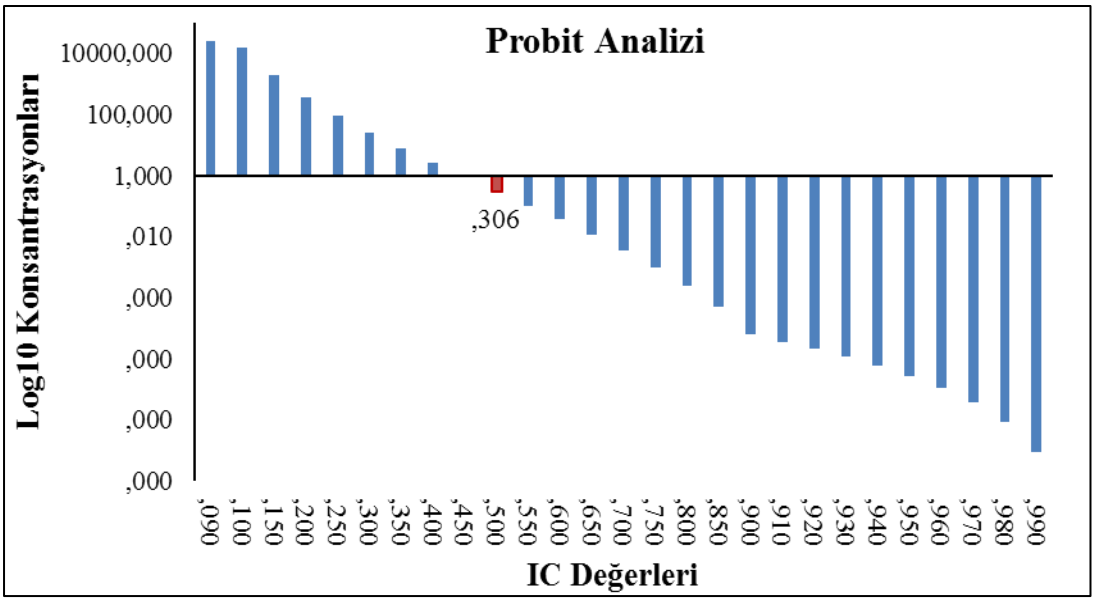
Aynı anda doksorubisin-naringin uygulamasından 24 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F=57.656$; sd=10-77; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 6.25 µM doksorubisin konsantrasyonunda olduğu ve bu konsantrasyonda ortamdaki hücrelerin sadece %31.93±0.04'ünün canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.012 µM doksorubisin konsantrasyonunda %71.17±0.074 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23.).





Şekil 4.23. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Aynı Anda Doksorubisin-Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı, Veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma

Çalışmada aynı anda doksorubisin-naringin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 0.306 µM doksorubisin olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.24.).

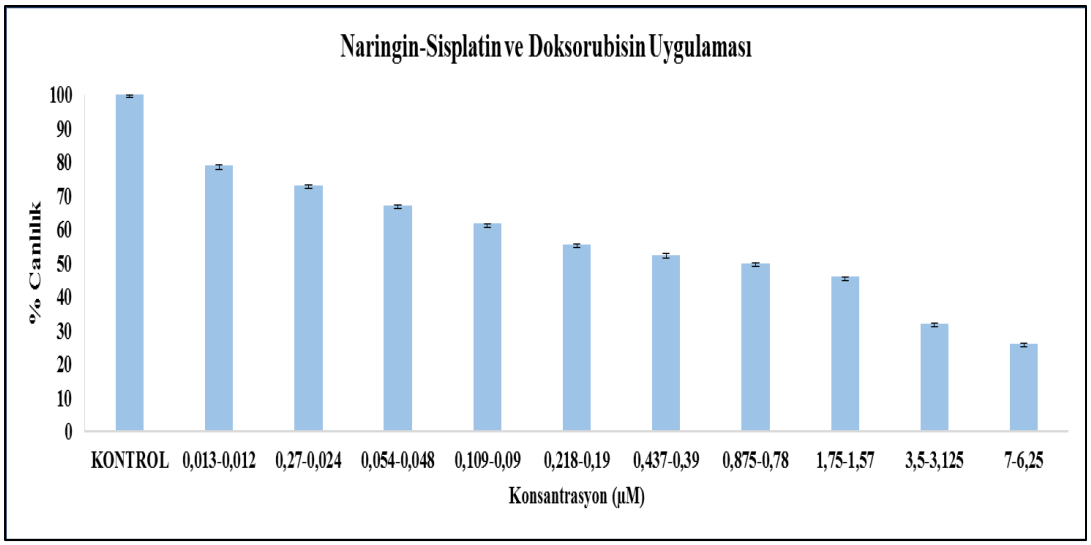


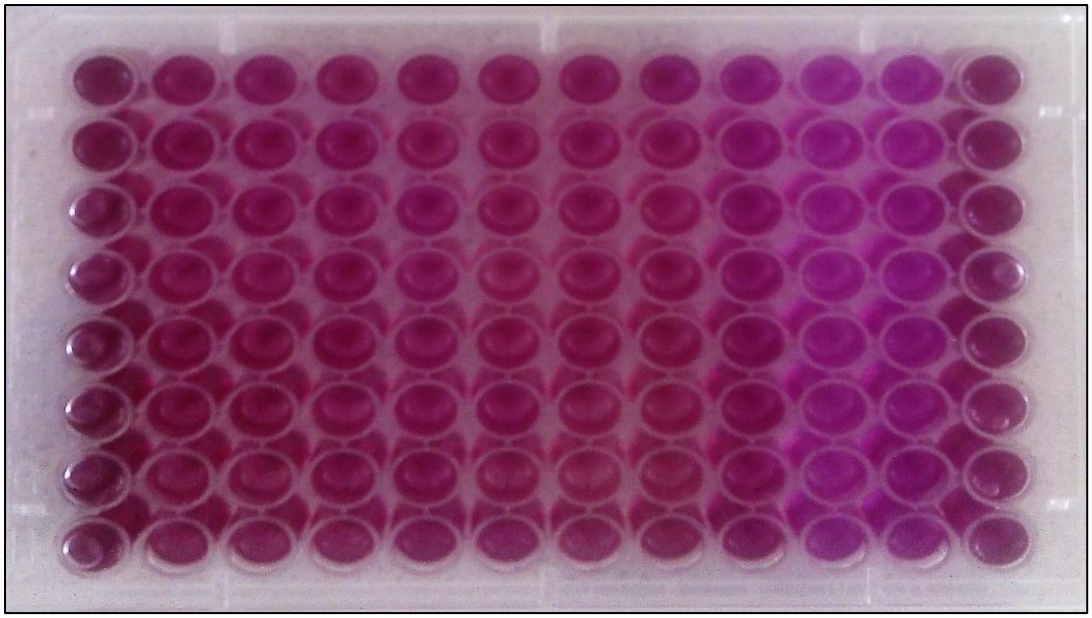
Şekil 4.24. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Aynı Anda Doksorubisin-Naringin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

4.2.5. Aynı Anda Naringin-Doksorubisin-Sisplatin

Aynı anda naringin-doksorubisin-sisplatin uygulaması yapılan N1E-115 nöroblastom hücrelerinde 112 µM naringin dozu sabit tutularak, 0.012 µM ile 6.25 µM arasında uygulanan sisplatin konsantrasyonları ve 0.013 µM ile 7 µM doksorubisin konsantrasyonlarının 24 saat sonra hücre canlılığına etkisi Şekil 4.25.'de verilmiştir.

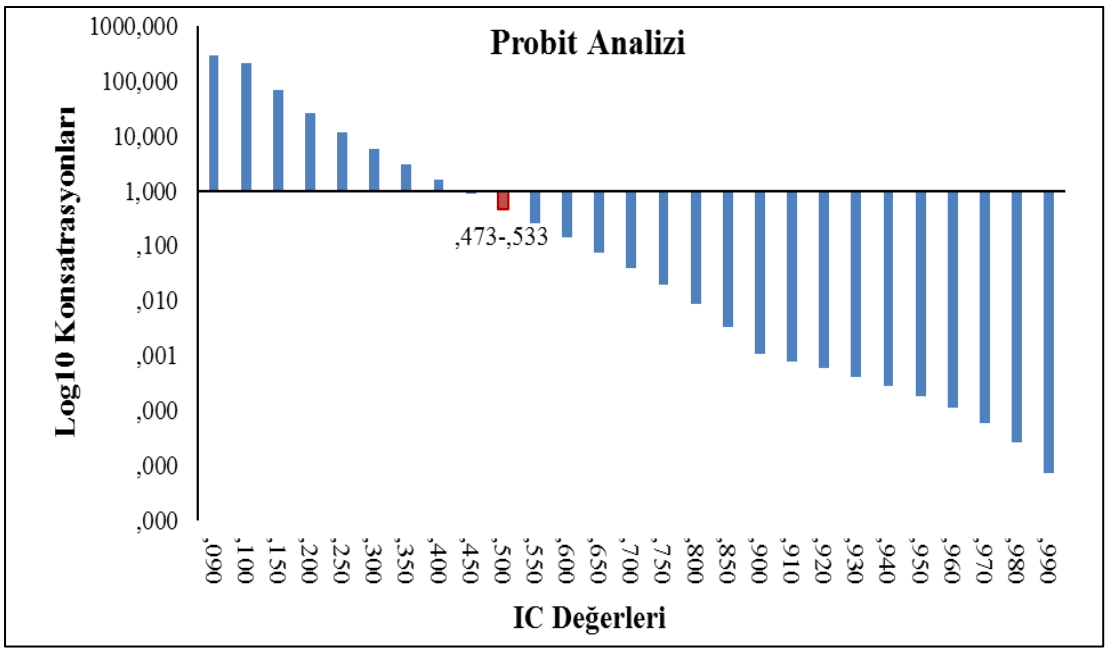
Aynı anda naringin-doksorubisin-sisplatin uygulamasından 24 saat sonra N1E-115 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($F=19.284$; sd=10-77; $p<0.0001$). Yapılan çalışmada hücre canlılığında kontrole göre en belirgin azalmanın 6,25 µM sisplatin, 7 µM doksorubisin ve 112 µM naringin konsantrasyonlarında olduğu ve bu konsantrasyonlarda ortamdaki hücrelerin sadece %26.01±0.1' inin canlı olduğu saptanmıştır. En yüksek hücre canlılığının ise 0.012 µM sisplatin, 0.013 µM doksorubisin ve 112 µM naringin konsantrasyonlarında %78.80±0.21 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.25.).





Şekil 4.25. Nöroblastom N1E-115 Hücre Hattında Aynı Anda Naringin-Doksorubisin-Naringin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi. MTT Testi Plağı, Veriler % Canlılık Ortalama ± Standart Sapma.

Çalışmada aynı anda naringin- doksorubisin-sisplatin uygulamasının % hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesini takiben probit analizi yapılarak 24. saatte hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan IC_{50} değeri 112 µM naringin, 0.473µM doksorubisin, 0.533 µM sisplatin olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında Aynı Anda Naringin-Doksorubisin-Sisplatin Uygulamasının MTT Testi Sonuçları Kullanılarak Yapılan Probit Analizi ve IC_{50} Değeri.

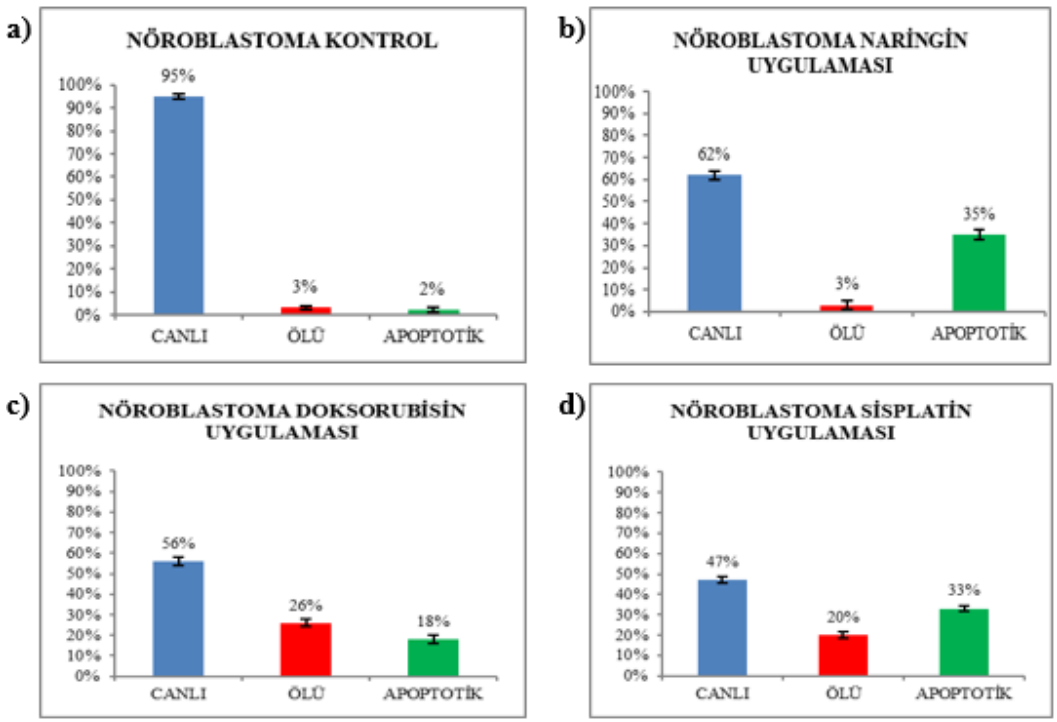
Nöroblastom hücrelerinde naringin, sisplatin ve doksorubisin maddelerinin IC_{50} değerlerinin belirlenmesini takiben yapılan diğer analizlerde maddelerin sağlıklı hücreler üzerindeki etkilerinin de belirlenmesi amacı ile nöroblastom hücresinin (N1E-115) yanı sıra sağlıklı astrosit hücre hattı (C8-D1A) da kullanılmıştır.

4.3. TALİ Görüntü Tabanlı Sitometre Analizi

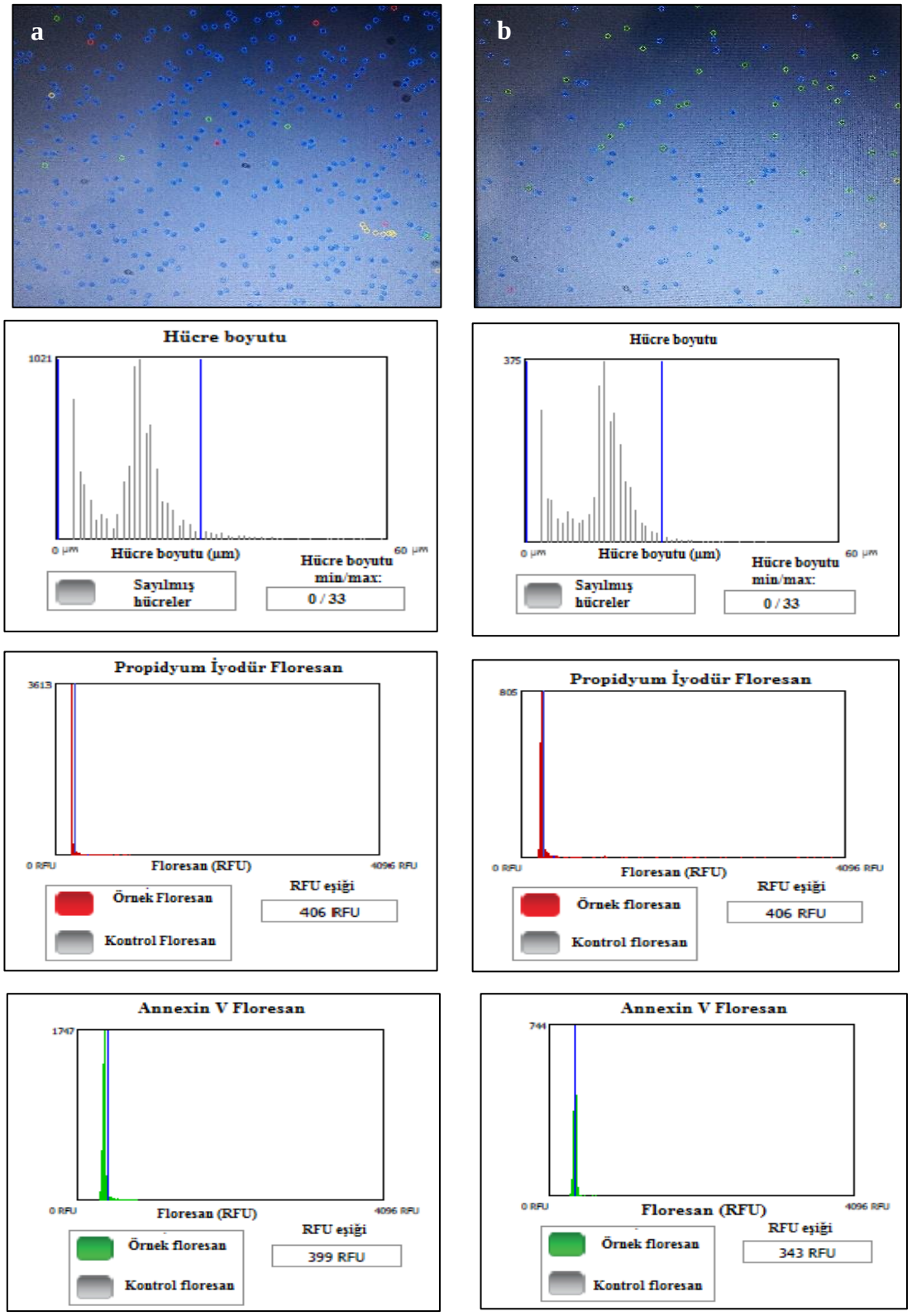
Çalışma kapsamında naringin flavonoidinin nöroblastom tedavisinde kullanılan sisplatin ve doksorubisin ile etkileşimlerinin belirlenmesi için madde uygulamalarının canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdelerine etkisi TALİ Görüntü Tabanlı Sitometre ile analiz edilmiştir. Bu yöntemde göre Anneksin V ve Propidyum iyodür ile muamele edilen kontrol ve uygulama gruplarındaki hücreler canlılık durumlarına göre boyanmaktadır. Canlı hücreler boyanmazken, ölü hücreler Anneksin V ve propidyum iyodür (PI) ile boyanarak kırmızı veya sarı sinyal (sırasıyla anneksin V-/PI+ veya anneksin V+/PI+), apoptotik hücreler ise yeşil sinyal (annexin V+/ PI-) vermektedir.

4.3.1. Nöroblastom ve Astrosit Hücre Hatlarında Tek Olarak Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

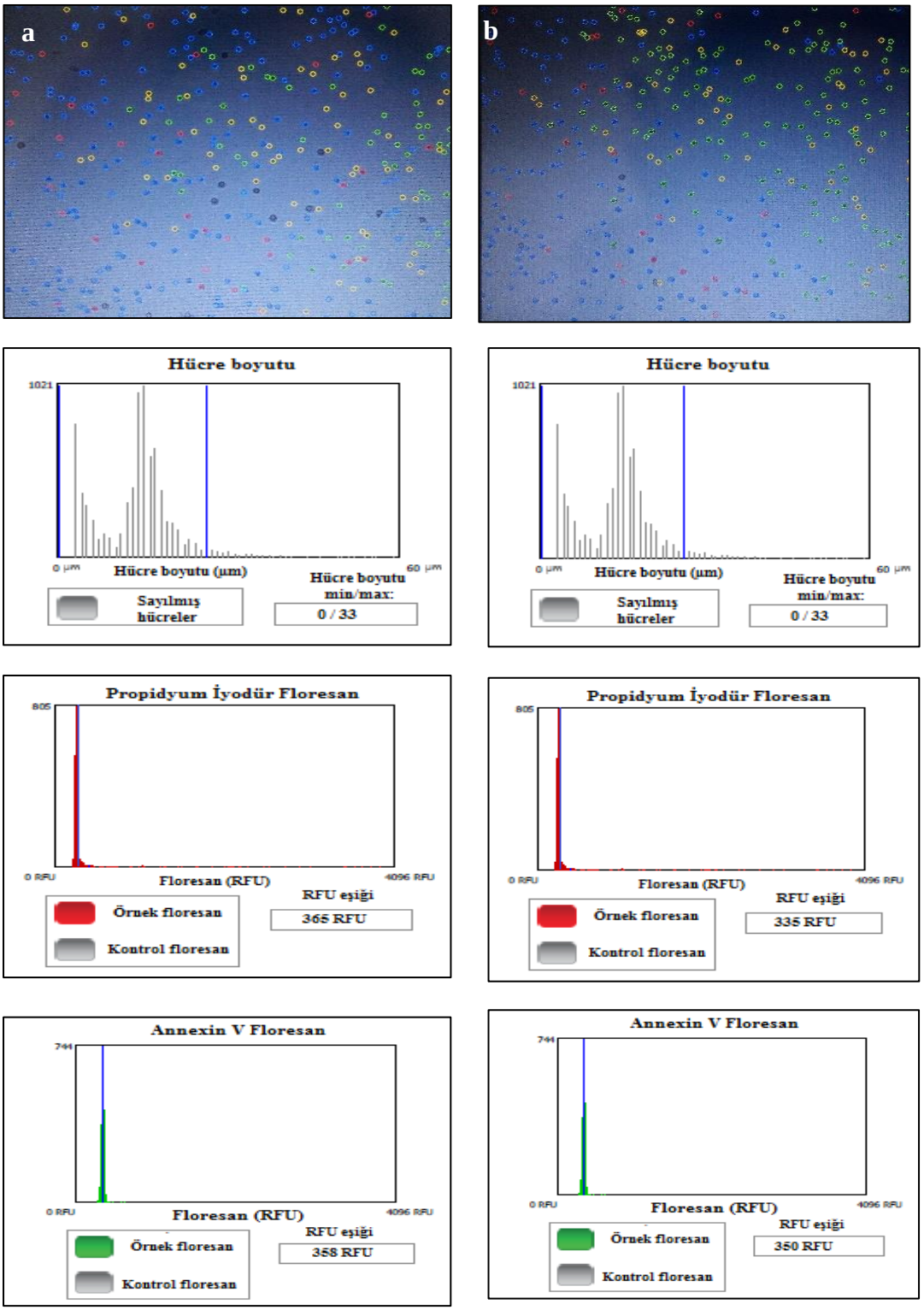
Nöroblastom hücrelerinde kontrol ve madde uygulaması yapılan gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları Şekil 4.27, Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da verilmiştir. Şekil 4.27'de görüldüğü gibi kontrol grubunda %95 oranında canlı, %3 ölü ve %2 apoptotik hücre olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda %2 olan apoptotik hücre oranının naringin uygulaması ile %35'e yükseldiği, ölü hücre oranının ise kontrol ile aynı oranda kaldığı saptanmıştır (Şekil 4.27a ve b). Doksorubisin uygulaması yapılan hücrelerde apoptotik hücre %18 iken sisplatin uygulamasında ise %33 oranında saptanmıştır (Şekil 4.27c ve d).



Şekil 4.27. N1E-115 Nöroblastom Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. **a)** Kontrol, **b)** Naringin Uygulaması, **c)** Doksorubisin Uygulaması, **d)** Sisplatin Uygulaması.

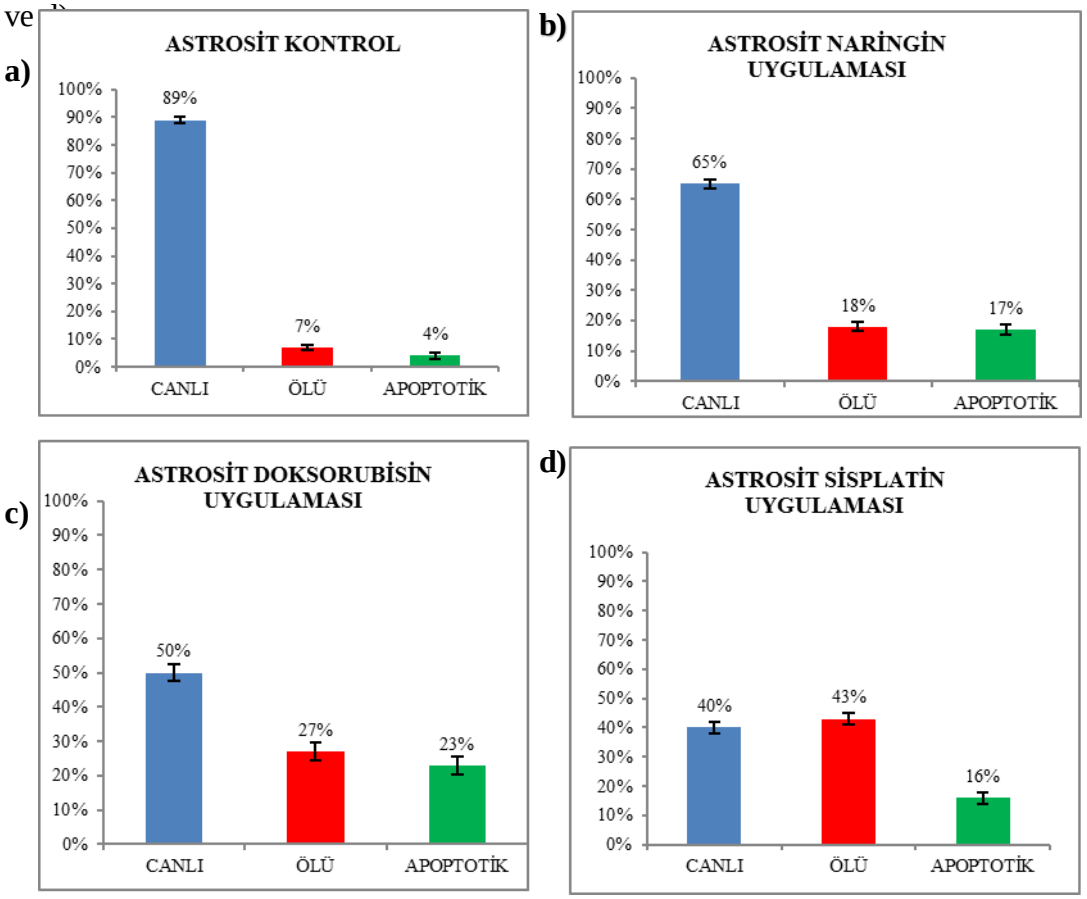


Şekil 4.28. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) Floresan Yoğunluğu. **a)** Kontrol, **b)** Naringin Uygulaması.

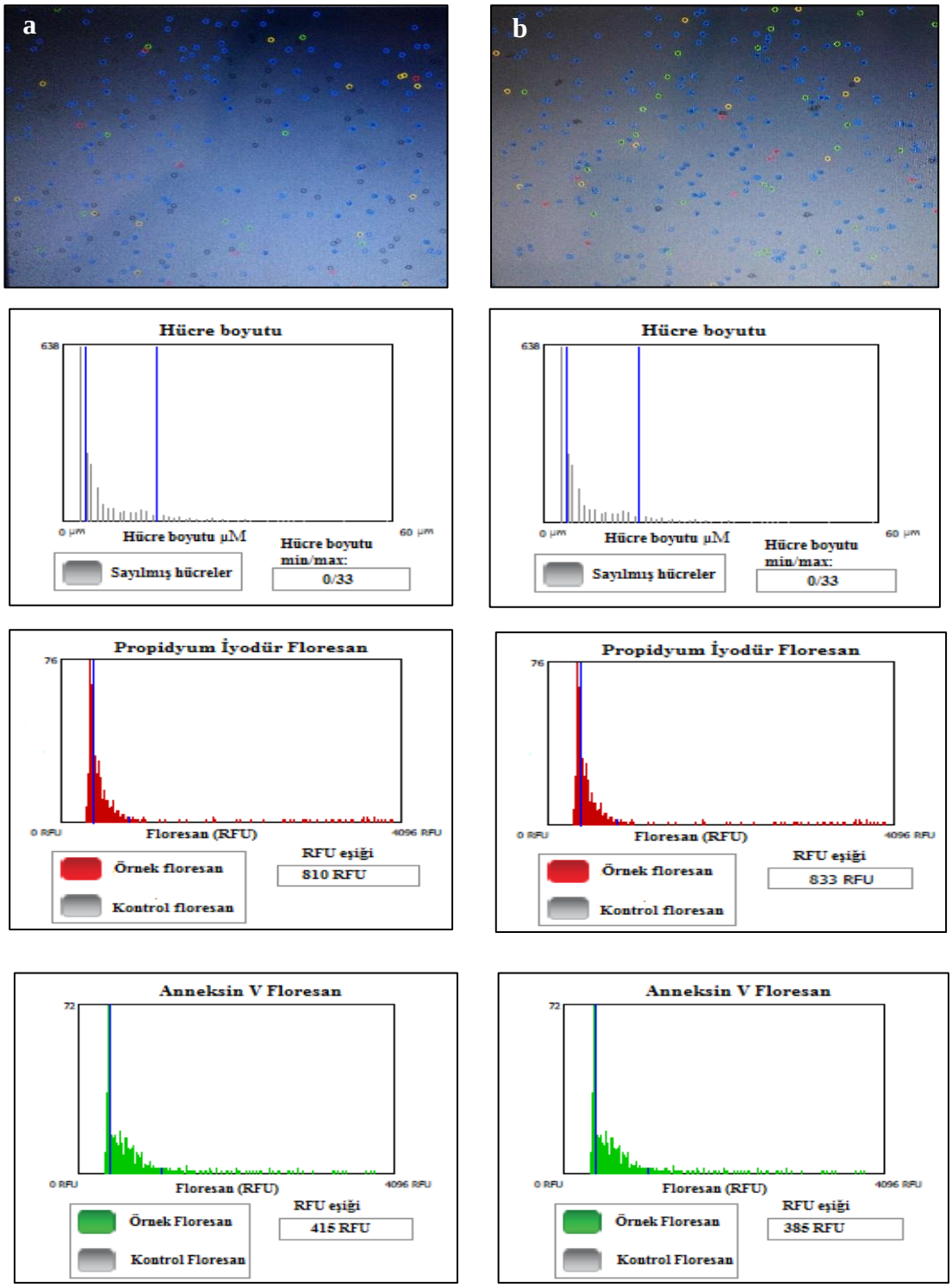


Şekil 4.29. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) Floresan Yoğunluğu. **a)** Doksorubisin Uygulaması, **b)** Sisplatin Uygulaması.

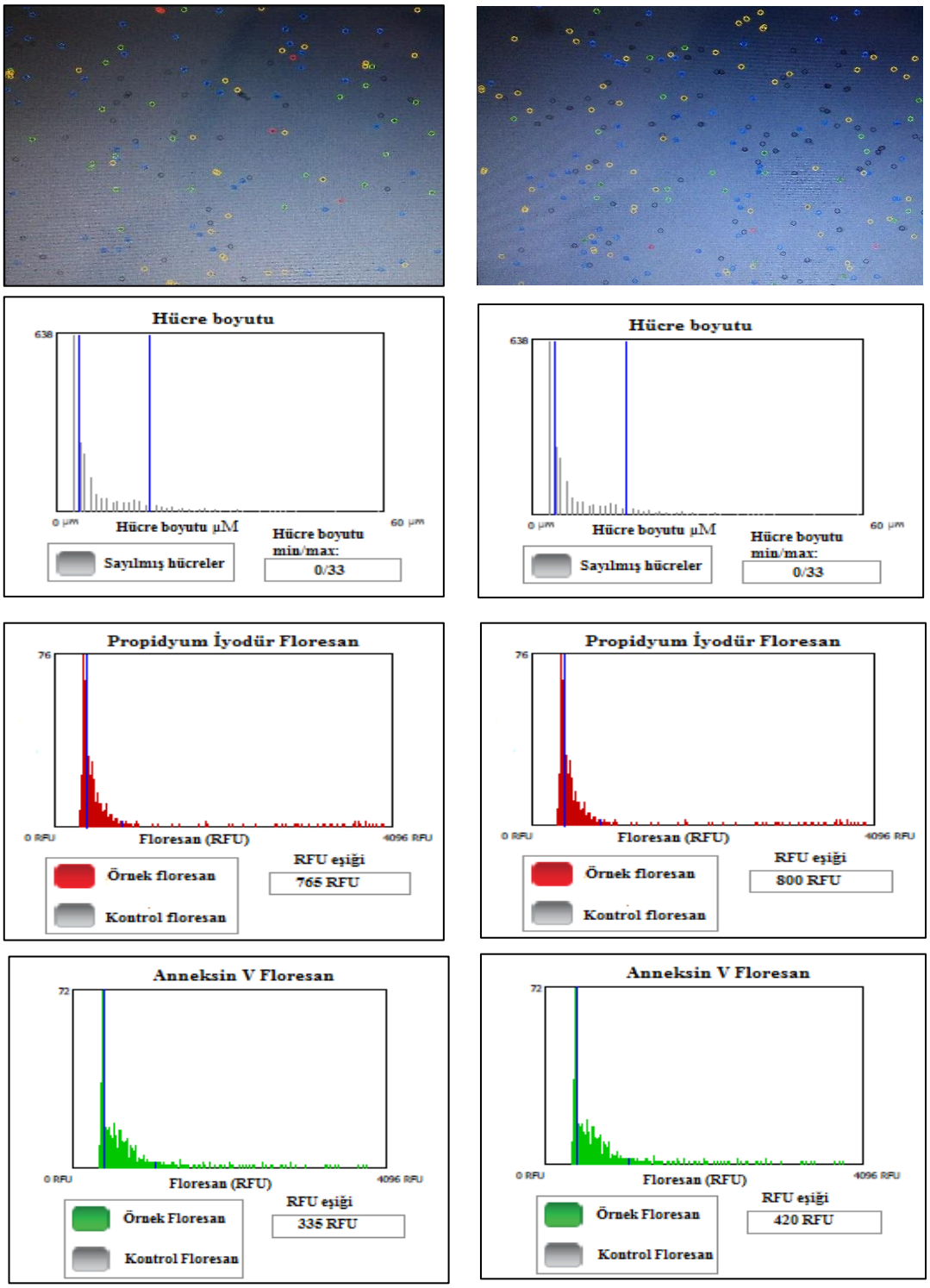
Astrosit C8-D1A hücrelerinde kontrol ve madde uygulaması yapılan gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları Şekil 4.30, Şekil 4.31 ve 4.32'de verilmiştir. Kontrol hücrelerinde ölü ve apoptotik hücrelerin oranı sırası ile %7 ve %4 iken naringin uygulamasında sıra ile %18 ve %17 olarak belirlenmiştir. Astrosit hücrelerinde en fazla ölüm %43 ile sisplatin uygulanan grupta belirlenirken, doksorubisin uygulaması ise %27 ölüme neden olmuştur (Şekil 4.30c ve



Şekil 4.30. C8-D1A Astrosit Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. **a)** Kontrol, **b)** Naringin Uygulaması, **c)** Doksorubisin Uygulaması, **d)** Sisplatin Uygulaması.



Şekil 4.31. C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu. **a)** Kontrol, **b)** Naringin Uygulaması.

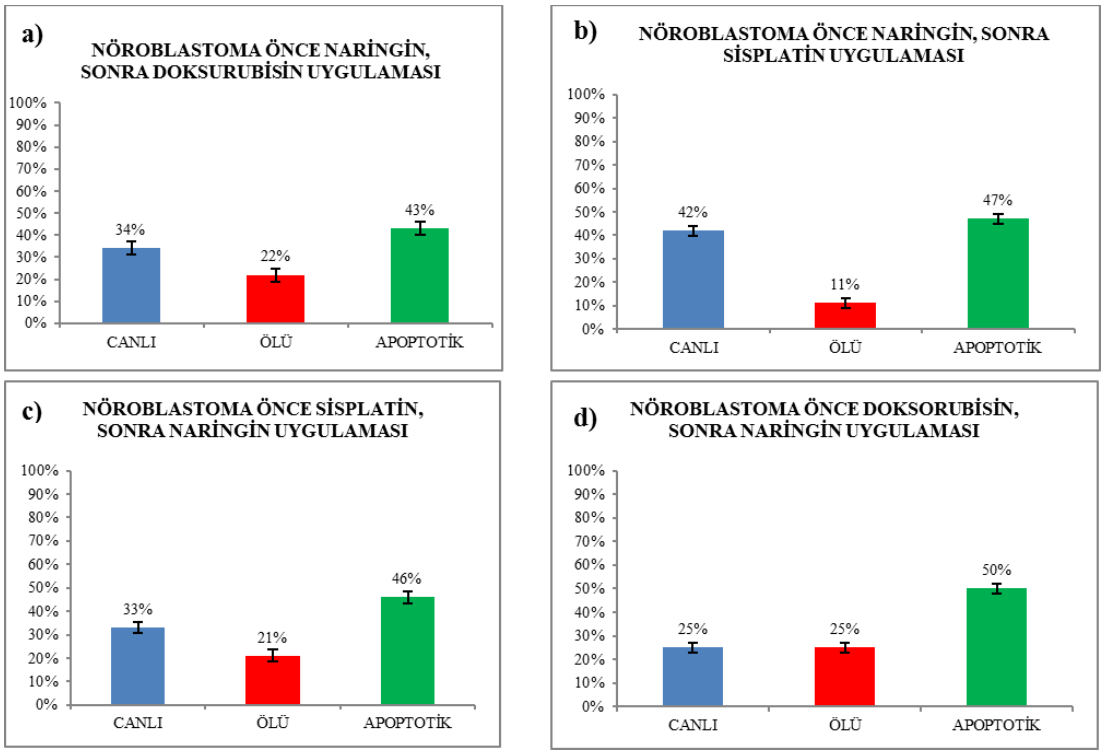


Şekil 4.32. C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu **a)** Doksorubisin Uygulaması **b)** Sisplatin Uygulaması.

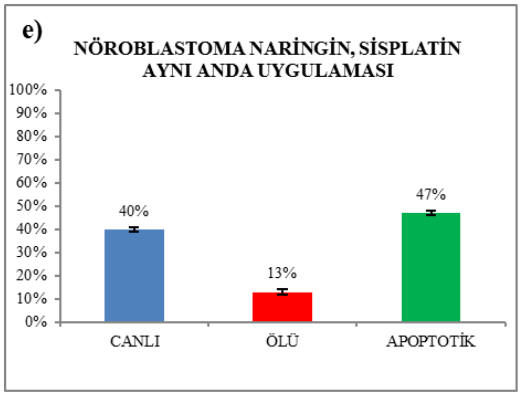
4.3.2. Nöroblastom ve Astrosit Hücre Hatlarında Kombine Olarak Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

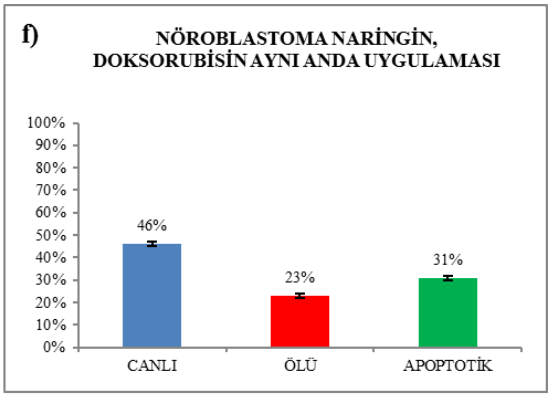
Nöroblastom hücrelerinde kombine olarak madde uygulaması yapılan gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları Şekil 4.33. ve Şekil 4.34'te verilmiştir. N1E-115 hücrelerinde önce naringin sonra doksorubisin uygulaması yapılan hücrelerde canlı, ölü ve apoptotik hücreler sırası ile %34, %22 ve %43 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.33 a). Doksorubisin ardından naringin uygulanan hücrelerde ise canlı, ölü ve apoptotik hücre oranının sırası ile %25, %25 ve %50 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.33 d).

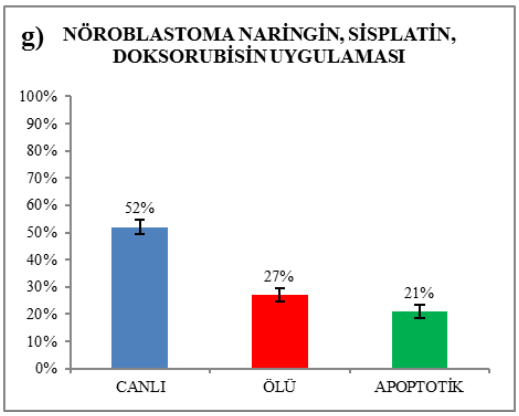
Önce naringin sonra sisplatin uygulaması yapılan hücrelerde canlı, ölü ve apoptotik hücreler sırası ile %42, %11 ve %47 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.33 b) sisplatin ardından naringin uygulanan hücrelerde ise canlı, ölü ve apoptotik hücre oranının sırası ile %33, %21 ve %46 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.33 c).



Şekil 4.33. N1E-115 Nöroblastom Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. **a)** Önce Naringin Sonra Doksorubisin Uygulaması, **b)** Önce Naringin Sonra Sisplatin Uygulaması, **c)** Önce Sisplatin Sonra Naringin Uygulaması, **d)** Önce Doksorubisin Sonra Naringin Uygulaması.

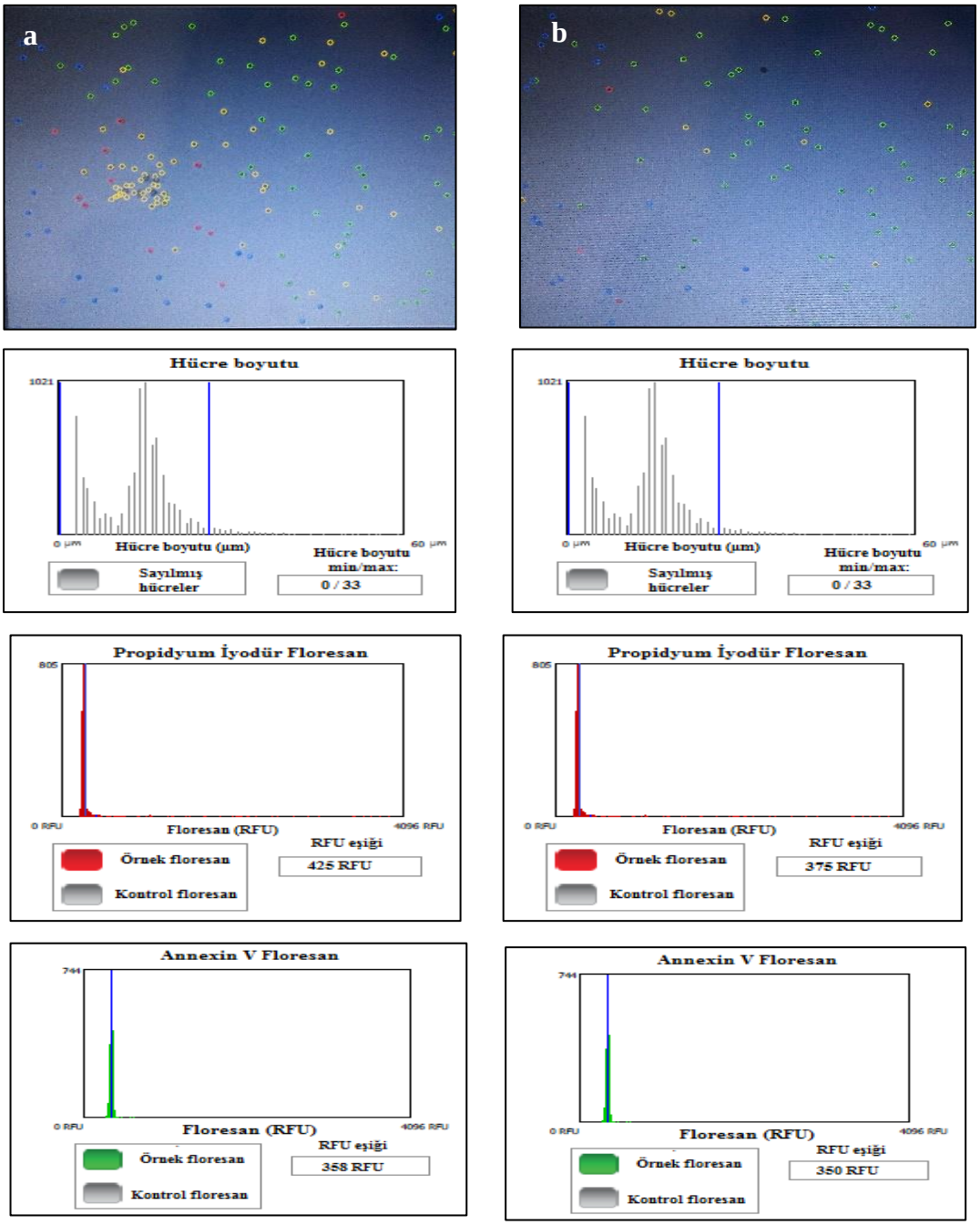




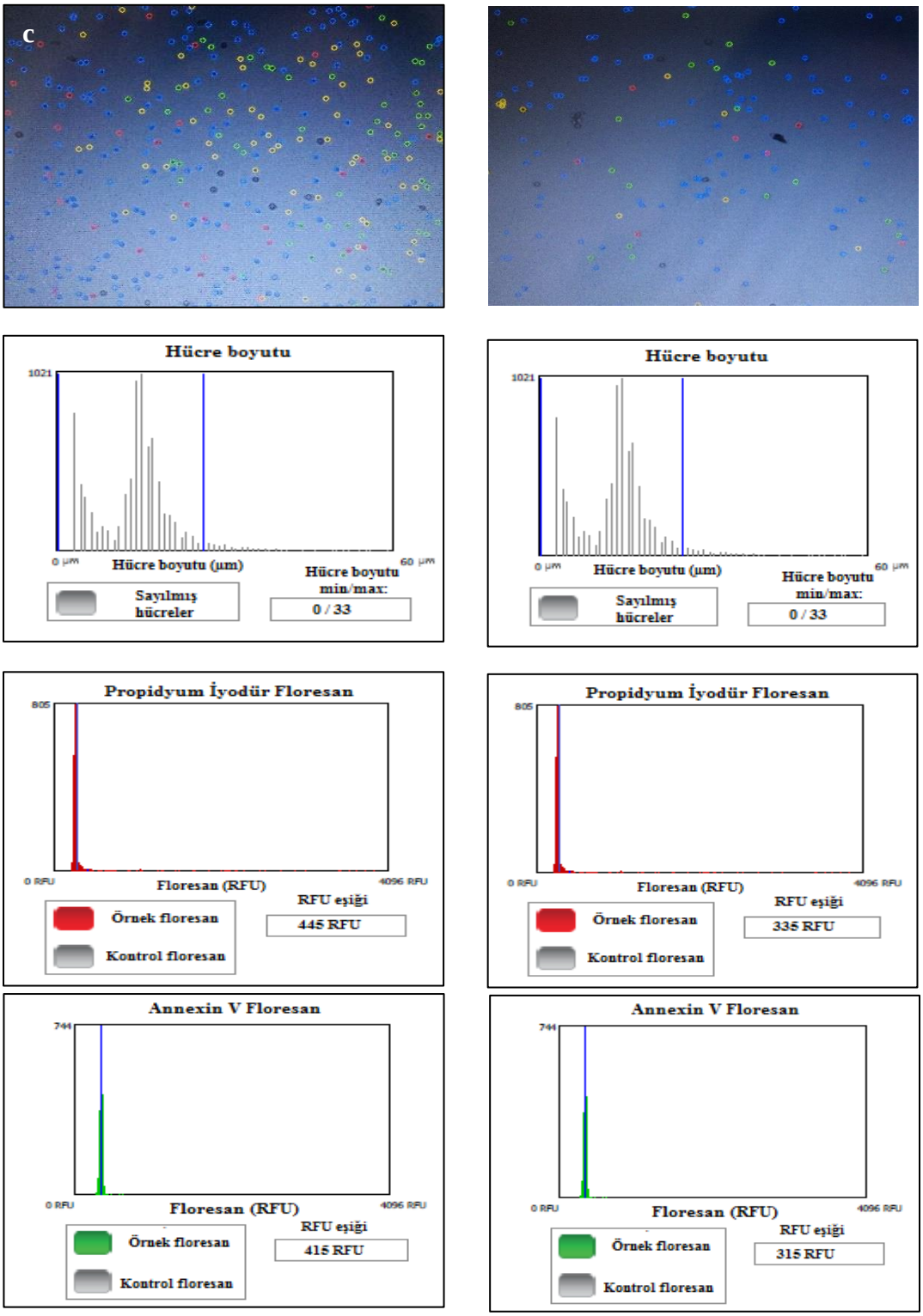


Şekil 4.33. Devamı N1E-115 Nöroblastom Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. **e)** Aynı Anda Naringin, Sisplatin Uygulaması, **f)** Aynı Anda Naringin, Doksorubisin Uygulaması, **g)** Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin Uygulaması.

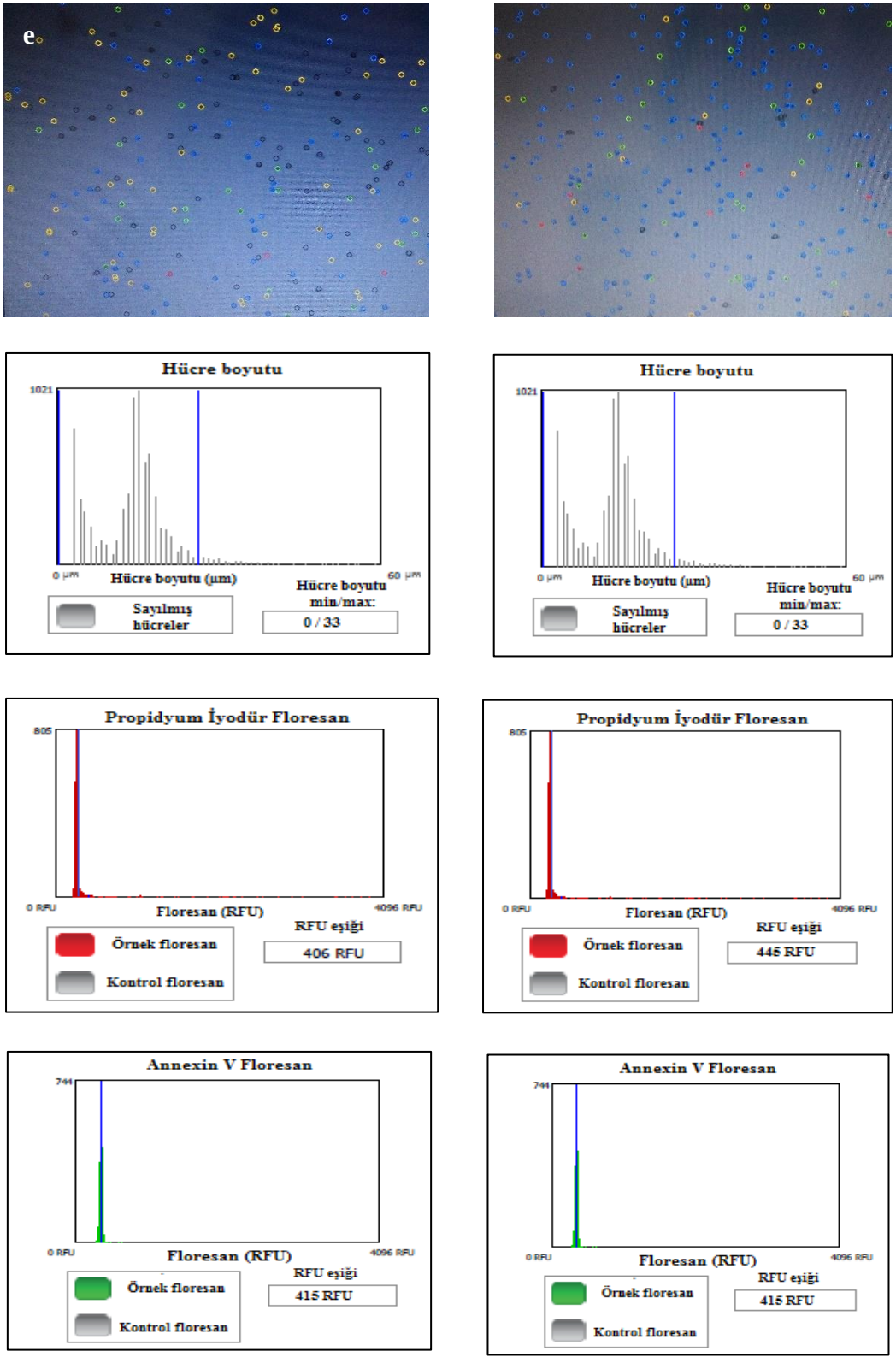
Naringin ile sisplatinin aynı anda uygulandığı N1E-115 hücrelerinde canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin sırası ile %40, %13 ve %47 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.33. e). Naringin ile doksorubisinin aynı anda uygulandığı hücrelerde ise canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin sırası ile %46, %33 ve %31 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.33. f). Tüm maddelerin aynı anda uygulamasında diğer uygulamalara göre canlı hücre oranının daha yüksek (%52), apoptotik hücre oranının ise daha düşük olduğu (%21) belirlenmiştir (Şekil 4.33 g).



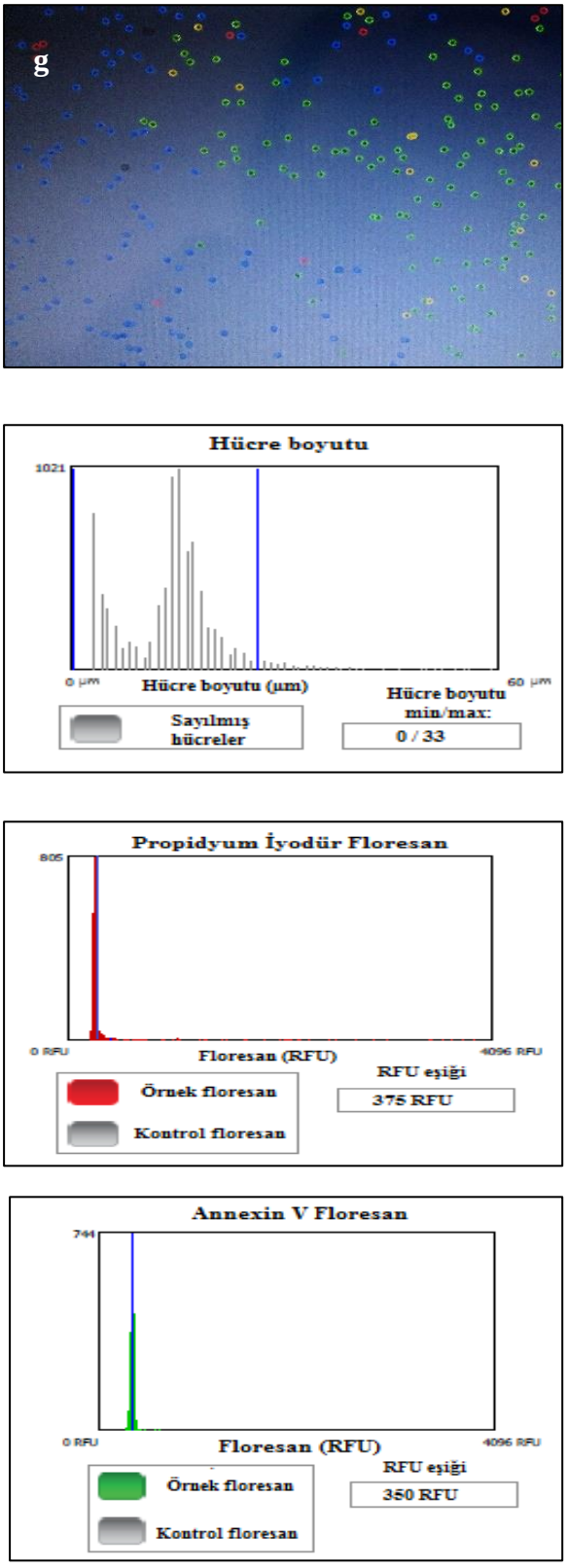
Şekil 4.34. N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) Ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu. **a)** Önce Naringin Sonra Doksorubisin Uygulaması, **b)** Önce Naringin Sonra Sisplatin Uygulaması.



Şekil 4.34. Devamı N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) Ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu. **c)** Önce Sisplatin Sonra Naringin Uygulaması, **d)** Önce Doksorubisin Sonra Naringin Uygulaması.



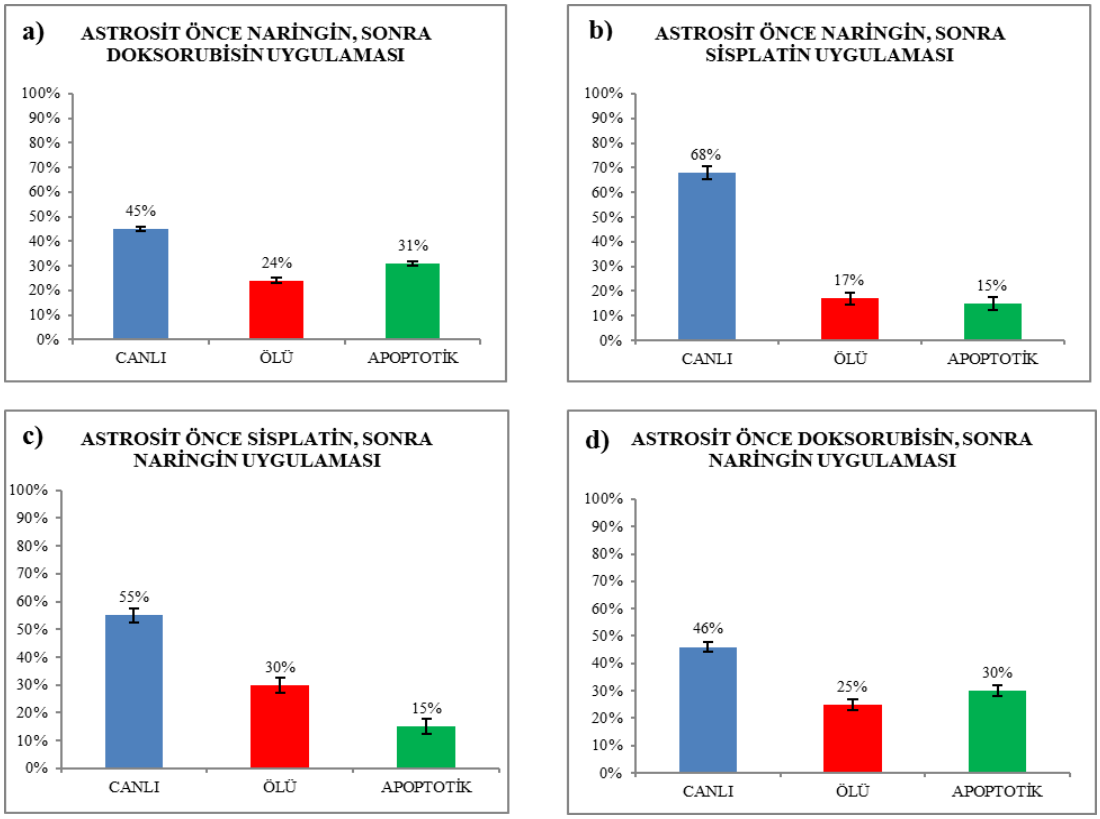
Şekil 4.34. Devamı N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) Ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu. **e)** Aynı Anda Naringin, Sisplatin Uygulaması, **f)** Aynı Anda Naringin, Doksorubisin Uygulaması.



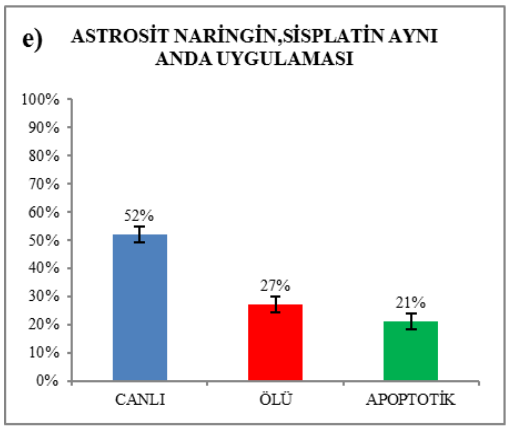
Şekil 4.34. Devamı N1E-115 Nöroblastom Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (Yeşil) Ve Propidyum İyodür (PI) (Kırmızı) Floresan Yoğunluğu. **g)** Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin

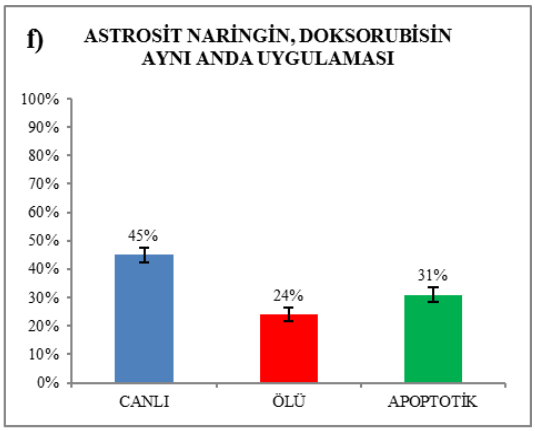
Uygulaması.

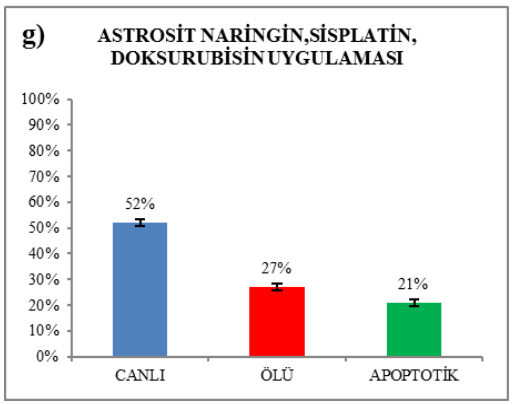
Astrosit hücrelerinde kombine olarak madde uygulaması yapılan gruplarda belirlenen canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri ile Anneksin V, Propidyum İyodür (PI) floresan yoğunluğu ve hücre boyutu histogramları Şekil 4.36'da verilmiştir. C8-D1A hücrelerinde canlı hücre oranının en yüksek değerinin önce naringin sonra sisplatin uygulamasında (% 68) olduğu, en düşük olduğu uygulamanın ise doksorubisin ile naringinin aynı anda uygulamasında (% 45) belirlenmiştir (Şekil 4.35.).



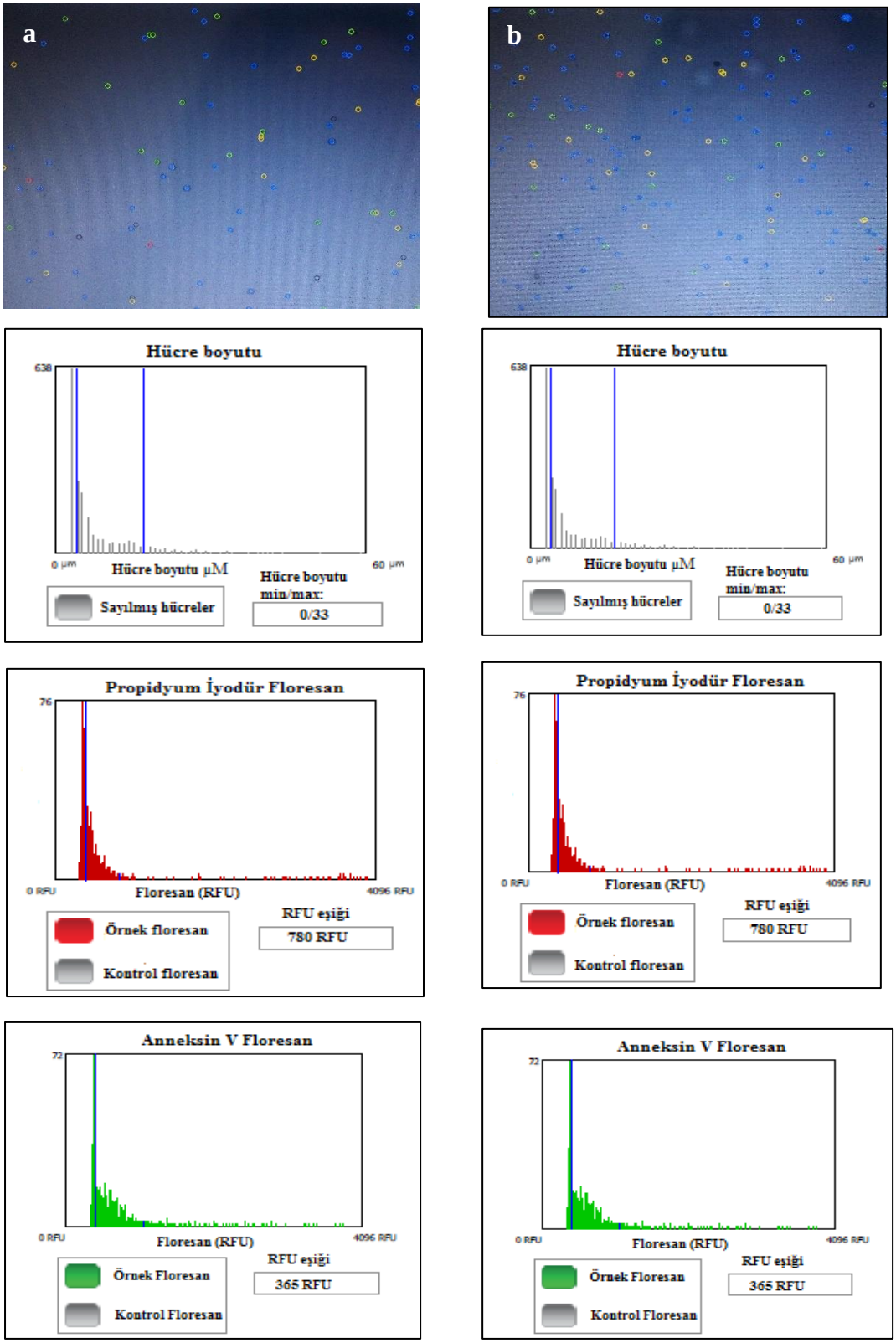
Şekil 4.35 C8-D1A Astrosit Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. **a)** Önce Naringin Sonra Doksorubisin Uygulaması, **b)** Önce Naringin Sonra Sisplatin Uygulaması, **c)** Önce Sisplatin Sonra Naringin Uygulaması, **d)** Önce Doksorubisin Sonra Naringin Uygulaması.



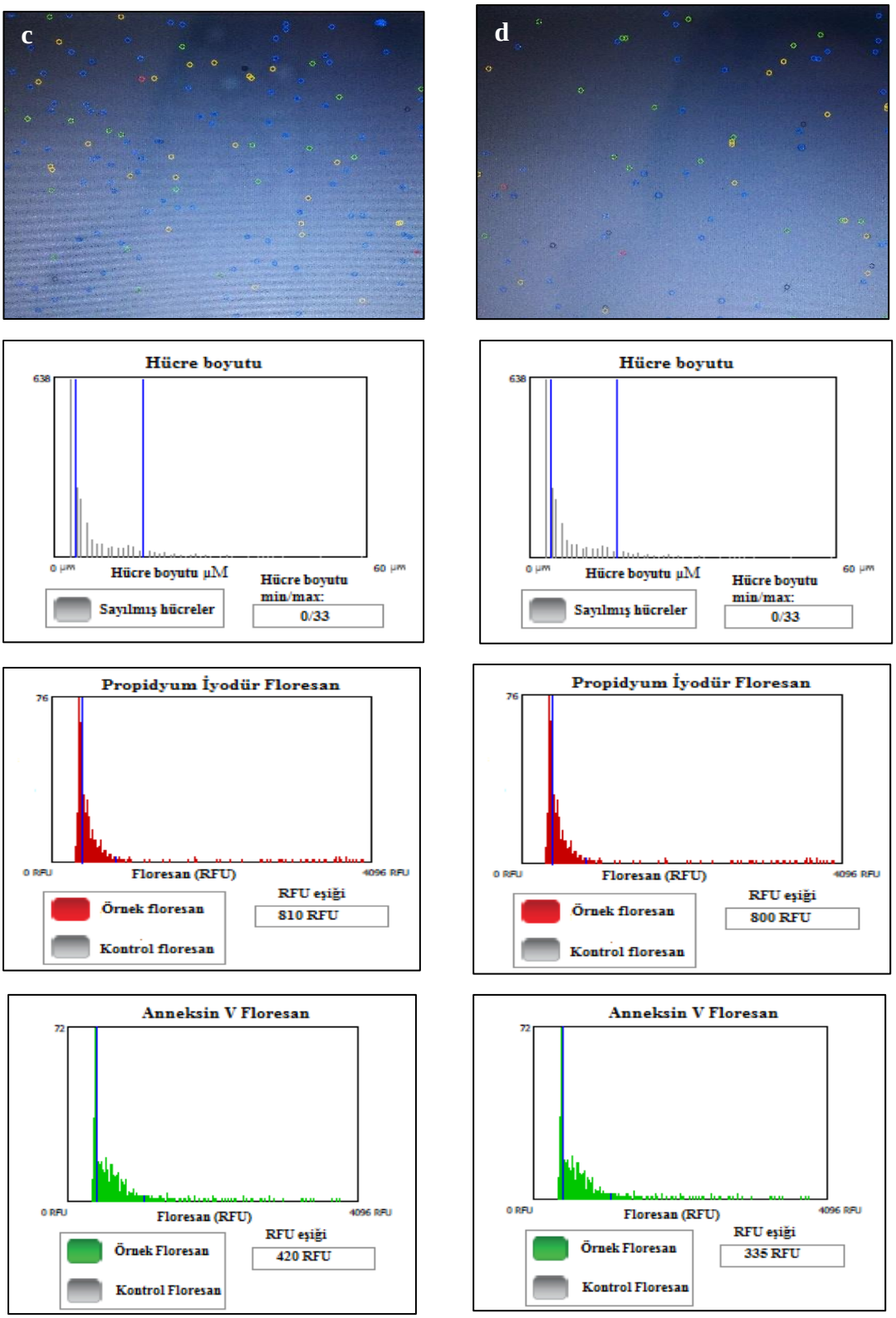




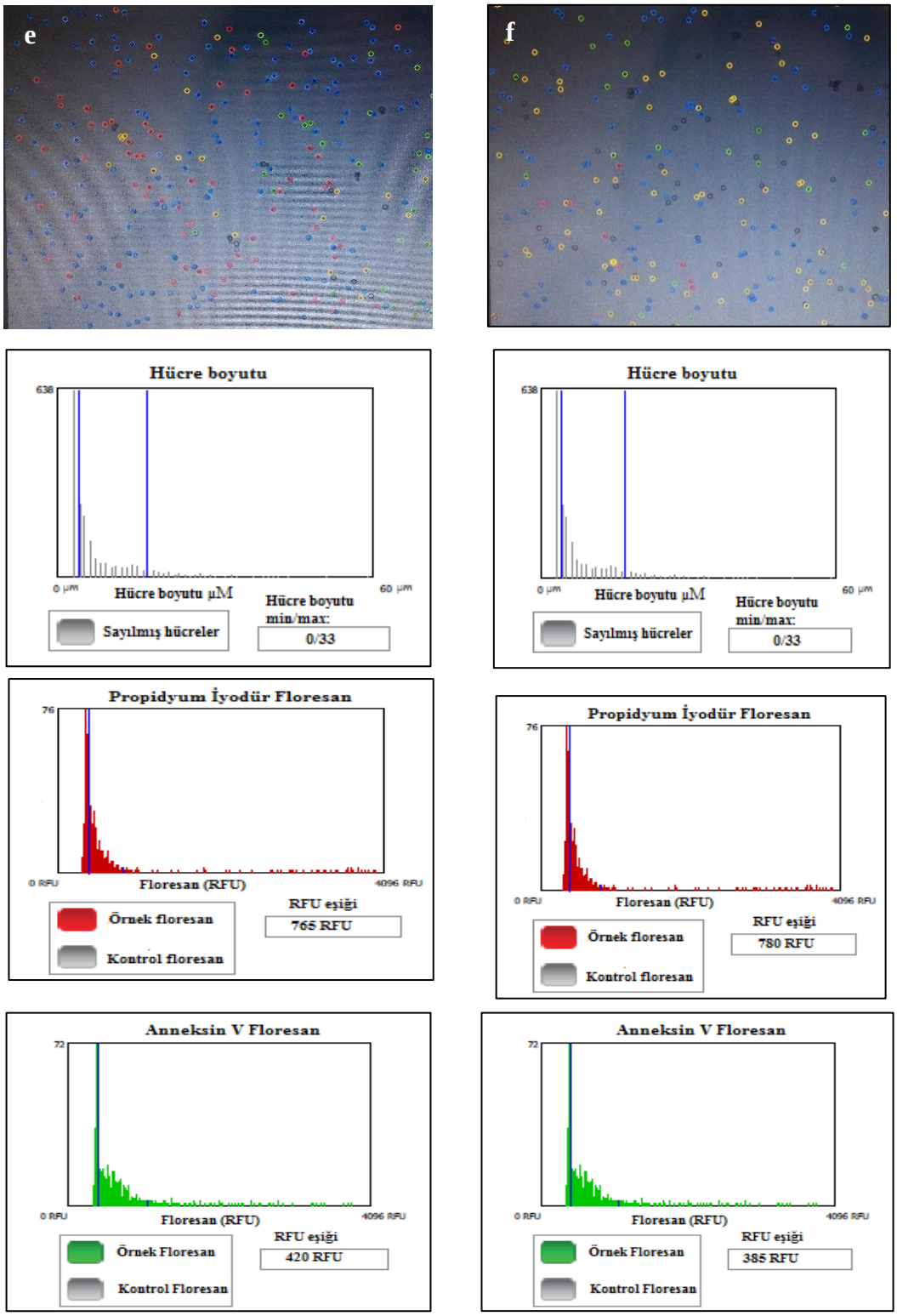
Şekil 4.35 Devamı C8-D1A Astrosit Hücre Serisinde Tali Görüntü Tabanlı Sitometri Kullanılarak Anneksin V/Propidyum İyodür İle Boyandıktan Sonra Saptanan Canlı (Mavi), Ölü (Kırmızı), Apoptotik (Yeşil) Hücrelerin Yüzdesi. **e)** Aynı Anda Naringin, Sisplatin Uygulaması, **f)** Aynı Anda Naringin, Doksorubisin Uygulaması, **g)** Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin Uygulaması.



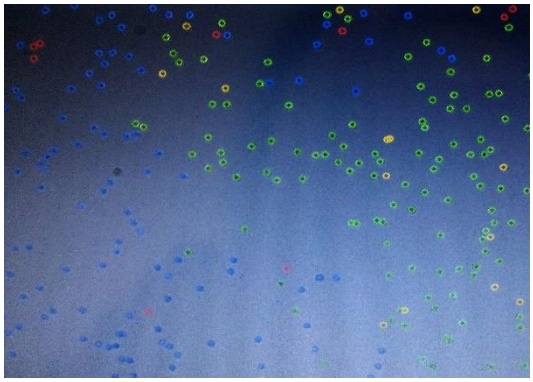
Şekil 4.36. C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) floresan yoğunluğu. **a)** Önce Naringin Sonra Doksorubisin Uygulaması, **b)** Önce Naringin Sonra Sisplatin Uygulaması.

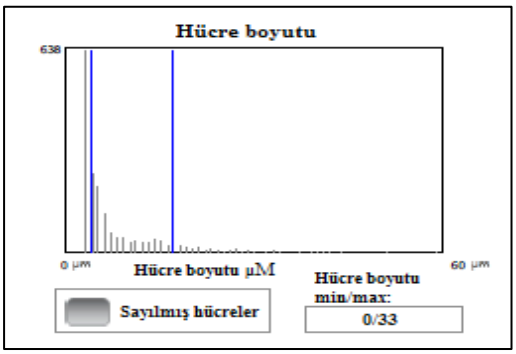


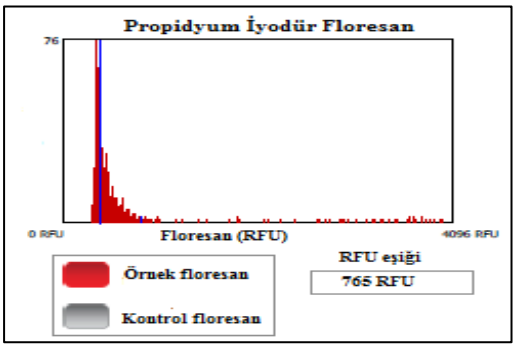
Şekil 4.36. Devamı C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) floresan yoğunluğu. **c)** Önce Sisplatin Sonra Naringin Uygulaması, **d)** Önce Doksorubisin Sonra Naringin Uygulaması.

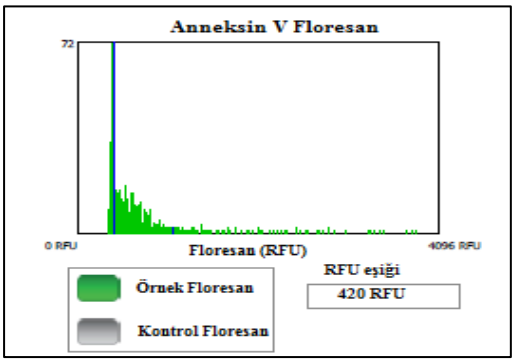


Şekil 4.36. Devamı C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) floresan yoğunluğu. **e)** Aynı Anda Naringin, Sisplatin Uygulaması, **f)** Aynı Anda Naringin, Doksorubisin Uygulaması.









Şekil 4.37. Devamı C8-D1A Astrosit Hücre Hattında, Tali Sitometre Canlı, Apoptotik Hücre Görüntüleri. Annexin V (yeşil) ve Propidyum İyodür (PI) (kırmızı) floresan yoğunluğu. **g)** Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin Uygulaması.

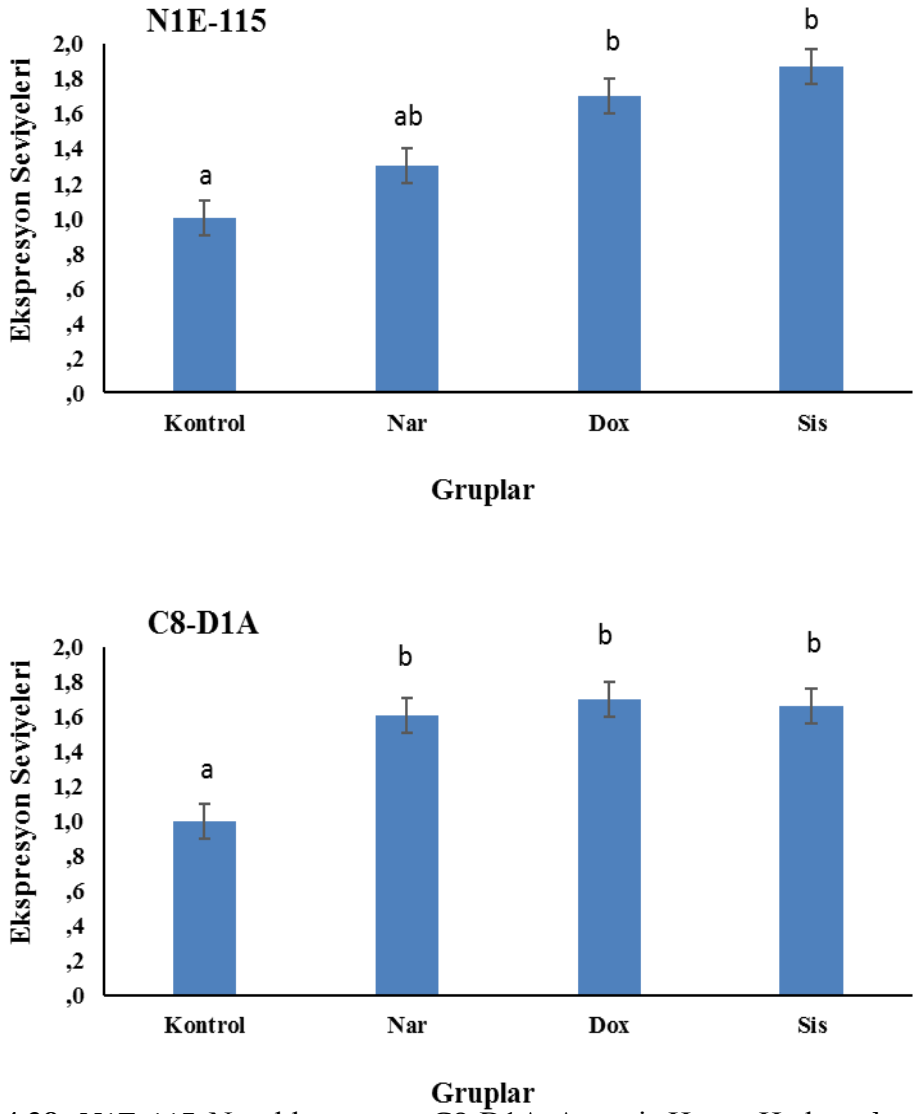
4.4. Tek Olarak Uygulanan Naringin, Doksorubisin ve Sisplatinin Gen İfadeleri Üzerine Etkisi

Çalışmada nöroblastom ve astrosit hücre hatlarından materyal ve yöntem kısmında anlatıldığı şekilde izole edilen RNA'lardan elde edilen, cDNA'lar kullanılarak gen ifadelerinde meydana gelen değişimler qRT-PCR metodu ile saptanmıştır. N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücrelerinde uygulamaların yapıldığı grupların, kontrol grubuna göre belirlenen genlerin ifadelerinde ki değişiklikler 3 tekrar olmak üzere çalışmaya alınmış ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

4.4.1. P53 Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre naringin, doksorubisin ve sisplatinin p53 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.38'de verilmiştir. Buna göre tüm uygulama gruplarında p53 gen ifadesinin hem nöroblastom hem de astrosit hücrelerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli artışlar gösterdiği belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında naringinin, doksorubisin ve sisplatinin tek başına uygulamalarında sırası ile kontrole göre 1.30±0.41, 1.70±0.10 ve 1.87±0.81 kat artış saptanmıştır. C8-D1A Astrosit hücre hattında ise naringin, doksorubisin ve sisplatinin tek başına uygulamalarında sırası ile kontrole göre 1.60±0.20, 1.69±0.54 ve 1.65±0.67 kat artış belirlenmiştir

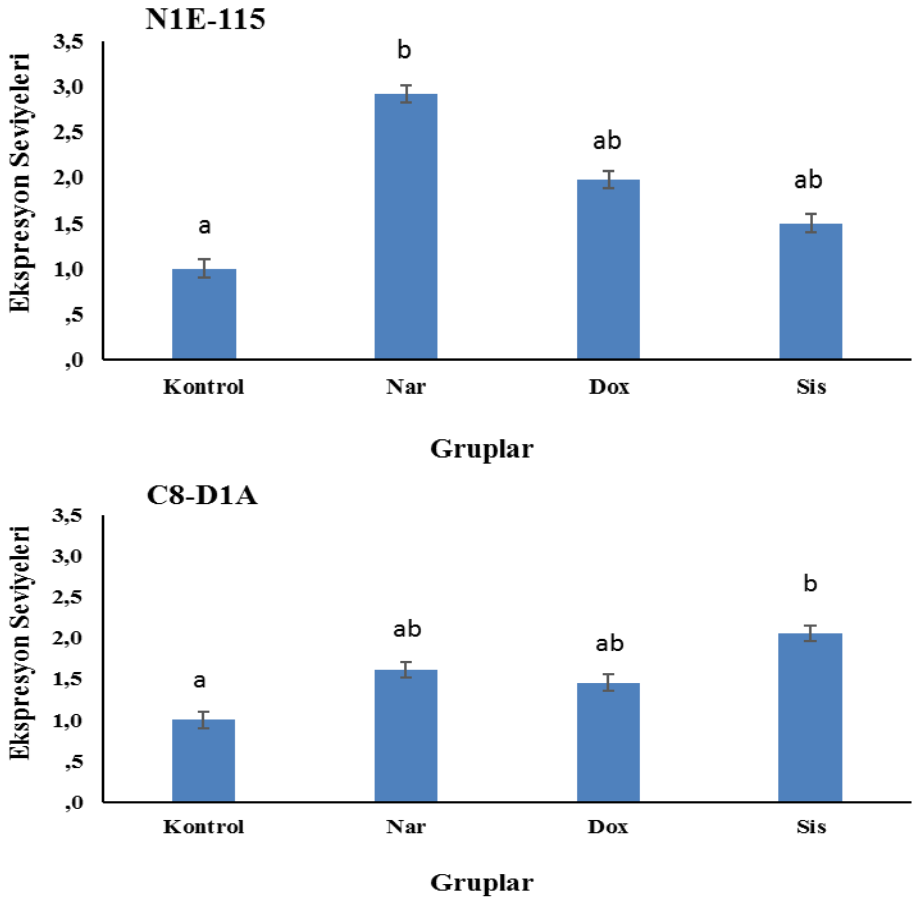


Şekil 4.38. N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında p53 Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, Ortalama±Standart Hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05).

4.4.2. Sitokrom-c Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre naringin, doksorubisin ve sisplatinin sitokrom-c gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.39'da verilmiştir. Buna göre tüm uygulama gruplarında sitokrom-c gen ifadesinin hem nöroblastom hem de astrosit hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında sırası ile kontrole göre 2.92±0.76, 1.98±0.84 ve 1.50±0.41 kat artış saptanmıştır. C8-D1A Astrosit hücre hattında ise naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında sırası ile kontrole göre 1.61±0.26, 1.45±0.03 ve 2.05±0.38 kat artış belirlenmiştir (Şekil 4.39.).

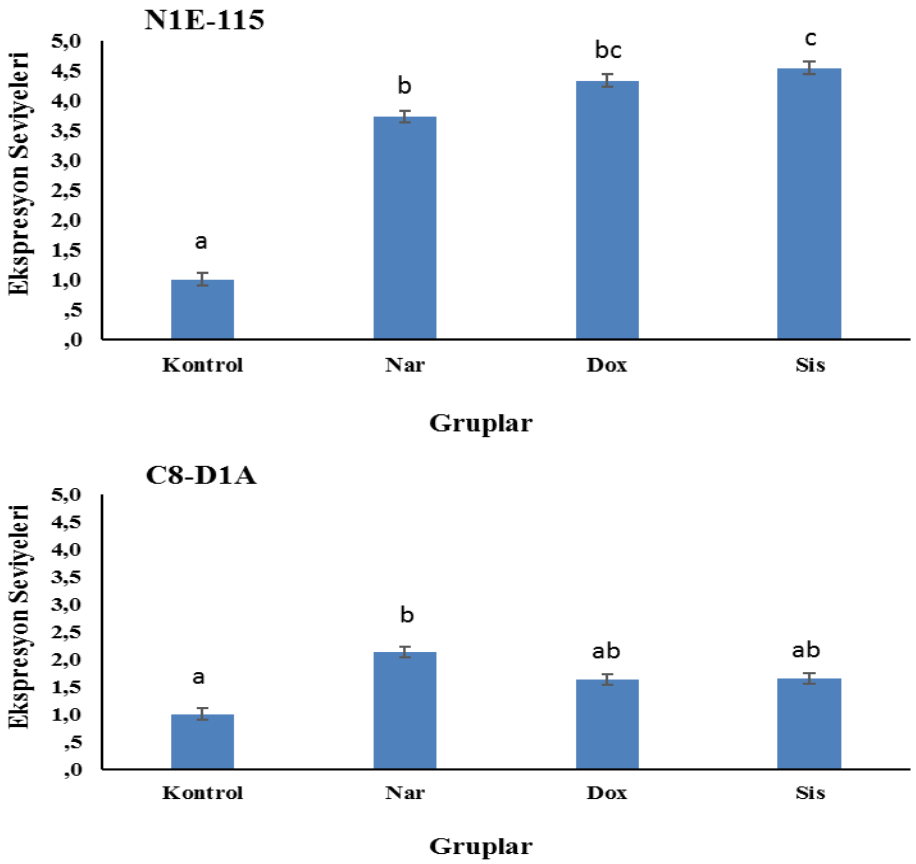


Şekil 4.39. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Sitokrom-c Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, Ortalama±Standart Hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf ile Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05).

4.4.3. Kaspaz-3 Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre naringin, doksorubisin ve sisplatinin kaspaz-3 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.40'da verilmiştir. Buna göre tüm uygulama gruplarında kaspaz-3 gen ifadesinin hem nöroblastom hem de astrosit hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında sırası ile kontrole göre 3.72±0.42, 4.37±0.68 ve 4.54±0.21 kat artış saptanmıştır. C8-D1A Astrosit hücre hattında ise naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında sırası ile kontrole göre 2.12±0.25, 1.62±0.52 ve 1.64±0.50 kat artış belirlenmiştir (Şekil 4.40.).

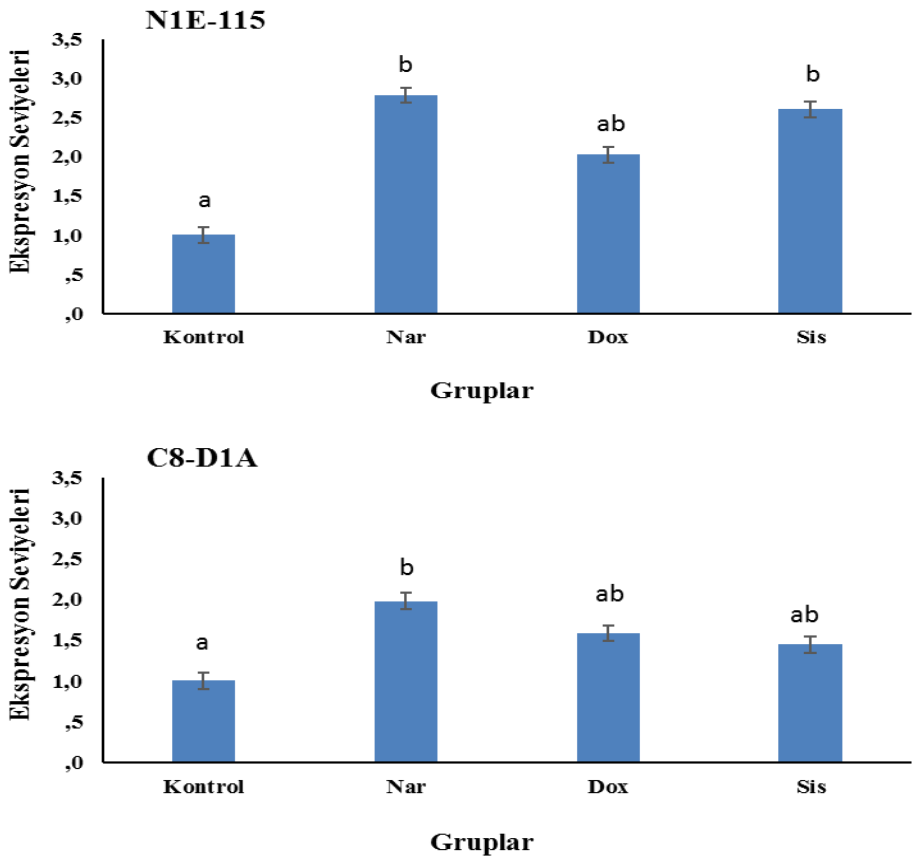


Şekil 4.40. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kaspaz-3 Gen İfadesinin Değişimi. Değişimi Relatif Kat Artış n=3, Ortalama±Standart Hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05).

4.4.4. Kaspaz-9 Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre naringin, doksorubisin ve sisplatinin kaspaz-9 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.41'de verilmiştir. Buna göre tüm uygulama gruplarında kaspaz-9 gen ifadesinin hem nöroblastom hem de astrosit hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında sırası ile kontrole göre 2.78 ±0.62, 2.03±1.45 ve 2.60±0.70 kat artış saptanmıştır. C8-D1A Astrosit hücre hattında ise naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında sırası ile kontrole göre 1.97±0.54, 1.58±0.57 ve 1.44±0.11 kat artış belirlenmiştir (Şekil 4.41.).

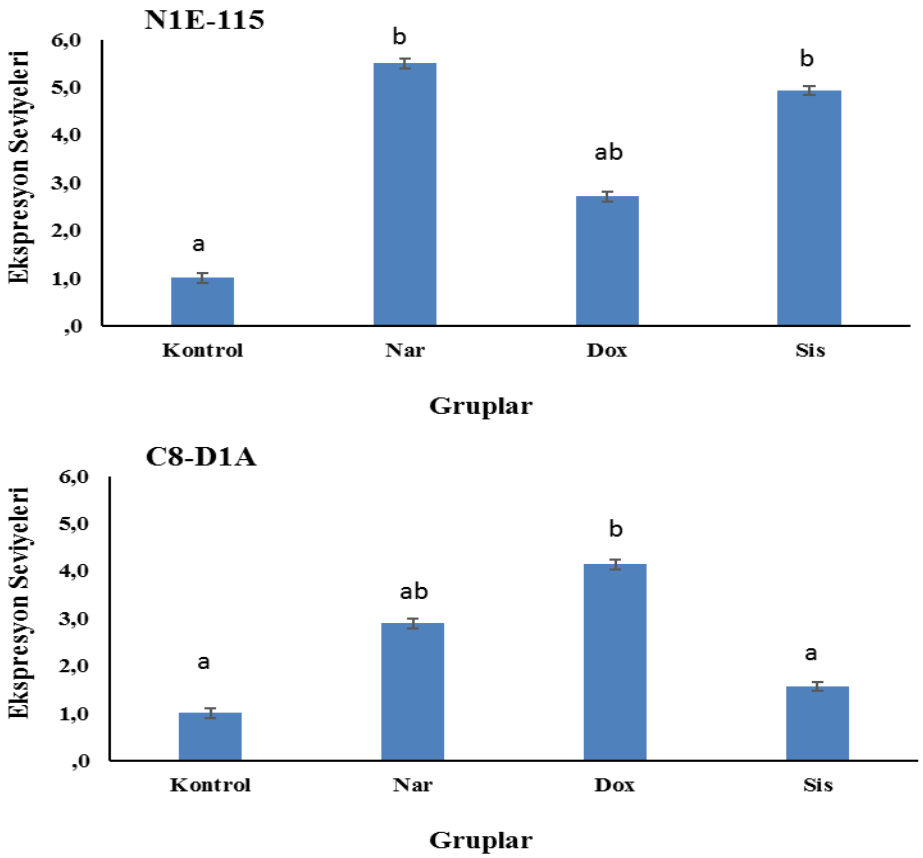


Şekil 4.41. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kaspaz-9 Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, Ortalama±Standart Hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05).

4.4.5. Bax Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre naringin, doksorubisin ve sisplatinin Bax gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.42'de verilmiştir. Buna göre tüm uygulama gruplarında Bax gen ifadesinin hem nöroblastom hem de astrosit hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında sırası ile kontrole göre 5.50 ±0.48, 2.71±1.12 ve 4.93±0.79 kat artış saptanmıştır. C8-D1A Astrosit hücre hattında ise naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında sırası ile kontrole göre 2.88±0.58, 4.13±0.07 ve 1.56±0.34 kat artış belirlenmiştir (Şekil 4.42.).

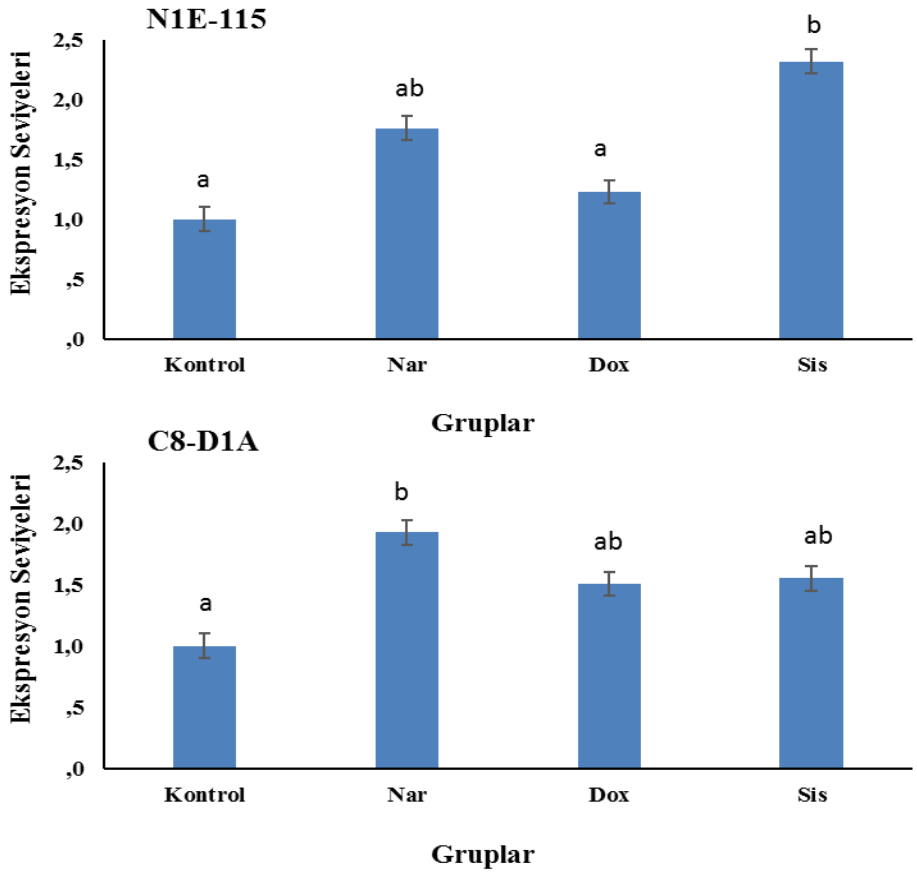


Şekil 4.42. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Bax Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, Ortalama±Standart Hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05).

4.4.6. Bcl-2 Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre naringin, doksorubisin ve sisplatinin Bcl-2 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.43'de verilmiştir. Buna göre tüm uygulama gruplarında Bcl-2 gen ifadesinin hem nöroblastom hem de astrosit hücre hattında kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği belirlenmiştir.

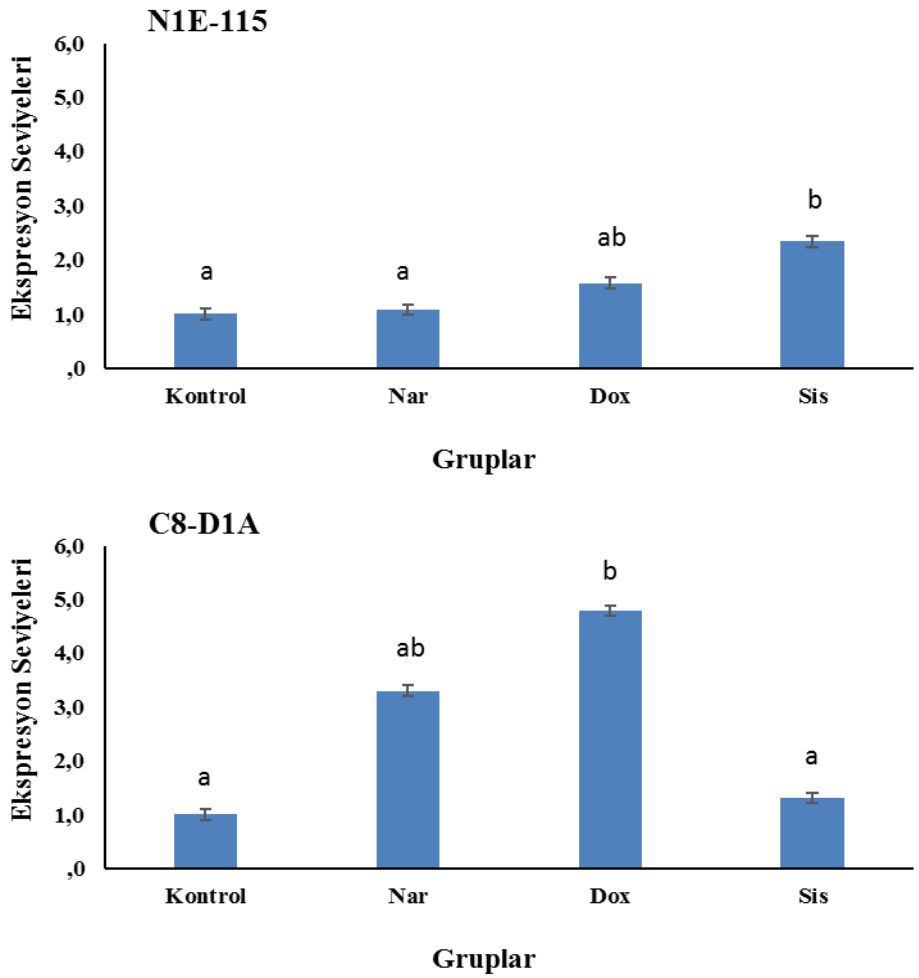
Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında sırası ile kontrole göre 1.76±0.10, 1.23±0.12 ve 2.32±0.46 kat artış saptanmıştır. C8-D1A astrosit hücre hattında ise naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında sırası ile kontrole göre 1.92±0.57, 1.50±0.50 ve 1.55±0.45 kat artış belirlenmiştir (Şekil 4.43.).



Şekil 4.43. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Bcl-2 Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, Ortalama±Standart Hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05).

4.4.7. Tümör Nekroz Faktör Alfa Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre naringin, doksorubisin ve sisplatinin tnf-α gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.44'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında, Tnf-α gen ifadesinde naringin uygulamasında kontrole göre istatistiksel olarak fark görülmezken, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında ise sırası ile kontrole göre 1.56±0.40 ve 2.34±0.24 kat artış saptanmıştır. C8-D1A Astrosit hücre hattında ise naringin ve doksorubisin uygulamasında kontrole göre sırası ile 3.29±0.11 ve 4.78± 0.57, 1.30± 0.12 kat artış saptanmıştır (Şekil 4.44.).

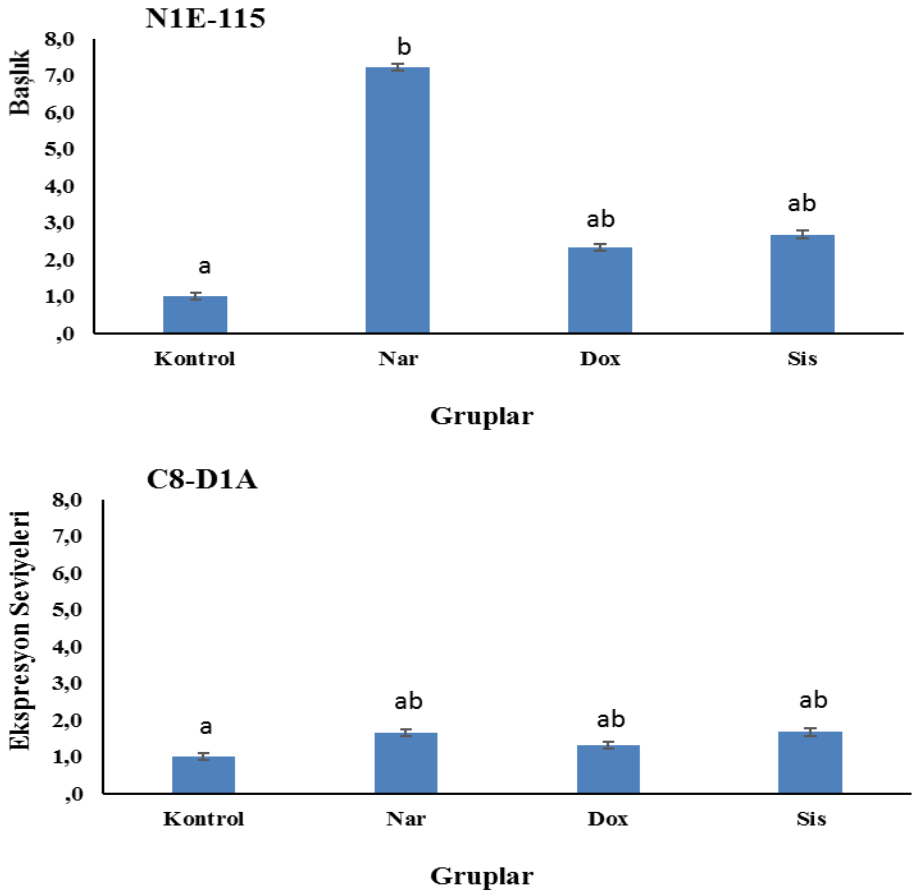


Şekil 4.44. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında TNF-α Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, Ortalama±Standart Hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05).

4.4.8. $p21^{cip1}$ Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre naringin, doksorubisin ve sisplatinin $p21^{cip1}$ gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.45'te verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında $p21^{cip1}$ gen ifadesinde en belirgin artış naringinin uygulanmasında kontrole göre 7.22±0.64 kat olarak belirlenmiştir. Doksorubisin ve sisplatin uygulamalarında ise gen ifadesinde kontrole göre sırası ile 2.32±0.32 ve 2.68±0.06 kat artış saptanmıştır (Şekil 4.45.). C8-D1A Astrosit hücre hattında gen ifadesinde tüm uygulama gruplarında kontrole göre artış belirlenmiş, ancak uygulama gruplarının gen ifadelerinin birbiri arasında istatistiksel olarak fark göstermediği saptanmıştır (Şekil 4.45.).

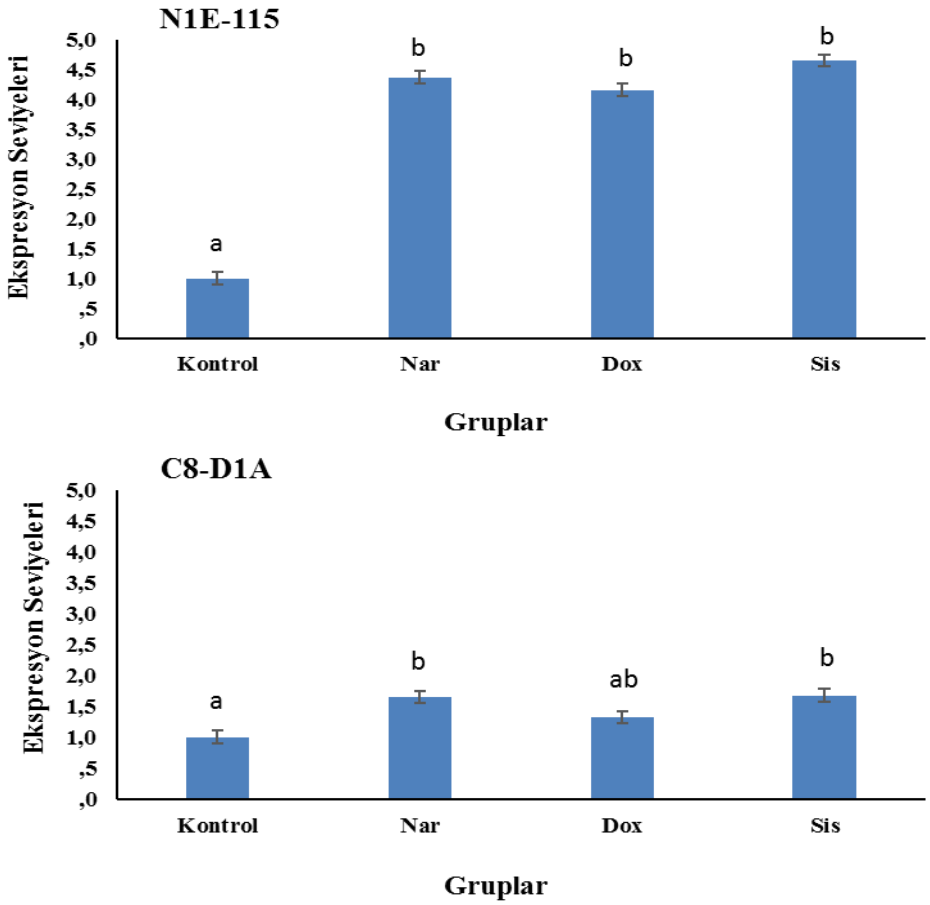


Şekil 4.45. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında $p21^{cip1}$ Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, Ortalama±Standart Hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, $P \leq 0.05$).

4.4.9. $p27^{kip1}$ Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre naringin, doksorubisin ve sisplatinin $p27^{kip1}$ gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.46'da verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında naringin, doksorubisin ve sisplatin uygulamalarının gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli artışa neden olduğu ve bu artışların sırası ile 4.36±0.23, 4.15±0.93 ve 4,64±0.48 kat olduğu saptanmıştır (Şekil 4.46.) C8-D1A Astrosit hücre hattında ise $p27^{kip1}$ gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli artış göstermesine karşın gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.46.).



Şekil 4.46. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında $p27^{kip1}$ Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, Ortalama±Standart Hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, $P \leq 0.05$).

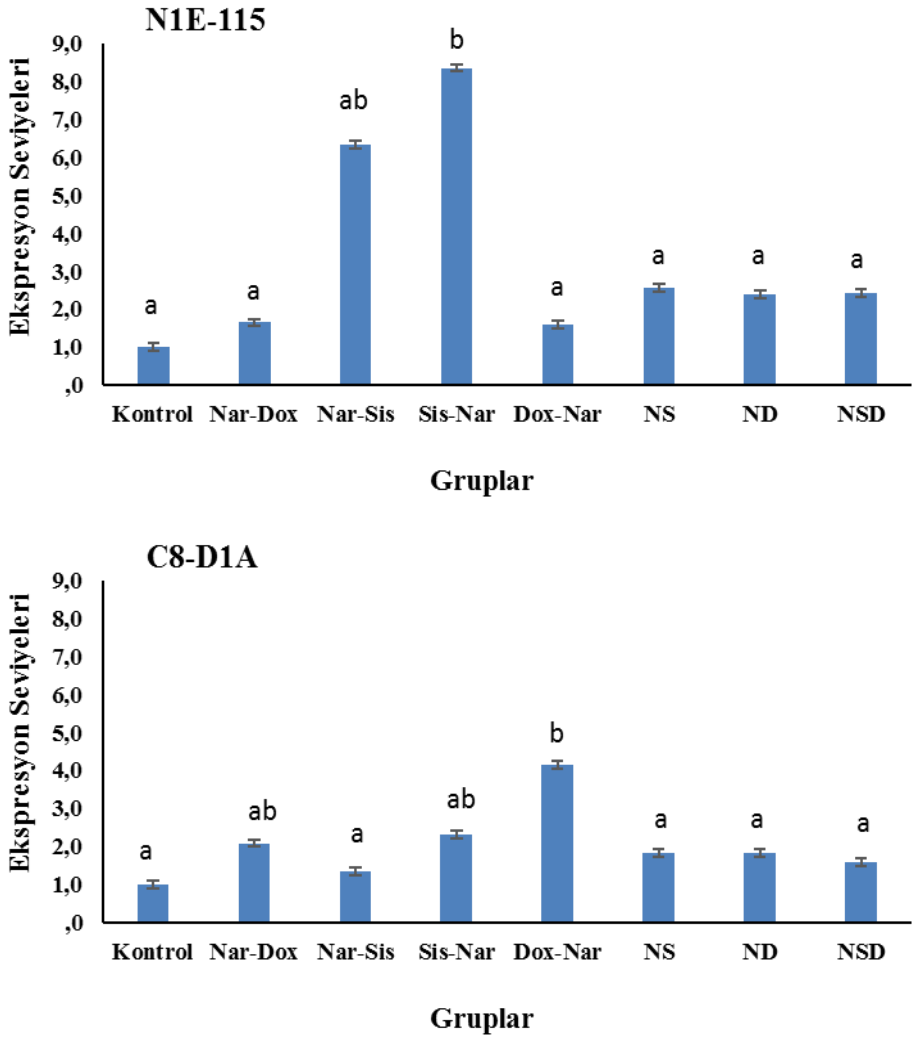
4.5. Kombine Halde Uygulanan Naringin, Doksorubisin Ve Sisplatinin Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi

Çalışmada nöroblastom ve astrosit hücre hatlarından materyal ve yöntem kısmında anlatıldığı şekilde izole edilen RNA'lardan elde edilen, cDNA'lar kullanılarak gen ifadelerinde meydana gelen değişimler qRT-PCR metodu ile saptanmıştır. N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücrelerinde uygulamaların yapıldığı grupların, kontrol grubuna göre belirlenen genlerin ifadelerinde meydana gelen değişiklikler 3 tekrar olmak üzere çalışmaya alınmış ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

4.5.1. p53 Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kombine halde uygulanan naringin, doksorubisin ve sisplatinin p53 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.47'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında, p53 gen ifadesinde en belirgin artışın önce sisplatin ardından naringin uygulanmasında kontrole göre 8.35±0.41 kat olarak belirlendiği bunu önce naringin ardından sisplatin uygulanmasının kontrole göre 6.34±0.11 kat ile takip ettiği saptanmıştır (Şekil 4.47). Diğer uygulama gruplarında ise kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptanmıştır ($P \geq 0.05$).

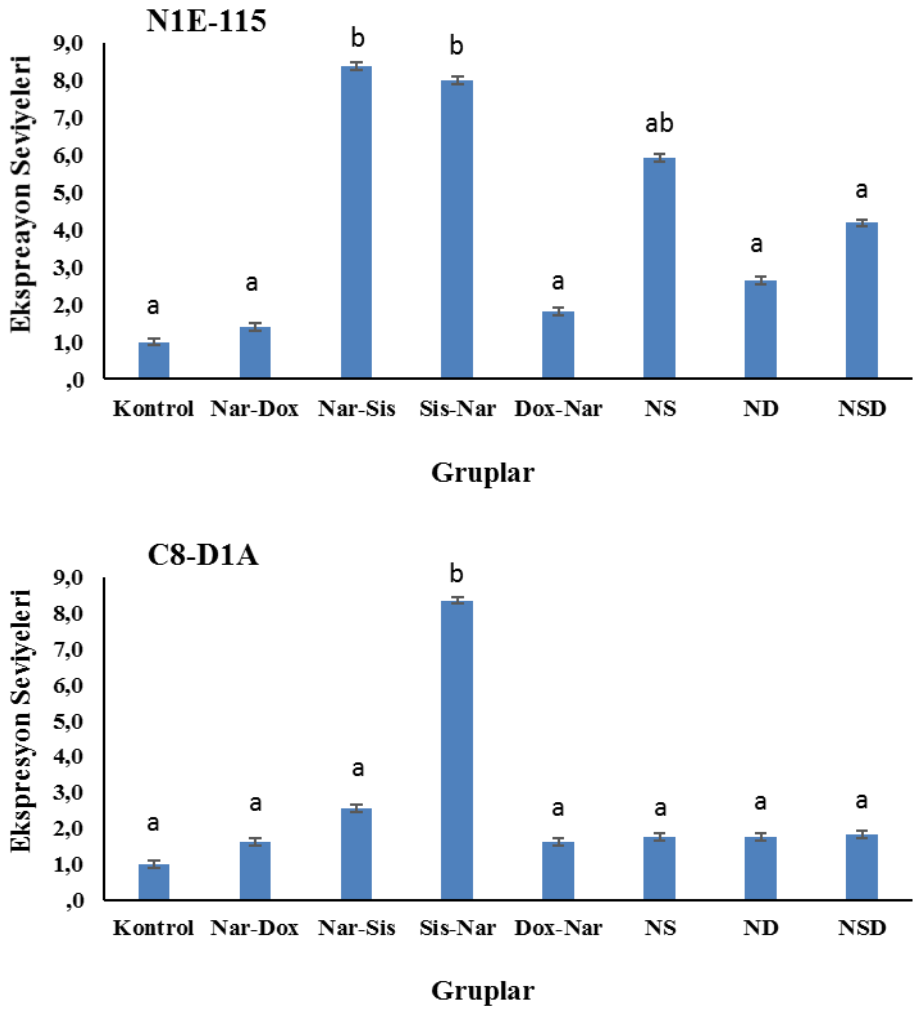
C8-D1A Astrosit hücre hattında p53 gen ifadesinde en belirgin artışın kontrole göre 4.16±0.94 kat ile önce doksorubisin ardından naringin uygulamasında meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 4.47). Diğer uygulama gruplarında ise p53 gen ifadesinde kontrole göre istatistik olarak önemli artışların olmasına rağmen (önce naringin ardından sisplatin uygulanması hariç)grupların kendi arasında istatistiksel fark göstermediği saptanmıştır (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında p53 Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, ortalama±standart hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05). Nar-Dox: Önce Naringin Ardından Doksorubisin, Nar-Sis: Önce Naringin Ardından Sisplatin, Sis-Nar: Önce Sisplatin Ardından Naringin, Dox-Nar: Önce Doksorubisin Ardından Naringin, NS: Aynı Anda Naringin-Sisplatin, ND: Aynı Anda Naringin-Doksorubisin, NSD: Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin.

4.5.2. Sitokrom-c Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kombine halde uygulanan naringin, doksorubisin ve sisplatinin Sitokrom-c gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.48'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında, sitokrom-c gen ifadesinde en belirgin artışların önce naringin ardından sisplatin (kontrole göre 8.38±0.64 kat) ve önce sisplatin ardından naringin, sisplatin ardından naringin (kontrole göre 8.01±0.24 kat) uygulamalarında olduğu saptanmıştır (Şekil 4.48). Diğer uygulama gruplarında ise kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptanmıştır ($P \geq 0.05$). C8-D1A Astrosit hücre hattında ise sitokrom-c gen ifadesinin sadece önce sisplatin ve ardından naringin uygulaması yapılan grupta kontrole göre 8.35±0.90 kat ile istatistiksel olarak önemli düzeyde artış gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.48.) gözlenmiştir.

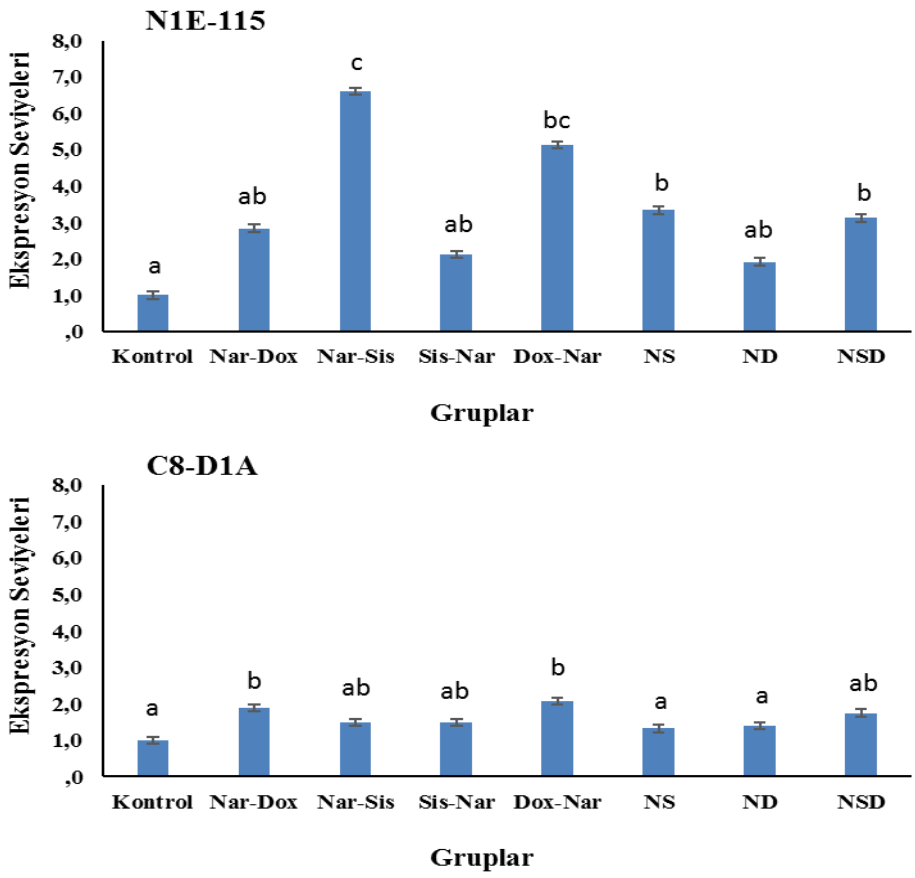


Şekil 4.48. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Sitokrom-c Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, ortalama±standart hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05). Nar-Dox: Önce Naringin Ardından Doksorubisin, Nar-Sis: Önce Naringin Ardından Sisplatin, Sis-Nar: Önce Sisplatin Ardından Naringin, Dox-Nar: Önce Doksorubisin Ardından Naringin, NS: Aynı Anda Naringin-Sisplatin, ND: Aynı Anda Naringin-Doksorubisin, NSD: Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin.

4.5.3. Kaspaz-3 Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kombine halde uygulanan naringin, doksorubisin ve sisplatinin kaspaz-3 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.49'da verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre kaspaz-3 gen ifadesinin N1E-115 nöroblastom hücre hattında, en belirgin artışın önce naringin ardından sisplatin uygulanmasında kontrole göre 6.61±0.21 kat ve önce doksorubisin ardından naringin uygulamasında kontrole göre 5.14±0.74 kat olduğu belirlenmiştir. C8-D1A Astrosit hücre hattında gen ifadesinde en belirgin artışın önce doksorubisin ardından naringin uygulamasında kontrole göre 2.08±0.95 kat olduğu saptanmıştır (Şekil 4.49.)

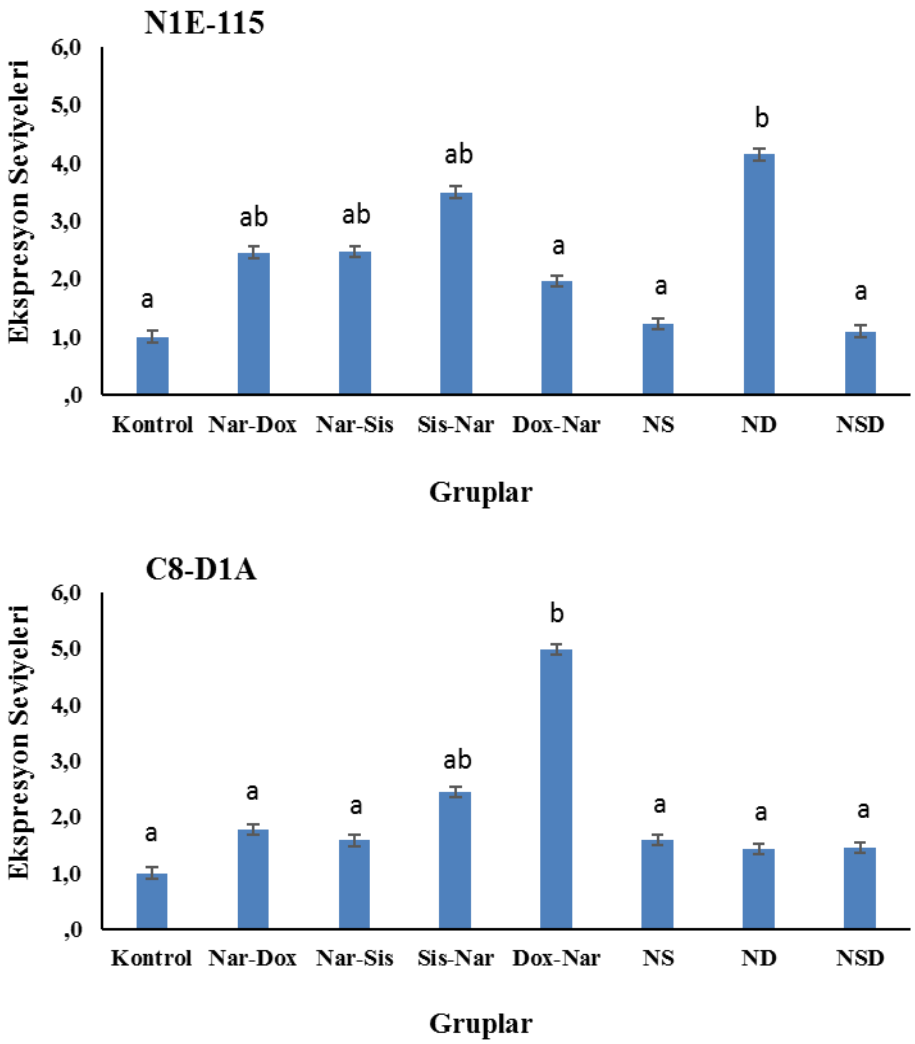


Şekil 4.49. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kaspaz-3 Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, ortalama±standart hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05). Nar-Dox: Önce Naringin Ardından Doksorubisin, Nar-Sis: Önce Naringin Ardından Sisplatin, Sis-Nar: Önce Sisplatin Ardından Naringin, Dox-Nar: Önce Doksorubisin Ardından Naringin, NS: Aynı Anda Naringin-Sisplatin, ND: Aynı Anda Naringin-Doksorubisin, NSD: Aynı Anda Naringin-Sisplatin-

Doksorubisin.

4.5.4. Kaspaz-9 Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kombine halde uygulanan naringin, doksorubisin ve sisplatinin kaspaz-9 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.50'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre N1E-115 nöroblastom hücre hattında kaspaz-9 gen ifadesinin genellikle artış gösterdiği ve en belirgin artışın aynı anda doksorubisin-naringin uygulamasında kontrole göre 4.14±0.32 kat olduğu ve bunu kontrole göre 3.48±0.52 kat artış ile önce sisplatin ardından naringin uygulamasının takip ettiği belirlenmiştir. C8-D1A Astrosit hücre hattında gen ifadesinde en belirgin artışın önce doksorubisin ardından naringin uygulamasında (kontrole göre 4.97±0.21 kat) olduğu ve bunu önce sisplatin ardından naringin uygulanmasının (kontrole göre 2.44±0.80 kat) takip ettiği diğer gruplarda ise kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.50.).



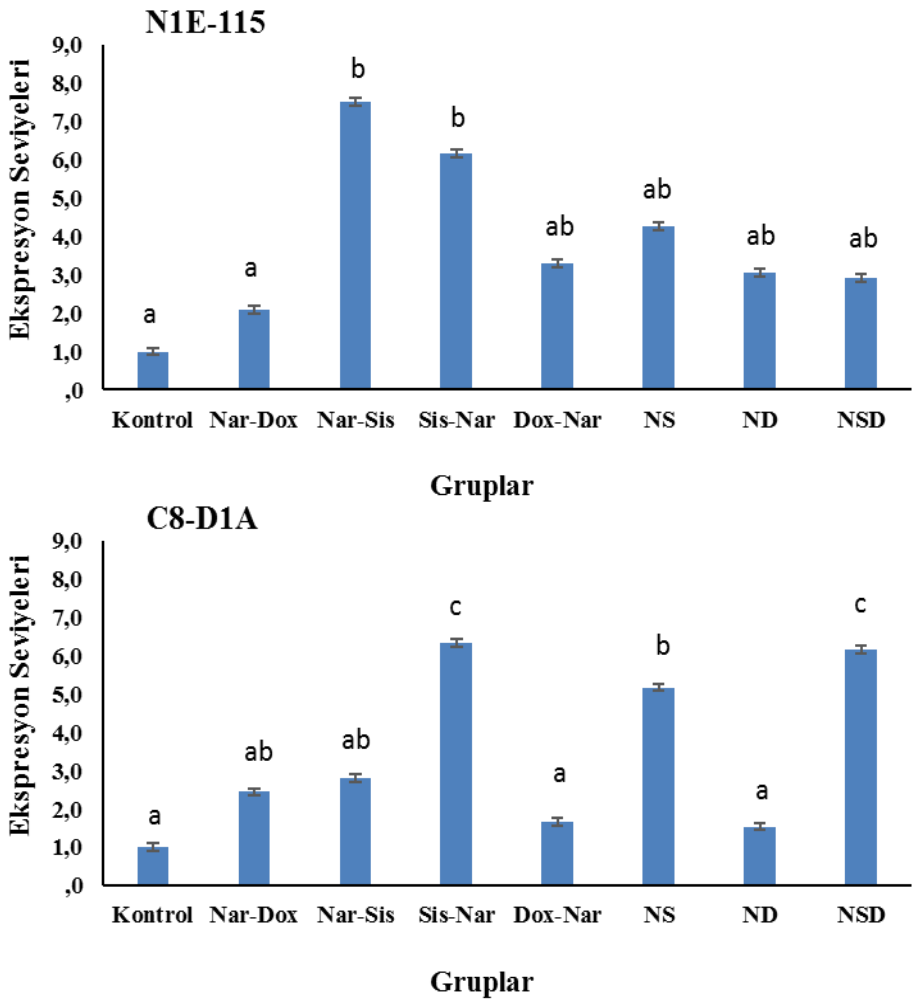
Şekil 4.50. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Kaspaz-9 Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, ortalama±standart hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05). Nar-Dox: Önce Naringin Ardından Doksorubisin, Nar-Sis: Önce Naringin Ardından Sisplatin, Sis-Nar: Önce Sisplatin Ardından Naringin, Dox-Nar: Önce Doksorubisin Ardından Naringin, NS: Aynı Anda Naringin-Sisplatin, ND: Aynı Anda Naringin-Doksorubisin, NSD: Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin.

4.5.5. Bax Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kombine halde uygulanan naringin, doksorubisin ve sisplatinin Bax gen ifadesinde meydana

getirdiği değişimler Şekil 4.51.'te verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında Bax gen ifadesinde en belirgin artışın önce naringin ardından sisplatin uygulanmasında (kontrole göre 7.53±0.43 kat) olduğu ve bunu önce sisplatin ardından naringin uygulanmasının (kontrole göre 6.16±0.47 kat), aynı anda sisplatin-naringin uygulamasının (kontrole göre 4.28±1.03 kat) izlediği belirlenmiştir. C8-D1A Astrosit hücre hattında, Bax gen ifadesinde önce sisplatin ardından naringin (kontrole göre 6.32±0.56 kat), aynı anda sisplatin-naringin (kontrole göre 5.17±0.94 kat) ve aynı anda naringin-sisplatin-doksorubisin uygulamalarında (kontrole göre 6.15±0.85 kat) kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.51.)

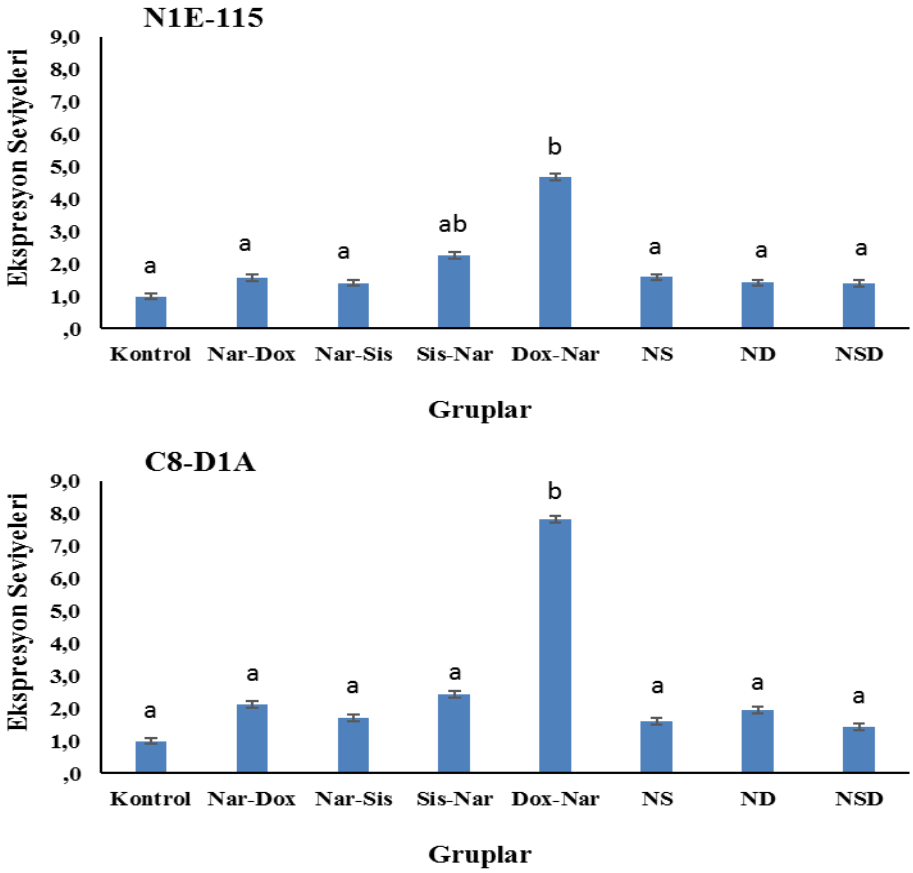


Şekil 4.51. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Bax Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, ortalama±standart hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05). Nar-Dox: Önce Naringin Ardından Doksorubisin, Nar-Sis: Önce

Naringin Ardından Sisplatin, Sis-Nar: Önce Sisplatin Ardından Naringin, Dox-Nar: Önce Doksorubisin Ardından Naringin, NS: Aynı Anda Naringin-Sisplatin, ND: Aynı Anda Naringin-Doksorubisin, NSD: Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin.

4.5.6. Bcl-2 Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kombine halde uygulanan naringin, doksorubisin ve sisplatinin Bcl-2 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.52'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında Bcl-2 gen ifadesinin sadece önce sisplatin ardından naringin uygulanmasında (kontrole göre 2.26±0.74 kat) ve önce doksorubisin ardından naringin uygulamasında (kontrole göre 4.69±0.89 kat) istatistiksel olarak önemli artışa sebep olduğu belirlenmiştir. C8-D1A Astrosit hücre hattında ise Bcl-2 gen ifadesinin önce doksorubisin ardından naringin uygulaması (kontrole göre 7.83±0.31 kat artış) hariç, istatistiksel olarak önemli bir değişim göstermediği saptanmıştır (Şekil 4.52.) gözlenmiştir.

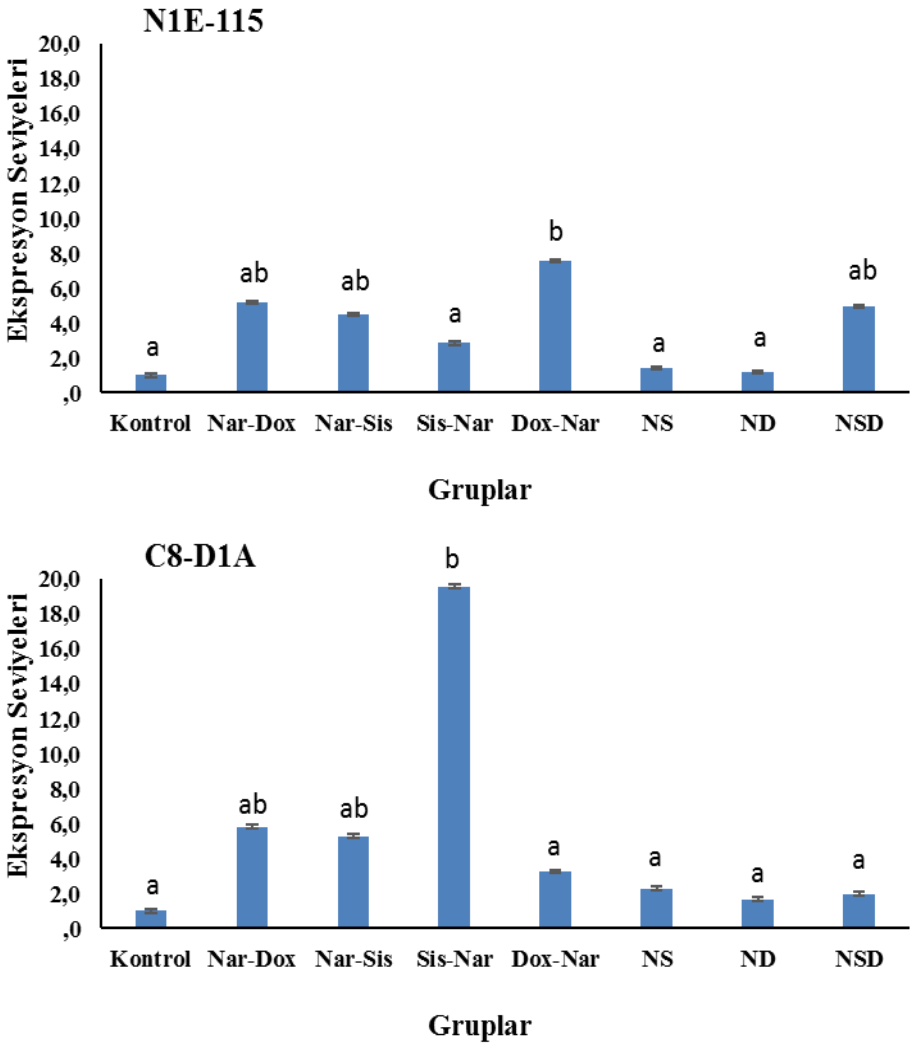


Şekil 4.52. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında Bcl-2 Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, ortalama±standart hata * Her Bir Uygulamada

Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05 Nar-Dox: Önce Naringin Ardından Doksorubisin, Nar-Sis: Önce Naringin Ardından Sisplatin, Sis-Nar: Önce Sisplatin Ardından Naringin, Dox-Nar: Önce Doksorubisin Ardından Naringin, NS: Aynı Anda Naringin-Sisplatin, ND: Aynı Anda Naringin-Doksorubisin, NSD: Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin.

4.5.7. Tümör Nekroz Faktör Gen İfadesi

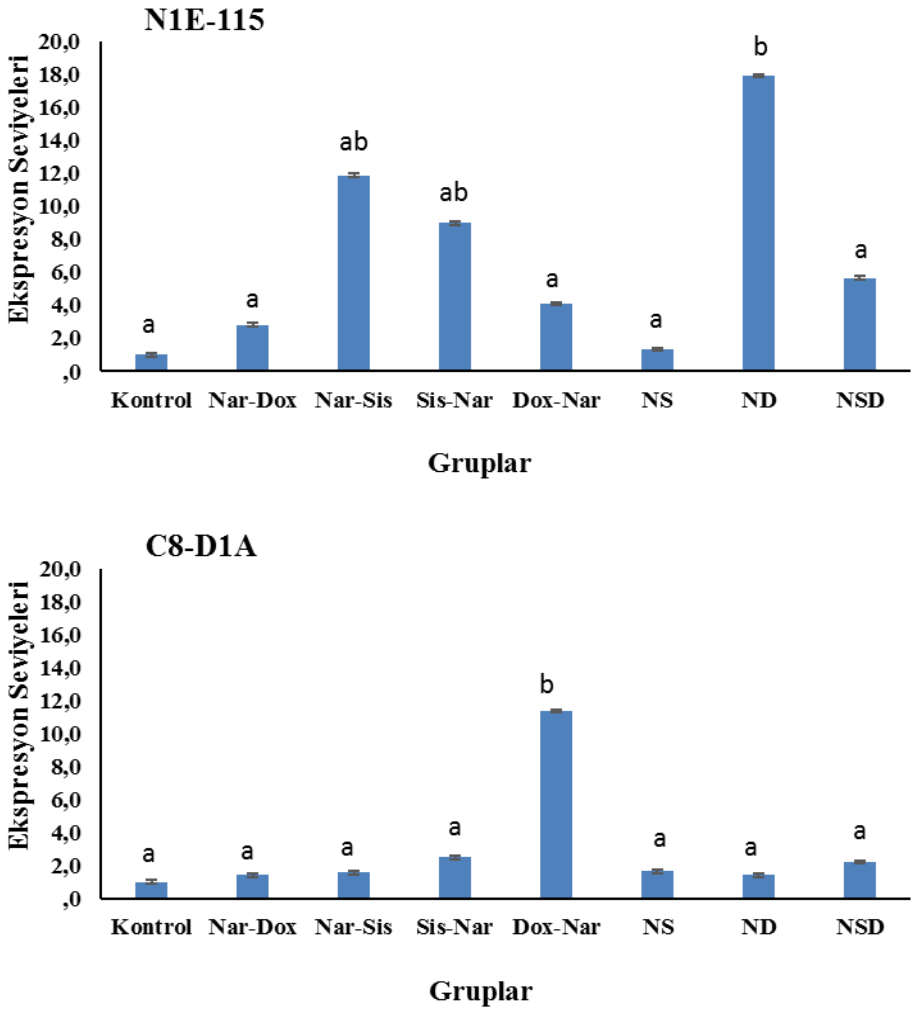
N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kombine halde uygulanan naringin, doksorubisin ve sisplatinin Tnf-α gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.53'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında Tnf-α gen ifadesinin aynı anda sisplatin-naringin ve aynı anda doksorubisin-naringin uygulamaları hariç diğer tüm gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak önemli artışlar gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.53). C8-D1A Astrosit hücre hattında ise, önce naringin sonra doksorubisin uygulanmasında kontrole göre 5.82±0.87 kat artış, önce naringin ardından sisplatin uygulanmasında kontrole göre 5.28±0.32 kat artış, önce sisplatin ardından naringin uygulanmasında kontrole göre 19.59±0.84 kat artış, önce doksorubisin ardından naringin uygulamasında kontrole göre 3.27±0.54 kat artış, aynı anda sisplatin-naringin uygulamasında kontrole göre 2.28±0.88 kat artış, aynı anda doksorubisin-naringin uygulamasında kontrole göre 1.66±0.35 kat artış, aynı anda naringin-sisplatin-doksorubisin uygulamasında kontrole göre 1.98±0.19 kat artış (Şekil 4.53.) gözlenmiştir.



Şekil 4.53. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında TNF-α Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, ortalama±standart hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05). Nar-Dox: Önce Naringin Ardından Doksorubisin, Nar-Sis: Önce Naringin Ardından Sisplatin, Sis-Nar: Önce Sisplatin Ardından Naringin, Dox-Nar: Önce Doksorubisin Ardından Naringin, NS: Aynı Anda Naringin-Sisplatin, ND: Aynı Anda Naringin-Doksorubisin, NSD: Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin.

4.5.8. $p21^{cip1}$ Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kombine halde uygulanan naringin, doksorubisin ve sisplatinin $p21^{cip1}$ gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.54'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre N1E-115 Nöroblastom hücre hattında $p21^{cip1}$ gen ifadesinde en belirgin artışın aynı anda doksorubisin-naringin uygulamasının (kontrole göre 17.92±0.44 kat) ve bunu takiben önce naringin ardından sisplatin uygulanmasının (kontrole göre 11.9±0.20 kat), önce sisplatin ardında naringin uygulamasının (kontrole göre 8.99±0.51 kat), naringin-sisplatin-doksorubisin uygulamasının (kontrole göre 5.67±0.14 kat), önce doksorubisin ardından naringin uygulamasının (kontrole göre 4.08±0.14 kat) izlediği belirlenmiştir (Şekil 4.54.). C8-D1A Astrosit hücre hattında ise $p21^{cip1}$ gen ifadesinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli artışın sadece önce doksorubisin ardından naringin uygulamasında kontrole göre 11.34±0.57 kat olarak belirlendiği ve diğer uygulamalarda istatistiksel olarak önemli bir değişimin olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.54.).

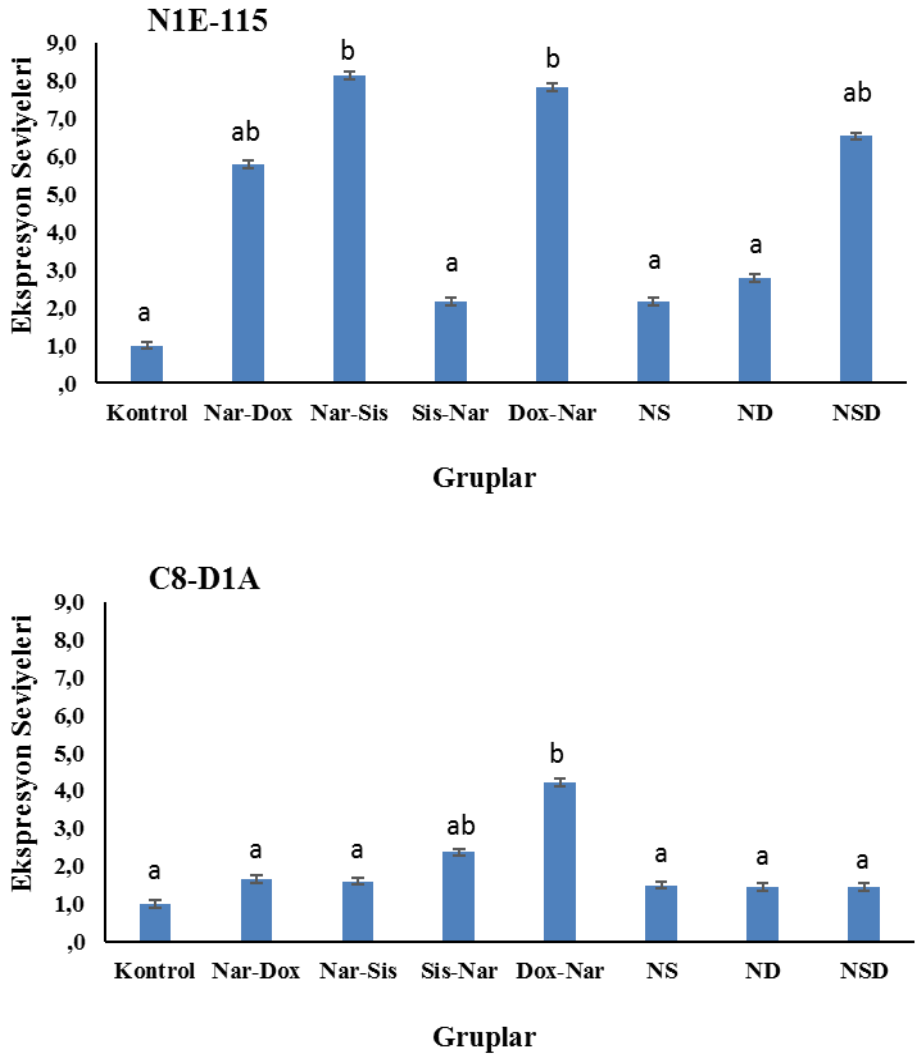


Şekil 4.54. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında $p21^{cip1}$ Gen İfadesinin Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, ortalama±standart hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05). Nar-Dox: Önce Naringin Ardından Doksorubisin, Nar-Sis: Önce Naringin Ardından Sisplatin, Sis-Nar: Önce Sisplatin Ardından Naringin, Dox-Nar: Önce Doksorubisin Ardından Naringin, NS: Aynı Anda Naringin-Sisplatin, ND: Aynı Anda Naringin-Doksorubisin, NSD: Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin.

4.5.9. $p27^{kip1}$ Gen İfadesi

N1E-115 Nöroblastom ve C8-D1A Astrosit hücre hatlarında endojen kontrol olarak GAPDH'ın kullanıldığı qRT-PCR analizi sonuçlarına göre kombine halde

uygulanan naringin, doksorubisin ve sisplatinin p27^{kip1} gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler Şekil 4.55'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, N1E-115 Nöroblastom hücre hattında p27^{kip1} gen ifadesinde en belirgin artışın önce naringin ardından sisplatin uygulanmasında (kontrole göre 8.14±0.45 kat) olduğu ve bunu önce doksorubisin ardından naringin uygulaması (kontrole göre 7.83±0.18 kat) ile aynı anda naringin-sisplatin-doksrubisin uygulamasının (kontrole göre 6.54±0.45 kat) izlediği belirlenmiştir. C8-D1A Astrosit hücre hattında ise p27^{kip1} gen ifadesinde en belirgin artışın önce doksorubisin ardından naringin uygulaması (kontrole göre 4.21±0.42 kat) ile önce sisplatin ardından naringin uygulamasında (kontrole göre 2.36±0.71 kat) olduğu belirlenmiştir. Diğer uygulamalar arasında istatiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.55.)



Şekil 4.55. N1E-115 ve C8-D1A Astrosit Hücre Hatlarında p27^{kip1} Gen İfadesinin

Değişimi. Relatif Kat Artış n=3, ortalama±standart hata * Her Bir Uygulamada Farklı Harf İle Gösterilen Ortalamalar İstatistik Olarak Farklıdır (ANOVA-Duncan test, P≤0.05). Nar-Dox: Önce Naringin Ardından Doksorubisin, Nar-Sis: Önce Naringin Ardından Sisplatin, Sis-Nar: Önce Sisplatin Ardından Naringin, Dox-Nar: Önce Doksorubisin Ardından Naringin, NS: Aynı Anda Naringin-Sisplatin, ND: Aynı Anda Naringin-Doksorubisin, NSD: Aynı Anda Naringin-Sisplatin-Doksorubisin.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Nöroblastom, vücudun çeşitli yerlerinde bulunabilen ve özellikle olgunlaşmamış sinir hücrelerinden gelişen bir kanserdir [103]. Yaygın olarak, sinir hücrelerine benzer kökenleri olan ve böbreklerin üstünde bulunan adrenal bezlerin içinde veya etrafında ortaya çıkar. Bununla birlikte, nöroblastom, batının diğer bölgelerinde, göğüs, boyun ve omurganın yakınında, sinir hücrelerinin kolonize olduğu yerlerde de gelişebilir [104].

Nöroblastom genellikle 5 veya daha küçük yaştaki çocuklarda görülen solid bir tümördür. Çocukluk çağındaki en yaygın olan ve 1 yaşından küçük bebeklerde en sık rastlanan kanser türüdür. Düşük riskli ve orta riskli nöroblastomlu çocuklar için 5 yıllık sağ-kalım oranı %95' in üzerindedir. Yüksek riskli nöroblastomlu çocuklar için ise 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %50'dir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 700 kişiye nöroblastom teşhisi konmakta ve nöroblastom Amerika'daki tüm çocukluk çağı kanserlerinin % 6' sını oluşturmaktadır. Ülkemizde ise her yıl 2500 çocuğun kansere yakalandığı ve bunların %10'unun nöroblastom olduğu bildirilmiştir [105].

Kemoterapi, genellikle kanser hücrelerinin yetişme ve bölünme yeteneğini durdurarak bu hücreleri yok etmek için kullanılan ilaçlarla yapılan bir tedavi biçimidir. Nöroblastomda primer tedavi yöntemi kemoterapidir [106]. Kemoterapinin yan etkileri, kişiden kişiye ve kullanılan doza göre değişir. Yorgunluk, enfeksiyon

riski, mide bulantısı ve kusma, saç dökülmesi, iştahsızlık ve diyare en belirgin yan etkilerdir [107, 108]. Tedavi bittikten sonra bu yan etkiler genellikle kaybolur. Yan etkilerin ciddiyeti, verilen ilacın türüne, miktarına ve hastanın ilacı aldığı süreye bağlıdır [109, 110]. Kemoterapinin en önemli yan etkisi ise, kanser hücrelerini öldürmesinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar vermesidir. Bu nedenle son yıllarda kemoterapi ilaçlarının sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkisinin azaltılması veya hücrelerin kemoterapi ilaçlarına hassasiyetinin artırılması amacı ile bitkisel kaynaklı maddelerin kullanımı gündeme gelmiştir. Ancak bu maddelerin yanlış kullanımının tedaviyi olumsuz etkileyebileceği de bilinmektedir. Bu nedenle bitkisel kaynaklı maddelerin kemoterapi öncesi, sonrası veya kemoterapi ile aynı anda kullanımlarının kanser hücreleri üzerinde nasıl bit etkiye neden olduğunun belirlenmesi oldukça önemlidir. Yine bitkisel kaynaklı maddelerin kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri de araştırılmalıdır. Bu nedenle çalışmamızda turunçgillerde bol miktarda bulunan naringin flavonoidinin nöroblastom tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları ile etkileşimlerinin hücre canlılığı ve apoptoz ile ilgili genlerin ifadeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda naringin kemoterapi ilaçlarından önce, sonra ve aynı anda verilerek etkiler hem nöroblastom hem de sağlıklı hücredeki etkileri saptanmıştır.

Çalışmamızda ilk olarak nöroblastom hücrelerinde naringin, sisplatin ve doksorubisinin tek olarak uygulamalarında IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda hücrelerin %50' sinin canlı kaldığı doz IC_{50}, naringin için 112 µM, sisplatin için 7,135 µM ve doksorubisin için ise 6,431 µM olarak saptanmıştır. 24. ve 48. saatler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark gözlemlenmediğinden dolayı, çalışmamız 24 saatlik süre üzerine devam etmiştir.

Naringin'in IC_{50} dozu, Jae ve ark.'larının (2009) nöroblastom SHSY5Y hücre hattında yaptığı çalışmada 20 µM [111], Shirasaka ve ark.'larının (2009) rat bağırsaklarında yaptığı çalışmada 200 µM [112], Ho ve ark.'larının (2001) insan karaciğer mikrozomlarında yaptığı çalışmada 2400 µM [113], Collazo ve ark.'larının (2014) in-vivo olarak fare kalbinde yaptığı çalışmada 30 µM olarak [114], Crasci ve ark.'larının (2013) naringin ve birçok flavanonun kıkırdak yıkımına etkilerine yönelik yaptıkları çalışmada 157,46 µM [115], Itoh ve ark.'larının (2009) B16 melanoma hücresinde yaptığı narenciye ve flavonoid glikozidlerinin melanogenez üzerine inhibitör etkilerini araştırmaya yönelik yaptığı çalışmada 4 mM [116], E.

Ramesh ve ark.'larının (2012) SiHa rahim ağzı kanseri hücre serisinde naringinin ölüm reseptörü ve mitokondriyal apoptozu indüklemesine yönelik yaptıkları çalışmada 750 µM [117] olarak saptanmıştır.

Sisplatinin IC_{50} dozu, Song ve ark.'larının (2006) küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde yaptığı çalışmada 4.4 µM [118], Michaelis ve ark.'larının (2010) kemoterapiye dirençli nöroblastom hücre hattında yaptığı çalışmada 24.9 µM [119], Olga Potapova ve ark.'larının (1997) sisplatin direncinin DNA onarımında ve Jun/stresle aktive protein kinaz (JNK/SAPK) yolağındaki rolüne yönelik yaptıkları çalışmada T98G glioblastoma hücrelerinde 140±13 µM [120], J. Holford ve ark.'larının (1998) sisplatine dirençli insan yumurtalık kanseri HOC hücre serisinde yaptıkları çalışmada 2.6 µM [121], Stewan W. Johnson ve ark.'larının (1997) insan yumurtalık kanseri hücre hatlarında sisplatin ve diğer kemoterapi ilaçlarına olan direncin DNA hasarı üzerine etkilerini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada 0.18-7.7 µM [122], Katherine V. Ferry ve ark.'larının (2000) Sisplatin'e dirençli yumurtalık kanseri hücrelerinde artmış nükleotid eksizyon onarımına yönelik yaptıkları çalışmada 7-265 µM olarak saptanmıştır [123].

Doksorubisinin IC_{50} dozu, Olson ve ark.'larının (1998) PANC-1 hücre serisinde yaptığı çalışmada 1.4 µM, PD Paca hücre serisinde 1.6 µM, WD Paca hücre serisinde ise 9.8 µM [124], Rezk ve ark.'larının (2006) doksorubisinin kardiyotoksisite akvitesini belirlemek için yaptığı çalışmada 24 µM [125], Jarvinen ve ark.'larının (2000) meme kanserinde doksorubisinin, ErbB2 amplikasyonu ve Topoizomeraz II inhibitörü üzerine etkilerine yönelik yaptığı çalışmada MCF-7 hücre serisinde 12±2 µM, BT-474 hücre serisinde 8±1 µM, UACC-812 hücre serisinde <4 µM, MDA-361 hücre serisinde ise 24±2 µM [126], Lin ve ark.'larının (2008) insan trioid kanseri hücrelerinde galektin-3'ün doksorubisin direncine ve apoptoz mekanizması üzerine yaptıkları çalışmada 20 µM [127], Tsang ve ark.'larının (2003) insan osteosarkomu Saos-2 hücrelerinde doksorubisinin p53'den bağımsız apoptozu indüklemesine yönelik yaptıkları çalışmada 10 µM [128], Lambers ve ark.'larının (2009) doksorubisin ve gemsitabin'in prototipik polimerik ilaç taşıyıcıları kullanarak tümörlere eş zamanlı olarak verilmesine yönelik in vivo olarak yaptıkları çalışmada 2nM [129] arasında saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda naringin 112 µM, sisplatin 7,135 µM ve doksorubisin için 6,431 µM olarak bulduğumuz sonuçlar farklı uygulama süreleri ve hücre

tiplerinde uygulanması nedeni ile değişiklikler göstermekle birlikte literatür verileri ile uyum göstermektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında naringin ile kemoterapi ajanlarının etkileşiminin belirlenmesi için naringinin kemoterapi ajanlarından önce, kemoterapi ajanlarından sonra ve kemoterapi ajanları ile birlikte uygulamaları yapılmıştır. Önce naringin ardından doksorubisin uygulaması yapılan hücrelerde doksorubisinin IC_{50} değerinin 0.341 μM olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14.). Bu değer doksorubisinin tek olarak uygulanması ile belirlenen IC_{50} değerinden (6.431 μM) yaklaşık 19 kat daha düşük olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6.). Yine önce naringin ardından sisplatin uygulaması yapılan hücrelerde, sisplatinin IC_{50} değerinin 0.023 μM olduğu saptanmıştır (Şekil 4.16.). Bu değer sisplatinin tek olarak uygulamasında belirlenen IC_{50} değerinden (7.135 μM) 310 kat daha düşük olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).

Naringin'in sisplatinden sonra uygulaması ile IC_{50} değerinin 0.499 μM olduğu ve bu değerin tek olarak sisplatin uygulamasında belirlenen IC_{50} değerinden (7.135 μM) yaklaşık 14 kat daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.18.). Naringinin doksorubisinden sonra uygulanmasında IC_{50} değerinin 0.075 μM olduğu ve bu değerin tek olarak doksorubisin uygulamasında belirlenen IC_{50} değerinden (6.431 μM) yaklaşık 86 kat daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.20.).

Naringin'in sisplatin ile aynı anda uygulanmasında IC_{50} değerinin 1.481 μM olduğu ve bu değerin önce naringin uygulaması yapılan gruplarda belirlenen IC_{50} değerinden (0.023 μM) yüksek ve tek olarak sisplatin uygulaması yapılan gruplarda belirlenen IC_{50} değerinden (7.135 μM) ise düşük olduğu saptanmıştır.

Naringinin doksorubisin ile aynı anda uygulamasında IC_{50} değerinin 0.306 μM olduğu ve bu değerin önce naringin uygulaması yapılan gruplarda belirlenen IC_{50} değerinden (0.341 μM) istatistiksel olarak farklı olmadığı saptanmıştır.

Naringin, sisplatin ve doksorubisinin aynı anda uygulanmasında ise 112 μM naringin, 0.533 μM sisplatin, 0.473 μM doksorubisin olarak bulunmuştur (Şekil 4.26.).

MTT sonuçlarına göre, doz gruplarından en etkili olan grupların, önce naringin sonra sisplatinin uygulandığı ve önce doksorubisin sonra naringinin uygulandığı gruplar olduğu düşünülmüştür. Ayrıca aynı anda yapılan uygulamalarda da tek başına yapılan uygulamalara göre etkili sonuçlar alındığı gösterilmiştir.

Çalışmada uygulama gruplarının canlı, ölü ve apoptotik hücre oranı üzerine

etkilerinin belirlenmesi için yapmış olduğumuz TALİ görüntü tabanli sitometri testi ile apoptotik hücre tayininde kontrol ve doz gruplarındaki canlı, apoptotik ve ölü hücre yüzdeleri karşılaştırılmış olup değerler Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.'de belirtilmiştir.

Nöroblastom hücrelerinde yapılan TALİ görüntü tabanlı sitometri testinde; naringin ile kombine halde uygulanan doksorubisin ve sisplatinin uygulama zamanlarının canlı ölü ve apoptotik hücre oranlarında değişikliklere neden olduğu saptanmıştır. Nitekim nöroblastom hücrelerinde doksorubisinden önce, sonra ve aynı anda uygulanan naringinin tek başına doksorubisin uygulamasına göre canlılık oranının sırası ile 1.6 kat, 2.2 kat ve 1.2 kat azalmasına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.33.). Yine aynı koşullarda naringinin hücrelerde apoptoz oranının sırası ile 2.4 kat, 2.7 kat ve 1.7 kat artmasına neden olduğu ve nekrotik ölüm oranlarında önemli bir değişimin olmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar naringinin hücrede spesifik olarak apoptozu tetiklediğini düşündürmektedir.

Çalışmada sisplatinden önce, sonra ve aynı anda uygulanan naringinin canlılık oranında en belirgin azalmaya 1.4 kat ise sisplatinden sonra uygulamasında sebep olduğu belirlenmiştir. Apoptoz oranları ise sisplatinin tek olarak uygulaması ile karşılaştırıldığında bu uygulama grubuna benzer şekilde sırası ile 1.42, 1.48 ve 1.42 kat artış göstermiştir. Ancak naringinin, sisplatinden önce ve sonra uygulamalarında canlı, ölü ve apoptotik hücreler karşılaştırıldığında ise sisplatinden sonra yapılan Naringin uygulamasının nöroblastom hücrelerinde canlılık oranının 1.27 kat azalmasına ve nekrotik ölüm oranının 1.9 kat artmasına neden olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.33.).

Çalışmada nöroblastom hücrelerine uygulanan maddelerin sağlıklı hücrelerdeki etkilerinin belirlenmesi amacı ile astrosit hücrelerine Tali görüntü tabanlı sitometri testi yapılmıştır. Elde edilen verilere göre doksorubisin ve sisplatinin tek olarak uygulanması ortamda sırası ile %50 ve %40 oranında sağlıklı hücre kalmasına sebep olmuştur. Yine sisplatin hücrelerin % 43'ünün, doksorubisin ise %27'sinin ölümüne neden olmuştur. Doksorubisinden önce ve sonra ve aynı anda naringin uygulamaları tek olarak doksorubisin uygulaması ile karşılaştırıldığında apoptoz oranının %23'ten %31'e çıktığı belirlenmiş olmakla birlikte doksorubisinden önce ve sonra ve aynı anda naringin uygulamaları birbirleri ile karşılaştırıldığında ortamdaki canlı, ölü ve apoptotik hücre oranlarında istatistiksel olarak önemli seviyede bir değişim olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.35.). Sisplatinden

önce uygulanan naringinin tek olarak sisplatin uygulamasına göre ortamda 1.7 kat daha fazla canlı ve 2.5 kat daha az ölü hücre olmasına neden olduğu belirlenmiştir. Sisplatinden sonra uygulanan naringinin ise 1.3 kat daha fazla canlı ve 1.4 kat daha az ölü hücreye sebep olduğu saptanmıştır. Çalışma ile elde edilen veriler doğrultusunda özellikle sisplatinden önce uygulanan naringinin sisplatinin sağlıklı hücreler üzerindeki öldürücü etkisinin azaltılmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

Çalışmada nöroblastom ve astrosit hücre serilerinde kontrol ve IC_{50} dozlarının uygulamaları yapılan gruplar arasındaki gen ifadelerindeki değişimler qRT-PCR ile belirlenmiştir (Şekil 4.47., Şekil 4.55.). Nöroblastom hücre hattında; MTT sonuçlarında belirlenen IC_{50} değerleri dikkate alındığında qRT-PCR sonuçları ile anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır.

Nöroblastom hücrelerine doksorubisin ile birlikte yapılan naringin uygulamalarında, naringinin uygulama zamanının iki farklı hücresel sinyal iletimi oluşturduğu belirlenmiştir. Doksorubisinden önce naringin uygulaması ilk etapta tümör süpresör p53 gen ifadesinde istatistik anlamda önemli bir artışı tetiklemiş, aynı zamanda Tnf-α'nın kontrole kıyasla 5.1 kat artmasına sebep olmuştur. Özellikle içsel apoptoz yolağı aktivatörü olan tümör süpresör proteinindeki bu artış, nöroblastom hücrelerinde apoptoz inhibitör Bcl-2 gen ekspresyonu baskılamış, Bax gen ifadesi ise kontrole kıyasla 2.08 kat artmıştır. Bax gen ifadesi bu uygulama kombinasyonunda mitokondri membran potansiyelini bozmuş, sitosole geçen sitokrom c, kaspaz-9 yoluyla kaspaz-3'ü aktif hale getirmiştir. Aynı konsantrasyonda hücre döngüsü proteini $p21^{cip1}$ düşük düzeyde eksprese olurken, $p27^{kip1}$ istatistik olarak anlamda düzeyde kontrole kıyasla 5.79 kat artmış ve hücre döngüsünü durdurmuştur. Sonuç olarak önce naringin sonra doksorubisin uygulaması mitokondrial apoptoz yolağını aktive etmiş ve Tali görüntü tabanlı sitometri sonuçlarında görüldüğü gibi yaklaşık %43 oranında apoptozdan sorumlu hücre ölümü oluşturmuştur (Şekil 4.33.). Naringin'in doksorubisinden sonra uygulamasında ise bir önceki uygulamaya benzer şekilde tumor süpresör geninde önemli bir atış meydana gelmiş ancak gen ekspresyonundaki bu artış, Bcl-2 geninin faaliyetini baskılayamamıştır. Yaklaşık 4.6 kat artan Bcl-2 gen ekspresyonu, Bax/Bcl-2 oranını apoptoz inhibisyonu yönünde bozmuş ve mitokondrial apoptoz yolağını baskılamıştır. Ancak özellikle kaspaz-3 ve $P27^{kip1}$ arrest genlerinde görülen istatistik anlamda önemli artışlar, aynı zamanda Tali görüntü tabanlı sitometri analizindeki yüksek apoptoz oranı ölümün apoptoz kaynaklı

olduğunu göstermektedir. Bunun sebebinin apoptozun mitokondrial yolak haricinde, başka bir yolaktan olması olduğu düşünülmektedir. Nitekim önce doksorubisin sonra naringin uygulaması sonucu Tnf-α over eksprese olmuş, aynı zamanda en yüksek kaspaz-3 aktivasyonu bu uygulama konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Tnf-α gen ifadesinde meydana gelen bu artışın kaspaz-8 yolunu takip ederek kaspaz-3'ü aktive ettiği, bu konsantrasyonda nöroblastom hücrelerinde var olan apoptotik ölümün Tnf-α-kaspaz8-FADD-RIP- kaspaz-3 yolundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Doksorubisin insan solid tümör ve malin hematolojik bozukluklarda yaygın olarak kullanılan son derece güçlü bir antrasiklin antitümör ilaçtır [130, 131]. Bu ilaç DNA çift sarmalına interkalasyon yaparak topoizomeraz II aktivitesinin kesilmesi, malin hücrelerde oksidaz ve redüktazlar gibi enzimlerle etkileşime girerek serbest radikal oluşumu gibi farklı antikanser mekanizmalarda yer almaktadır [132, 133]. Bununla birlikte doksorubisinin klinik kullanımı hedef olmayan normal dokularda (kalp, kemik iliği ve beyin gibi) yan etkilerinden dolayı sınırlıdır [134, 135]. Örneğin meme kanserini yenen hastalarda kalıcı bilişsel işlev bozuklukları ve kemoterapi sonrası düşük yaşam kalitesine neden olan rutin işlerin yerine getirilmesinde güçlük yaşanmaktadır [135]. Bu etkiler uzun süreli kullanım ve kısa süreli kullanımda benzerdir [135, 136]. Yapılan çalışmalarda doksorubisinin bilişsel işlev bozukluğu, kaygı ve depresif davranışlara neden olduğu rapor edilmiştir [137, 138]. Doksorubisin ve metaboliti (doksorubisinol) kan beyin bariyerinde bulunan ATP-aracılı P-glikoprotein taşıyıcının varlığı nedeni ile merkezi sinir sistemi bölgesine geçmemektedir. Ancak bu ilaç dolaylı olarak beyin hasarına neden olmaktadır. Periferde bulunan doksorubisin oksido-nitrosatif stresin artmasına ve Tnf-α gibi proinflamatuar sitokinlerin artışına ve bu da kan beyin bariyerini geçmelerine sebep olur. Daha sonra glial hücrelerin aktivasyonu ile birlikte meydana gelen lokal Tnf-α üretimi NF-KB aktivasyonu yolu ile inflamasyonda ortaya çıkan iNOS, proinflamatuar sitokinler (Tnf-a, IL-1b gibi), siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi genlerin aktivasyonunu tetikler ve beynin hipokampüs ve korteks bölgelerinde reaktif oksijen ve nitrojen düzeylerinin artmasına neden olur [139, 142]. Bu oksido-nitrosatif stres lipit, protein, DNA/RNA gibi biyomolekülleri okside ederek beyindeki antioksidan düzeyinin değişimine neden olur [143, 144, 145]. Yaptığımız çalışmada doksorubisinin ile uygulanan naringinin sağlıklı hücrelerde etkilerinin belirlenmesi amacı ile astrosit hücreleri kullanılmış ve naringinin doksorubisinden

önce ve sonra kullanımı arasında canlı, ölü ve apoptotik hücre oranlarında istatistiksel olarak fark görülmemiştir. Nöroblastom hücrelerinde ise doksorubisinden sonra uygulanan naringinin önce uygulamasına göre ölü ve apoptotik hücrelerin oranının yükselmesine, canlı hücre oranının ise düşmesine sebep olduğunun belirlenmesi nedeni ile naringinin doksorubisinden sonra uygulanmasının daha uygun olduğu düşünülmektedir.

Nöroblastom hücrelerinde sisplatin ile birlikte naringin uygulamalarında mitokondiral apoptoz yolağının aktif hale geçtiği görülmektedir. Naringinin sisplatinden önce uygulanmasının tümör baskılayıcı p53 geninin ve Tnf-α gen ifadesinin sırası ile kontrole göre 6.35 ve 4.51 kat artış gösterdiği ve bu artışların apoptoz inhibitör Bcl-2 gen ifadesini baskılarken, apoptoz aktivatör Bax geninin ifadesinde 7.53 kat artışa neden olduğu saptanmıştır. Yine bu uygulama grubunda Bax/Bcl-2 oranının 5.3 olduğu ve sitokrom c'nin gen ifadesinde kontrole göre 8.3 kat artışın meydana geldiği, kaspaz-9 ve kaspaz-3 ifadelerinin artış gösterdiği ve $p21^{cip1}$ ve $p27^{kip1}$ gen ifadesinde artışlar ile hücre çoğalmasını durdurduğu belirlenmiştir. Tali görüntü tabanlı sitometre testi sonuçları da bu bulguları destekler nitelikte ve apoptozun gerçekleştiği yönündedir. Sisplatin çeşitli solid organ kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ajanı olmakla birlikte doza bağlı olarak toksisite göstermesi nedeni ile genellikle doz azaltımı gerektirmektedir. Sisplatinin toksik etkilerini reaktif oksijen türlerinin oluşumu veya antioksidan savunma sisteminin bozulması yolu ile gerçekleştiğini rapor eden birçok çalışma mevcuttur [146, 147, 148, 149]. Bu nedenle sisplatinin kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelerde de toksisiteye neden olduğu bilinmektedir. Yaptığımız çalışmada naringinin sisplatin ile uygulanmasının tek olarak uygulamasına göre apoptozda artışa neden olduğu görüntü tabanlı sitometre ile belirlenmiştir. Her ne kadar naringinin önce ve sonra kullanımlarında apoptotik hücre oranının benzer olduğu görülse de sisplatinden sonra uygulamanın ölü hücre oranında yaklaşık 2 kat bir artışa neden olduğu saptanmıştır. Aynı uygulama gruplarında sağlıklı astrosit hücrelerinde ise sisplatinin naringinden önce uygulanmasının ölü hücre oranında naringinden sonra uygulamasına göre yaklaşık 2 kat artışa sebep olduğu ve canlı hücre oranının da önce uygulamaya göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum naringinin sisplatinden önce uygulamasının sağlıklı hücreler üzerinde koruyucu bir etkiye neden olduğunu düşündürmektedir. Nitekim sağlıklı astrosit hücre serisinde

önce naringin uygulanan gruplarda p53 ve tnf-α gibi tümör baskılayıcı genlerin ve sitokrom C'nin sisplatinden sonra naringin uygulanan hücrelere göre daha düşük düzeyde eksprese olması apoptotik uyarının başladığını göstermektedir. Yine antiapoptotik Bcl-2 gen ifadesinin ve hücre döngüsü durdurucu proteinlerin sisplatinden sonra naringin uygulamasında daha yüksek olması hücrelerde sisplatinden önce naringin uygulanan gruba göre daha fazla bir DNA hasarı meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının toksisitesine karşı koruyucu olarak fitokimyasalların kullanımı oldukça önem kazanan ve dikkat çeken bir konudur [139]. Flavonoidler kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi birçok hastalığın tedavisi ve önlenmesinde faydalı etkileri olduğu belirlenen doğal polifenolik fitokimyasallardır [140]. Bir flavanon glikozid olan ve turunçgillerde bol olarak bulunan naringinin (4',5,7-trihydroxy flavanone 7-rhamnoglucoside) önemli bir terapötik potansiyele sahip olmasının yanı sıra, kendisinin veya metabolitlerinin antikarsinojenik, lipid düşürücü, antiapoptotik, antiarterojenik, metal çelatlayıcı ve antioksidan aktivitelerini de içeren çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklerinin olduğu rapor edilmiştir [141, 144]. Ayrıca naringinin hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda Tnf-α ekspresyonunu modüle ederek anti-inflamatuar etkilerinin olduğu da bildirilmiştir [145].

Çalışmamızda kemoterapi ile birlikte uygulanan naringinin kanser hücrelerindeki apoptotik etkileri belirlenmiştir. Bilindiği gibi kemoterapi ilaçları kanser hücrelerinin azaltılmasının yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Bu nedenle ideal olan durum kemoterapi ile birlikte uygulanacak flavonoidlerin ilaçların kanser hücreleri üzerindeki öldürücü etkisini azaltmadan ve/veya artırarak sağlıklı hücrelerin korunmasını da sağlamasıdır. Naringinin kanserin kontrol edilmesinde hem baskılayıcı (prokarsinojenlerden kanserin oluşumunun önlenmesi) ve bloke edici (karsinojenik bileşiklerin kritik inisiyasyon bölgelerine ulaşmasını durduran) etkilerinin olduğu bildirilmiştir [146]. Naringinin mesane kanseri, üçlü negatif meme kanseri ve insan servikal kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu indüklediği rapor edilmiştir. Üçlü negatif meme kanserinde naringinin proapoptotik etki göstererek p21 gen ifadesinin artmasına ve hücre canlılığında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [147]. Yine SiHa hücrelerinde 48

saat süre ile naringin uygulamasının p53, kaspaz-3, kaspaz-9, Bax, Fas ve FADD gen ifadelerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli artışlara neden olduğu ve bu durumun bu durumun servikal kanser hücrelerinde mitokondriyal apoptoz yolağını indüklediğinin göstergesi olduğunu, kaspaz-8 ekspresyonundaki artışında naringinin ekstrinsik yolağı aktive ettiğinin bir göstergesi olabileceğini rapor etmişlerdir. Zeng ve ark. (2014) insan serviks kanser hücre serisinde (HeLa) naringin uygulamasının hücre canlılığını azalttığını ve NF-κB/COX-2-kaspaz-1 yolağını inhibe ederek apoptotik etkiye neden olduğunu bildirmişlerdir [147]. Tan ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada toksik olmayan konsantrasyonda (30 μM) naringinin kondrosarkoma hücrelerinde apoptozu indüklemediğini ancak hücre motilitesini azalttığını ve miR-126 ifadesinin artması aracılığı ile vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1) ifadesinde azalmaya neden olarak kanser hücre migrasyonunun azalttığı bildirilmiştir [148]. Mesane kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada naringinin G1 fazı hücre döngüsü arrestine neden olduğu ve hücre döngüsünün G1fazından S fazına ilerlemesini durdurduğu bildirilmiştir [149]. Aroui ve ark. (2015) 5-60 μM naringin uygulaması yapılan U251 glioblastoma hücrelerinde naringinin doza bağlı olarak matriks metalloproteinaz 2 ve 9 protein ifadesi ve aktivitesinin azalmasına neden olduğu ve p38 MAPK'nın fosforilasyonunun engelleyerek invazyonu ve migrasyonu inhibe ettiğini bildirilmişlerdir [150]. Naringinin kanser hücrelerindeki bu etkilerinin yanı sıra kemoterapi ilacı sisplatin ile birlikte uygulamasının yaşlı ratların hipokampüsünde oksidatif hasarı engellediği rapor edilmiştir [151]. Yine naringinin sisplatin ile indüklenen periferal nöropatinin önlenmesinde etkili olduğu ve ratları sisplatinin neden olduğu davranışsal, biyokimyasal ve moleküler değişimlerden doza bağlı olarak koruduğu bildirilmiştir [152]. Benzer şekilde 14 gün süre ile 50 ve 100 mg/kg naringin uygulaması yapılan ratlarda 10. günde 15 mg/kg doksorubisin uygulamasının kalp dokusunda doksorubisinin neden olduğu kardiyotoksisiteyi antioksidan savunma sisteminin tamiri ve mitokondriyal komplekslerin aktivitesi ile engellediği ve naringinin doksorubisin ile tedavi edilen kanser hastalarında kardiyotoksisiteyi azaltabilecek yararlı bir adjuvan olabileceği rapor edilmiştir [153].

Bu çalışmada ise çocukluk çağının öldürücü kanseri olan nöroblastom hücrelerinde naringinin bu kanserde kullanılan kemoterapi ilaçları olan doksorubisin ve sisplatin ile etkileşimi ve bu etkileşimde naringinin uygulanma zamanının önemi araştırılmıştır. Bilindiği gibi kanser tedavisi sırasında antioksidan maddelerin

kullanımı konusunda farklı görüşler bulunmakla birlikte bazı kaynaklarda antioksidan özellikli madde kullanımının sağlıklı hücreleri kemoterapinin neden olduğu hasardan korurken, tümör hücrelerini de koruyabileceği bildirilmiştir [154]. Buna ilaveten rezveratrol ve betulinik asit gibi bazı bitkisel kökenli maddelerin kemoterapi ilaçlarından önce uygulanmasının hücrelerin kemoterapi ilaçlarına duyarlılığında artışa neden olduğu rapor edilmiştir [155, 156].

Sonuç olarak nöroblastom tedavisinde kullanılan sisplatin ve doksorubisin uygulamalarının sağlıklı astrosit hücre serilerinde sitotoksik etki göstererek önemli düzeyde bir ölüme sebep olduğu, naringinin ise bu hücrelerde toksisiteye neden olmadığı görülmüştür. Naringin'in tek başına nöroblastom hücrelerinde seçici olarak kaspaz bağımlı yolaklar üzerinde apoptoz sinyali oluşturarak antikanser özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte naringinin ile birlikte kemoterapi ilacı uygulamalarında naringinin uygulama zamanının apoptoz üzerine farklı etkide bulunduğu saptanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre naringinin sisplatinden önce uygulamasının ve doksorubisinden sonra uygulamasının hücre ölümü, apoptoz ve sağlıklı hücrelerin korunması açısından daha etkili olduğu düşünülmüştür. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilerin in vivo çalışmalar ile desteklendiği takdirde naringinin nöroblastom tedavisinde kemoterapi ile birlikte kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

[1]- E. Thomas, ***The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing.*** Clinical Orthopaedics & Related Research: Volume 355 Issue pp S7S21 (October 1998).

[2]- J. Craig, S. Fowler, L. A. Burgoyne, A. C. Scott, and H. W. J. Hardin, ***Repetitive Deoxyribonucleic Acid (DNA) and Human Genome Variation--A Concise Review Relevant to Forensic Biology.*** Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vol. 33, No. S, pp.1111-1126 (Sept. 1988).

[3]- A. Claviez, M. Lakomek, J. Ritter, M. Suttorp, B. Kremens, R. Dickerhoff, D. Harms, F. Berthold, B. Hero, ***Low occurrence of familial neuroblastomas and ganglioneuromas in five consecutive GPOH neuroblastoma treatment studies***, European journal of cancer, 40(18): 2760-5, (2004).

[4]- A. Ş. Erenler, H. Geçkil, ***Triump and tradegy: progress in cancer.*** Turk J Bio. 38: 701-707 (2014).

[5]- T.C Sağlık Bakanlığı, Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü. T.C Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2012. Dünyada ve Türkiye'de Kanser. Basın Açıklaması. http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-15486/dunya-ve-turkiyede-kanser.html (son

güncelleme tarihi: 04.04.2012, alındığı tarih: 07.11.2014).

[6]- Berrak BORA BAŞARA Cemil GÜLER Gökalp Kadri YENTÜR Birsen BİRGE Erman PULGAT Burcu MAMAK EKİNCİ, T.C Sağlık Bakanlığı, ***Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü. T.C Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2012. Dünyada ve Türkiye'de Kanser. Basın Açıklaması.***
http://ekutuphane.sagem.gov.tr/kitaplar/saglik_istatistikleri_yilligi_2012.pdf
(02.03.2016)

[7]- Betül S., Metin D., Salih G., Hanife H., Filiz A., ***Nöroblastomlu Çocukların Klinik Özellikleri.*** Güncel Pediatri 11: 6-12, (2013).

[8]- http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003125-pdf.pdf (10.01.2016)

[9]- F. O. Andrew, N. C. J. Michael, G. Seymour, H. P. Brad, O. S. Daniel, C. S. Robert, L. A. Thomas, L. C. Susan, P. C. Robert and L. B. Melissa, ***Hormone and Fertility Drug Use and the Risk of Neuroblastoma: A Report from the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group.*** American Journal of Epidemiology, Vol. 150, no: 9 Printed in U.S.A (1999).

[10]- K. M. Katherine, E. G. Rani and L.Y. Alice, ***Promising therapeutic targets in neuroblastoma.*** Clin Cancer Res. 18(10): 2740–2753 (2012).

[11]- M. A. Alam, N. Subhan, M. M. Rahman, S. J. Uddin, H. M. Reza, S. D. Sarker, ***Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action.*** Adv. Nutr., 5(4): 404-17, (2014).

[12]- A. Russo, R. Acquaviva, A. Campisi, V. Sorrenti, C. D. Giacomo, G. Virgata, et al. ***Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors.*** Cell Biol Toxicol; 16: 91–8 (2000).

[13]- S. Kanno, A. Shouji, A. Tomizawa, T. Hiura, Y. Osanai, M. Ujibe, et al. ***Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264. 7 macrophages***. Life Sci 2006; 78: 673–81.

[14]- M. Bracke, B. Vyncke, G. Opdenakker, JM. Foidart, G. D. Pestel, M. Mareel, ***Effect of catechins and citrus flavonoids on invasionin vitro. Clinical & experimental metastasis*** 1991; 9(1), 13-25.

[15]- YC. Hsiao, WH. Kuo, PN. Chen, HR. Chang, TH. Lin, WE. Yang, SC. Chu, ***Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway.*** Chemico-biological interactions 2007; 167 (3), 193-206.

[16]- HH. Tseng, PN. Chen, WH. Kuo, JW. Wang, SC. Chu, YS. Hsieh, ***Antimetastatic potentials of Phyllanthus urinaria L on A549 and Lewis lung carcinoma cells via repression of matrix-degrading proteases.*** Integrative cancer therapies 2012; 11(3), 267-278.

[17]- FV. So, N. Guthrie, AF. Chambers, M. Moussa, K.K. Carroll, ***Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis byflavonoids and citrus juices.*** Nutr Cancer 1996; 26: 167–81.

[18]- D. Wang, K. Gao, X. Li, X. Shen, X. Zhang, C. Ma, L. Zhang, ***Long-term naringin consumption reverses a glucose uptake defect and improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.*** Pharmacology Biochemistry and Behavior 2012; 102(1), 13-20.

[19]- L. Li, P. M. Ralph, G. Barjor, ***Dynamic bioluminescence and fluorescence imaging of the effects of the antivascular agent CombretastatinA4P (CA4P) on brain tumor xenografts.*** Cancer Letters, Volume 356, Issue 2, Part B, 28, pages 462–469 (2015).

[20]- M. S. Kristen and P. Devanshi, ***Principles of Cancer Genetic Counseling and Genetic Testing.*** Handbook from the Massachusetts General Hospital, (2010).

[21]- G. Chan-Smutko et al., ***Professional challenges in cancer genetic testing: who is the patient?.*** Oncologist 13(3): 232–238 (2008).

[22]- A. S. Imtiaz, S. Vanna, A. Nihal, S. Mario, M. Hasan, ***Resveratrol***

nanoformulation for cancer prevention and therapy. Resveratrol and Health: 3rd International Conference Pages 20–31 (2015).

[23]- P.S. Hussain, J. H. Lorne, C.H. Curtis, ***Radical causes of cancer.*** Nature Reviews Cancer 3, 276285 (2003).

[24]- N. K. Cheung, J. Zhang, C. Lu, M. Parker, A. Bahrami, S.K. Tickoo, A. Heguy, A.S. Pappo, S. Federico, J. Dalton, I. Y. Cheung, L. Ding, R. Fulton, J. Wang, X. Chen, J. Becksfort, C.A.B. Wu, D. Ellison, E.R. Mardis, R.K. Wilson, J.R. Downing, M.A. Dyer ***Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma.*** St Jude Childrens's Research Hospital-Washington Univercity Pediatric Cancer Genome Project JAMA, 307(10): 1062-71, (2012).

[25]- https://www.cancer.gov/publications/patient-education/brain.pdf (07.06.2016)

[26]- C. Christopher, P. Helen, K. Mehmet, L.H. Twala, F. Christine, H. Blair, Y.O. Eun, G. Waleed, F. David, A. Meredith, F. Adrian, T.B. Ildar, S.Z. Stanislav, G. Amar, D. Andrew and J.G. Richard, ***A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells.*** Cancer Cell 11, 69–82, (2007).

[27]- J. S. Dome, C. Rodriguez-Galindo, S.L. Spunt, V. M. Santana, ***Pediatric solid tumors***. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE. Kastan MB, McKenna WG, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier; 2091–2096, (2008).

[28]- S. Agarwal, A. Lakoma, Z. Chen, J. Hicks, L. S. Metelitsa, E. S. Kim, J. M. Shohet, ***G-CSF Promotes Neuroblastoma Tumorigenicity and Metastasis via STAT3 Dependent Cancer Stem Cell Activation,*** Cancer Res, 75(12): 2566-79 (2015).

[29]- K. Ching Lee, L. Mei Jing, M. Mohd Saberi, A. H. Mohamed, ***A Review for Detecting Gene-Gene Interactions Using Machine Learning Methods in Genetic Epidemiology.*** BioMed Reseaech International Article ID 432375, 13 pages, Volume (2013).

[30]- http://carcin.oxfordjournals.org/content/21/3/485/F1.expansion

[31]- G. M. Brodeur, J. Pritchard, F. Berthold, N. L. Carlsen, V. Castel, R. P. Castelberry, D. B. Berbandi, A. E. Evans, M. Favrot, F. Hedborg and edt., ***Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment.*** J Clin Oncol., 11:1466-1477, (1993).

[32]- G. M. Brodeur, J. Pritchard, F. Berthold, N. L. Carlsen, V. Castel, R. P. Castelberry, D. B. Berbardi, A. E. Evans, M. Favrot, F. Hedborg and edt., ***Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment.*** Prog. Clin. Biol Res., 385:363-9, (1994).

[33]- http://nhs.uk/ipgmedia/national/macmillan%20cancer%20support%20and%20cclg/assets/neuroblastomainchildrenmcsandcclg6pages.pdf

[34]- https://radiologypics.com/2014/03/21/metastatic-neuroblastoma/ (21.09.2016)

[35]-U. K. Westermark, M. Wilhelm, A. Frenzel, M.A. Henriksson, ***The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma.*** Semin Cancer Biol. 21(4):256-66 (2011).

[36]- B. Ozkan, K. Serkan, ***Amplification of Cellular Oncogenes in Solid Tumors.*** North American Journal of Medical Sciences | Published by Wolters Kluwer – Medknow 341-346 (2015).

[37]- A. T. Look, F. A. Hayes, J. J. Shuster, E. C. Douglass, R. P. Castleberry, L. C. Bowman, E. I. Smith, G. M. Brodeur, ***Clinical relevance of tumor cell ploidy and Nmyc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study.*** J Clin Oncol., 9(4): 581-91 (1991).

[38]- J. Jaboin, C. J. Kim, D. R. Kaplan, C. J. Thiele, ***Brain-derived Neurotrophic Factor Activation of TrkB Protects Neuroblastoma Cells from Chemotherapy-induced Apoptosis via Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway,*** Cancer Research, 62: 6756–6763, (2002).

[39]- M.V. Chao, ***Neurothrophins and their receptors: A convergence point for many signaling pathways.*** Nature Reviews Neuroscience 4, 299-309 (2003).

[40]- S. Michael, V.V. Harry, ***Astrocytes: biology and pathology.*** Acta Neuropathol 119:7–35 (2010).

[41]- I. Allaman, M. Belanger, P.J. Magistretti, ***Astrcyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse.*** Trends in Neurosciences; 34: 76-87 (2011).

[42]- M.V. Sofroniew, H.V. Vinters, ***Astrocytes: biology and pathology.*** Acta Neuropathol; 119 (1): 7-35 (2011).

[43]- E.E. Benarroch, ***Neuron-Astrocyte Interactions: Partnership for Normal Function and Disease in the Central Nervous System.*** Mayo Clin Proc; 80: 1326-38 (2005).

[44]- E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessell, ***Principles of Neural Science,*** 4th ed. McGraw-Hill, (2000).

[45]- C. Robin, P. Ross, ***Treatment of advanced neuroblastoma.*** European Journal of Cancer Volume 29, Issue 2, Pages 293 (1993).

[46]- C.A. Stiller, ***Pediatric Cancers.*** Reference Module in Biomedical Sciences (2015).

[47]- R. Nitschke, E.I. Smith, S. Shochat et al. ***Localized neuroblastoma treated by surgery: a Pediatric Oncology Group Study.*** J Clin Oncol. 6(8):1271-9 (1988).

[48]- M.S. Irwin, J.R. Park, ***Neuroblastoma: Paradigm for Precision Medicine.*** *Pediatr Clin North Am*. 62(1):225-256. (2015).

[49]- J. Anna, ***Late effects of chemotherapy for childhood cancer.*** Paediatrics and Child Health Volume 23, Issue 12, Pages 545–549 (2013).

[50]- S. Riccardo, T. Elisa, R. Roberta, ***Chapter 80 – Neurologic complications of chemotherapy and other newer and experimental approaches.,*** Handbook of Clinical Neurology Volume 121, Pages 1199–1218 (2014).

[51]- A. Slack, G. Lozano, J. M. Shohet, ***MDM2 as MYCN transcriptional target: Implications for neuroblastoma pathogenesis,*** Cancer Letters, 228: 21–27, (2005).

[52]- D. A. Tweddle, A. J. Malcolm, N. Bown, A. D. J. Pearson, J. Lunec, ***Evidence for the Development of p53 Mutations after Cytotoxic Therapy in a Neuroblastoma Cell Line,*** Cancer Research, 61: 8–13, (2001).

[53]- M. Farhan, M. Oves, S. Chibber, S. M. Hadi, A. Ahmad, ***Mobilization of Nuclear Copper by Green Tea Polyphenol Epicatechin-3-Gallate and Subsequent Prooxidant Breakage of Cellular DNA: Implications for Cancer Chemotherapy.*** Int J Mol Sci., 18(1). E34 (2016).

[54]- A.G. Tessa, R. Paul, ***Principles of chemotherapy and radiotherapy.*** Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine Volume 24, Issue 9, Pages 259–265 (2014).

[55]- M. Guy, ***Principles of chemotherapy.*** Paediatrics and Child Health Volume 24, Issue 4, Pages 161–165 (2014).

[56]- R. Nijeveldt, EV. Nood, DECV. Hoorn, PG. Boelens, KV. Norren, PAMV. Leeawen ***Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.*** Am J Clin Nutr 74: 418–425 (2001).

[57]- KS. Gould, C. Lister, OM. Andersen, KR. Markham (eds) ***Flavonoid functions in plants: Flavonoids chemistry, biochemistry and applications.*** CRC Press Taylor & Francis Group, London, pp 397–442 (2005).

[58]- A. Samanta, G. Das, SK. Das ***Roles of flavonoids in plants.*** Int J Pharm Sci Technol 6(1):12–35 (2011).

[59]- S. Hassan, U. Mathesius ***The role of flavonoids in root– rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions.*** J Exp Bot 63(9):3429–3444 (2012).

[60]- LA. Bazzano, J. He, LG. Ogden, CM. Loria, S. Vupputuri, L. Myers, PK. Whelton ***Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic***

Follow-up Study. A J Clin Nutr 76(1):93–99 (2002).

[61]- MN. Clifford ***Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health***. Planta Med 12: 1103–1114 (2004).

[62]- D. Atmani, N. Chaher, D. Atmani, M. Berboucha, N. Debbache, H. Boudaoud ***Flavonoids in human health: from structure to biological activity.*** Curr Nutr Food Sci 5: 225–237 (2009).

[63]- SC. Fang, CL. Hsu, HT. Lin, GC. Yen ***Anticancer effects of flavonoid derivatives isolated from Millettia reticulata Benth in SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells.*** J Agric Food Chem 58(2):814–820 (2010).

[64]- ZP. Xiao, ZY. Peng, MJ. Peng, WB. Yan, YZ. Ouyang, HL. Zhu ***Flavonoids health benefits and their molecular mechanism.*** Med Chem 11(2):169–177 (2011).

[65]- M. Bacanlı, A.A. Başaran, N. Başaran, ***The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin.*** Food and Chemical Toxicology 81, 160–170 (2015).

[66]- R. Schindler, R. Mentlein ***Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells.*** J Nutr; 136: 1477–82 (2006).

[67]- SI. Kanno, A. Tomizawa, T. Hiura, Y. Osanai, A. Shouji, M. Ujibe, M. Ishikawa ***Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice.*** Biological and Pharmaceutical Bulletin; 28(3), 527-530 (2005).

[68]- DI. Kim, SJ. Lee, SB. Lee, K. Park, WJ. Kim, SK. Moon. ***Requirement for Ras/Raf/ERK pathway in naringin-induced G1-cell-cycle arrest via p21WAF1 expression.*** Carcinogenesis; 29 (9), 1701-1709 (2008).

[69]- H. Li, B. Yang, J. Huang, T. Xiang, X. Yin, J. Wan, G. Ren. ***Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting β-catenin signaling pathway.*** Toxicology letters; 220 (3), 219-228 (2013).

[70]- E. Ramesh, AA. Alshatwi, ***Naringin induces death receptor and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (SiHa) cells.*** Food and Chemical Toxicology; 51, 97-105 (2013).

[71]- Y. Lihua, C. Wenxiao, Q. Zishun, Y. Hongdou, Y. Zhandai, Z. Mei, S. Kemo and Z. Wei, ***Effects of Naringin on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament***. Stem Cells In Vitro and In Vivo. Stem Cells International Volume 2015 (2015), Article ID 758706, 9 pages (2015).

[72]- R. D. Olson, P. S. Mushlınt, D. E. Brenner, S. Fleıscher, B. J. Cusack, B. K. Chang, R. J. Boucek, ***Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol (adriamycin/anthracycline/cardiomyopathy/ion pumps),*** Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 85, pp. 3585-3589,(1988).

[73]- X. Song, X. Liu, W. Chi, Y. L. L. Wei, X. Wang, J. Yu, ***Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 α gene,*** Cancer Chemother Pharmacol. 58: 776–784, (2006).

[74]- J.Y. Tyrone S.R. Allam, and S. Igal, ***Structural Effects and Translocation of Doxorubicin in a DPPC/Chol Bilayer: The Role of Cholesterol.*** Biophys J. 20; 101(2): 378–385 (2011).

[75]- O. Piskareva, H. Harvey, J. Nolan, R. Conlon, L. Alcock, P. Buckley, P. Dowling, M. Henry, F. O' Sullivan, I. Bray, R.L. Stallings, ***The development of cisplatin resistance in neuroblastoma is accompanied by epithelial to mesenchymal transition in vitro.*** Cancer Lett. 10; 364(2):142-55 (2015).

[76]- S.H. George, B.M. Gordon, R.K. Abdul, C. B. Jr. Robert and H.S. Zahid, ***Expression of* p53 *in Cisplatin-resistant Ovarian Cancer Cell Lines: Modulation with the Novel Platinum Analogue (*1R, 2R-*Diaminocyclohexane)(*trans-*diacetato)(dichloro)-platinum(IV).*** Clinical Cancer Research Vol. 5, 655–663 (1999).

[77]- W.L. Scott, Athena W.L., ***Apoptosis and cancer.*** Carsinogenesis vol 21.no: 3 pp.485-495 (2000).

[78]- S.Y.W. Rebecca, ***Apoptosis in cancer: from pathogenesisto treatmeant.*** Wong Journal Experimental& Clinical Cancer Research 30: 87 (2011).

[79]- S. Fulda, H. Sieverts, C. Friesen, I. Herr, K.-M. Debatin, ***The CD95 (APO-lIFas) System Mediates Drug-induced Apoptosis in Neuroblastoma Cells,*** Cancer Research, 57: 3823-3829, (1997).

[80]- S. Fulda ve K.M. Debatin, ***Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy,*** Oncogene 25, 4798–4811, (2006).

[81]- H. Zhao, ***Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review.*** Apoptosis and Medicine (2012).

[82]- S. Buddhini, ***Hallmarks of Cancer 3: Evading Apoptosis.*** Scientific American (2 Oct 2013).

[83]- S. Elmore, ***Apoptosis: A Rewiev of Programmed Cell Death.*** *Toxicol Pathol*. 35(4): 495–516 (2007).

[84]- M.S. Ola, M. Nawaz, H. Ahsan, ***Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis***. Mol. Cell. Biochem. 351(1-2), 41–58 (2011).

[85]- J. R. Hom, J. S. Gewandter, L. Michael, S.S. Sheu, Y.Yoon ***Thapsigargin induces biphasic fragmentation of mitochondria through calcium-mediated mitochondrial fission and apoptosis.*** J Cell Physiol, (2):498-508, (2007).

[86]- H. F. Lu, Y. J. Chie, M.S. Yang, C.S. Lee, J. J. Fu, J. S. Yang, T. W. Tan, S. H. Wu, Y. S. Ma, S. W. Ip, J. G. Chung, ***Apigenin induces caspase-dependent apoptosis in human lung cancer A549 cells through Bax- and Bcl-2-triggered mitochondrial pathway.*** Int J Oncol., 36(6):1477-84, (2010).

[87]- Y. J. Lim, J. A. Choi, H. H. Choi, S. N. Cho, H. J. Kim, E. K. Jo, J. K. Park, C. H. *Song,* ***Endoplasmic Reticulum Stress Pathway Mediated Apoptosis in Macrophages Contributes to the Survival of Mycobacterium tuberculosis,*** PLoS One, 6(12), (2011).

[88]- S.W. Tait, D.R. Green, ***Mitochondria and Cell Death: Outer Membrane Permeabilization and Beyond.*** Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11(9):621-32 (2010).

[89]- E.B. Linda, A.R. Jose, G. Guiseppe, ***Molecular Pathways of Drug Resistance. Principles of Molecular Oncology.*** Second Edition (463-486) (2004).

[90]- D. Brenner, T.W. Mak, ***Mitochondrial cell death effectors.*** Curr. Opin. Cell Biol. 21(6), 871–7 (2009).

[91]- J. Lindsay, M.D. Esposti, A.P. Gilmore, ***Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death***. Biochim. Biophys. Acta 1813(4), 532–9 (2011).

[92]- W. Chunxin and J.Y. Richard, ***The Role of Mitochondria in Apoptosis.*** Annu Rev Genet. 43: 95–118 (2009).

[93]- R.I. Inthrani, T. Gregory, P. Shazib, B. Catherine, ***Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells.*** Biochimica et. Biophysica Acta 1807 735–745 (2011).

[94]- L. Huatao, Z. Xiaoqiu, Z. Min, D. Mengling, W. Chao, H. Jingjing, M. Pengju, ***The cytotoxicity and protective effects of Astragalus membranaceus extracts and butylated hydroxyanisole on hydroxyl radical-induced apoptosis in fish erythrocytes.*** Animal Nutrition 2, 376-382 (2016).

[95]- Y. H. Kang, M. J. Yi, M. J. Kim, M. T. Park, S. Bae, C. M. Kang, C. K. Cho, I. C. Park, M. J. Park, C. H. Rhee, S. I. Hong, H. Y. Chung, Y. S. Lee, S. J. Lee, ***Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria,*** Cancer Res., 64(24): 8960-7, (2004).

[96]- R. P. Rastogi, R. Sinha, R. P. Sinha, ***Apoptosıs: Molecular Mechanısms and Pathogenıcıty,*** EXCLI Journal, 8: 155-1, (2009).

[97]- X. Y. Gao, X. J. Geng, W. L. Zhai, X. W. Zhanh, Y. Wei, G. J. Hou, ***Effect of***

combined treatment with cyclophosphamidum and alicin on neuroblastoma-bearing mice. Asian Pac J Trop Med. 8(2):137-41, (2015).

[98]- M. Dole, G. Nunez, A. K. Merchant, J. Maybaum, C. K. Rode, C. A. Bloch, V. P. Castle, ***Bcl-2 Inhibits Chemotherapy-induced Apoptosis in Neuroblastoma.*** Cancer Research, 54: 3253-3259, (1994).

[99]- S.E. Sherif, E. Ru Angelie, L. Wenhan, P. Peter, ***Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates.*** Nature Protocols 3, 1820 - 1831 (2008).

[100]- R. Krissy, S. Laurel, ***Assessment of GFP Expression and Viability Using the Tali Image-Based Cytometer.*** Journal of Visualized Experiments (2011).

[101]- Z. Agnieszka, K. Adrian, L. Anna, K. Anna, G. Alina, ***Expression of cyclin A in A549 cell line after treatment with arsenic trioxide.*** Postepy Hig Med Dosw (online), 69: 1259-1267 (2015).

[102]- Tali® Apoptosis Kit – Annexin V Alexa Fluor® 488 and Propidium Iodide *for use with Tali® Assay: Apoptosis, Catalog no. A10788.

[103]- A. Jarząbski, D. Kiprian, Z. Szutkowski, A. Kawecki, W. Michalski, ***The Results of combinet treatment patients with olfactory neuroblastoma in material of Cancer Center in Warsaw.*** Otolaryngologia Polska Volume 65, Issue 5, Supplement, Pages 93–97 (September 2011).

[104]- R. Corbett, R. Pinkerton, ***Treatment of advanced neuroblastoma.*** European Journal of Cancer Volume 29, Issue 2, Pages 293 (1993).

[105]- C.A. Stiller, ***Pediatric Cancers,*** Reference Module in Biomedical Sciences (2015).

[106]- T. A. Greenhalgh, R. P. Symondst, ***Principles of chemotherapy and radiotherapy.,*** Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine Volume 24, Issue 9, Pages 259–265 (September 2014).

[107]- G. Makin, ***Principles of chemotherapy.*** Paediatrics and Child Health Volume 24, Issue 4, Pages 161–165 (April 2014).

[108]- T.G. Geary, ***Chemotherapy of Parasitic Infections and Infestations.*** Reference Module in Biomedical Sciences (2016).

[109]- A. Jenkins, ***Late effects of chemotherapy for childhood cancer.*** Paediatrics and Child Health Volume 23, Issue 12, Pages 545–549 (2013).

[110]- R. Soffietti, E. Trevisan, R. Ruda, ***Chapter 80 – Neurologic complications of chemotherapy and other newer and experimental approaches.*** Handbook of Clinical Neurology Volume 121, Pages 1199–1218 (2014).

[111]- H. J. Kim, J. Y. Song, H. J. Park, H.K. Park, D. H. Yun, J.H. Chung, ***Naringin Protects against Rotenone-induced Apoptosis in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells.*** Korean J Physiol Pharmacol Vol 13: 281-285, (2009).

[112]- Y. Shirasaka, Y. Li, Y. Shibue, E. Kuraoka, H. Spahn-Langguth, Y. Kato, P. Langguth, I. Tamai, ***Concentration-Dependent Effect of Naringin on Intestinal Absorption of β1-Adrenoceptor Antagonist Talinolol Mediated by P-Glycoprotein and Organic Anion Transporting Polypeptide (Oatp).*** Pharmaceutical Research, Vol. 26, No. 3,(2009).

[113]- P. C. Ho, D. J. Saville, S. Wanwimolruk, ***Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds.*** J Pharm Pharmaceut Sci 4(3): 217-227, (2001).

[114]- J. A.Collazoa, A. I. López-Medinaa, A. A. Rodríguezb, J. L. Alvareza, ***Mechanism of the negative inotropic effect of naringin in mouse heart.*** Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, 2 (5), 148-157, (2014).

[115]- L. Crascì, A. Panico. ***Protective Effects of Many Citrus Flavonoids on Cartilage Degradation Process.*** Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology Vol.4 No.3, Article ID: 34773, 5 pages (2013).

[116]- K. Itoh, N. Hırata, M. Masuda, S. Naruta, K. Murata, K. Wakabayashı, H. Matsuda, ***Inhibitory Effects of Citrus hassaku Extract and Its Flavanone Glycosides on Melanogenesis.*** *Biol. Pharm. Bull.* 32(3) 410- 415 (2009).

[117]- E. Ramesh, A. A. Alshatwi, ***Naringin İnduces Death Receptor And Mitochondria-Mediated Apoptosis İn Human Cervical Cancer (Siha) Cells.*** Food and Chemical Toxicology 51 97–105 (2013).

[118]- X. Song, X.Liu, W. Ch, Y. Liu, L. Wei, X. Wang, J. Yu, ***Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1_ gene.*** Cancer Chemother Pharmacol 58: 776–784 (2006).

[119]- M. Michaelis M.C. Kleinschmidt, S. Barth, F. Rothweiler, J. Geiler, R. Breitling, B. Mayer, H. Deubzer, O. Witt, J. Kreuter, H.W. Doerr, J. Cinatl, J. Cinatl Jr., ***Anti-cancer effects of artesunate in a panel of chemoresistant neuroblastoma cell lines.*** Biochemical Pharmacology 79,130–136 (2010).

[120]- O. Potapova, A. Haghighi, F. Bost, C. Liu, M. J. Birrer, R. Gjerset and D. Mercola, ***The Jun Kinase/Stress-activated Protein Kinase Pathway Functions to Regulate DNA Repair and Inhibition of the Pathway Sensitizes Tumor Cells to Cisplatin.*** The Journal of Biological Chemistry 272, 14041-14044 (1997).

[121]- J. Holford, SY. Sharp, BA. Murrer, M. Abrams and LR. Kelland. ***In vitro circumvention of cisplatin resistance by the novel sterically hindered platinum complex AMD473.*** British Joumal of Cancer 77(3), 366-373 (1998).

[122]- S. W. Johnson, P. B. Laub, J. S. Beesley, R. F. Ozols, and T. C. Hamilton. ***Increased Platinum-DNA Damage Tolerance Is Associated with Cisplatin Resistance and Cross-Resistance to Various Chemotherapeutic Agents in Unrelated Human Ovarian Cancer Cell Lines.*** Cancer Research 57. 850-856. (1997).

[123]- K. V. Ferry, T. C. Hamilton and S. W. Johnson, ***Increased Nucleotide Excision Repair in Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cells.*** Biochemical Pharmacology, Vol. 60, pp. 1305–1313, (2000).

[124]- R.D. Olson, P. S. Mushlın, D.E. Brenner, S.Fleıscher, B. J. Cusack, B.K. Chang, R. J. Boucek, ***Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, Doxorubicinol.*** Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 85, pp. 3585-3589, Medical Sciences (1988).

[125]- Y. A. Rezk, S. S. Balulad, R. S. Keller, J. A. Bennett, ***Use of Resveratrol to improve the effectiveness of cisplatin and doxorubicin: Study in human gynecologic cancer cell lines and in rodent heart.*** American Journal of Obstetrics and Gynecology 194, e23–e26 (2006).

[126]- T. A. H. Jarvinen, M. Tanner, V. Rantanen, M. Barlund, A. Borg, S. Grenman and J. Isola, ***Amplification and Deletion of Topoisomerase II Associate with ErbB-2 Amplification and Affect Sensitivity to Topoisomerase II Inhibitor Doxorubicin in Breast Cancer.*** American Journal of Pathology, Vol. 156, No. 3 (2000).

[127]- C.I. Lin, E. E. Whang, M. A. Abramson, D. B. Donner, M. M. Bertagnolli, F. D. Moore Jr., D. T. Ruan, ***Galectin-3 regulates apoptosis and doxorubicin chemoresistance in papillary thyroid cancer cells.*** Biochemical and Biophysical Research Communications 379, 626–631 (2009).

[128]- W.P. Tsang, Sophia P.Y. Chau, S.K. Kong, K.P. Fung, T.T. Kwok, ***Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent Apoptosis.*** Life Sciences 73 2047–2058 (2003).

[129]- T. Lammers, V. Subr, K. Ulbrich, P. Peschke, P. E. Huber, W. E. Hennink, G. Storm, ***Simultaneous delivery of doxorubicin and gemcitabine to tumors in vivo using prototypic polymeric drug carriers.*** Biomaterials 30, 3466–3475 (2009).

[130]- M. Ajay, AU. Gilani, M. MR, ***Effects offlavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta.*** Life Sci; 74: 603–12 (2003).

[131]- T. Aoki, N. Hashimoto, M. Matsutani, ***Management of glioblastoma***. Expert Opin Pharmacother; 8: 3133–3146 (2007).

[132]- S. Bao, Q. Wu, RE. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, et al***. Glioma stem cells***

promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature; 444: 756–760 (2006).

[133]- VM. Betin, JD. Lane, ***Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis***. J Cell Sci; 122(Pt 14): 2554–2566 (2009).

[134]- S. Bharti, N. Rani, B. Krishnamurthy, DS. Arya, ***Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review.*** Planta Med; 80: 437–51 (2014).

[135]- JA. Block, SE. Inerot, S. Gitelis, J. H. Kimura, ***Synthesis of chondrocytic keratan sulphatecontaining proteoglycans by human chondrosarcoma cells in long-term cell culture.*** J Bone Joint Surg Am Vol; 73: 647–58 (1991).

[136]- YJ. Chen, CW. Chi, WC. Su, H.L. Huang, ***Lapatinib induces autophagic cell death and inhibits growth of human hepatocellular carcinoma***. Oncotarget; 5: 4845-4854 (2014).

[137]- PG. Clarke, ***Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms.*** Anat Embryol (Berl); 181: 195–213 (1991).

[138]- QW. Fan, C. Cheng, C. Hackett, M. Feldman, BT. Houseman, et al. ***Akt and autophagy cooperate to promote survival of drug-resistant glioma.*** Sci Signa; l 3: ra81 (2010).

[139]- D. Gozuacik, A. Kimchi, ***Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism.*** Oncogene; 23: 2891-2906 (2004).

[140]- YC. Hsiao, WH. Kuo, PN. Chen, HR. Chang, TH. Lin, WE. Yang, SC. Chu, ***Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway.*** Chemico-biological interactions; 167 (3), 193-206 (2007).

[141]- JT. Huse, EC. Holland, ***Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma,*** Nat. Rev. Cancer 10; 319–331 (2010).

[142]- S. Kanno, A. Shouji, A. Tomizawa, T. Hiura, Y. Osanai, M. Ujibe, et al. ***Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264. 7 macrophages.*** Life Sci; 78: 673–81 (2006).

[143]- DI. Kim, SJ. Lee, SB. Lee, K. Park, WJ. Kim, SK. Moon, ***Requirement for Ras/Raf/ERK pathway in naringin-induced G1-cell-cycle arrest via p21WAF1 expression.*** Carcinogenesis; 29 (9), 1701-1709 (2008).

[144]- P. Kleihues et al. ***The WHO classification of tumors of the nervous system***. J Neuropathol Exp Neurol.; 61:215–25 (2002).

[145]- S. Pattingre, A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, XH. Liang, N. Mizushima et al. ***Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy.*** Cell; 122: 927–939 (2005).

[146]- O. B. Garcia, J. Castillo, ***Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity.*** J Agric Food Chem. 56: 6185–6205 (2008).

[147]- L. Zeng, Y. Zhen, Y. Chen, L. Zou, Y. Zhang, F. Hu, J. Feng, J. Shen and B. Wei, ***Naringin inhibits growth and induces apoptosis by a mechanism dependent on reduced activation of NF-κB/COX-2-caspase-1 pathway in HeLa cervical cancer cells.*** International Journal of Oncology 45: 1929-1936 (2014).

[148]- H. Li, B. Yang, J. Huang, T. Xiang, X. Yin, J. Wan, F. Luo, L. Zhang, H. Li, G. Ren, ***Naringin inhibits growth potential of human triple-negative breast cancer cells by targeting beta-catenin signaling pathway.*** Toxicol Lett. 220:219–228 (2013).

[149]- TW. Tan, YE. Chou, WH. Yang, CJ. Hsu, YC. Fong, CH. Tang, ***Naringin suppress chondrosarcoma migration through inhibition vascular adhesion molecule-1 expression by modulating miR-126.*** Int Immunopharmacol. 22: 107–114 (2014).

[150]- DI. Kim, SJ. Lee, SB. Lee, K. Park, WJ. Kim, SK. Moon, ***Requirement for Ras/Raf/ERK pathway in naringin-induced G1-cell-cycle arrest via p21WAF1 expression***. Carcinogenesis. 29: 1701–1709 (2008).

[151]- S. Aroui1, F. Najlaoui, Y. Chtourou, A.C. Meunier, A. Laajimi, A. Kenani, H. Fetoui, ***Naringin inhibits the invasion and migration of human glioblastoma cell via downregulation of MMP-2 and MMP-9 expression and inactivation of p38 signaling pathway.*** Tumor Biol. 37: 3831–3839 (2016).

[152]- Y. Chtourou, B. Gargouri, M. Kebieche, H. Fetoui, ***Naringin Abrogates Cisplatin-Induced Cognitive Deficits and Cholinergic Dysfunction Through the Down-Regulation of AChE Expression and iNOS Signaling Pathways in Hippocampus of Aged Rats.*** J Mol Neurosci, s12031 (2015).

[153]- M. Kwatra, A. Jangra, M. Mishra, Y. Sharma, S. Ahmed, P. Ghosh, V. Kumar, D. Vohora, R. Khanam, ***Naringin and Sertraline Ameliorate Doxorubicin-Induced Behavioral Deficits Through Modulation of Serotonin Level and Mitochondrial Complexes Protection Pathway in Rat Hippocampus.*** Neurochem Res, 41: 2352–2366 (2016).

[154]- B. D. Lawenda, K. M. Kelly, E. J. Ladas, S. M. Sagar, A. Vickers, J. B. Blumberg, ***Should Supplemental Antioxidant Administration Be Avoided During Chemotherapy and Radiation Therapy?*** J Natl Cancer Inst;100: 773 – 783 (2008).

[155]- S. Fulda and K.M. Debatin, ***Sensitization for anticancer drug induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol.*** Oncogene 23, 6702–6711 (2004).

[156]- V. Zuco, R. Supino, S. C. Righetti, L. Cleris, E. Marchesi, C. G. Passerini, F. Formelli, ***Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells.*** Cancer Letters 175, 17–25 (2002).

ÖZGEÇMİŞ

20 Aralık 1988 yılında İstanbul'da doğdum. İlköğretimimi İstanbul Eyüp Merkez İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra, ortaöğretimimi Edirne Trakya Birlik İlköğretim Okulunda tamamladım. 2006 yılında Edirne İlhami Ertem Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi Fen Bilimleri Bölümünü bitirdim. 2007 yılında Namık Kemal Üniversitesi Teknik Bilimler MYO'da Gıda Teknolojisi önlisans bölümünü kazandım. 2009 yılında yine aynı üniversitede Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Lisans Bölümüne devam ettim. 2013 yılında Ziraat Fakültesini bitirip İstanbul'da özel bir şirkette Ziraat Mühendisi (Sorumlu Müdür) olarak görev yaptım. 2015 Şubat ayında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. Aynı yıl içerisinde Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma, Geliştirme ve Uygulama, Araştırma Merkezi (TÜTAGEM)'nde Sözleşmeli Uzman olarak göreve başladım ve halen devam etmekteyim.

BİLİMSEL FAALİYETLER

SCI-SSCI veya SCI Expanded Kapsamındaki Yayınlar;

M. Aybeke, N.P. Turker, S. Leventer, P.A. Mimiroğlu, ***Effects of olive mill wastewaters on total DNA and gene expressions of heat shock proteins, antioxidant enzymes and glutathione mechanisms in Sunflower plants,*** Toxicology Letters, Volume 258, Suplement, 16 September 2016, Page S198.

H. Arda, M. Soykan, A. Sarı, N.P. Turker, S. Leventer, ***Effects of heavy metal mixture on DNA damage and gene expressions of heat shock proteins in leaf tissues of Helianthus annuus,*** Toxicology Letters, Volume 258, Suplement, 16 September 2016, Page S199.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan

Bildiriler;

Doganlar O, Kasit M, Doganlar ZB, Türker NP ***The anti-cancer Properties of Salicylic Acid, Naringin and Their mixtures on human colon cancer cell line (HT29),*** IV. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. 27-29.11.2015 Ankara.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler;

Oğuzhan Doğanlar, Nebiye Pelin Türker, Zeynep Banu Doğanlar, Maide Kaşit. ***İnsan kolon kanseri hücre hattında octopamin, naringin, p-coumaric asit ve karışımlarının antikanser etkileri*** XIV. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ 27-30 EKİM 2015, ÖLÜDENİZ / FETHİYE (Ekim 2015).

İn Vitro Kan Kültüründe Ağır Metal Miks Genotoksisite İlişkisinde Quercetin ve Naringin Flavonoidlerinin Koruyucu Rolü. Deneysel Hematoloji Kongresi, Kayseri (Nisan 2015).

Bilimsel Araştırma Projeleri;

Er Stres İndüklenmiş Ht-29 Kolon Kanser Hücre Serisinde Nf-Kb İnhibitörü İle Birlikte Uygulanan Naringinin Mitokondrial Apoptoz Sinyal Yolağindaki Rolü, Yardımcı Araştırmacı, BAP Proje: TUBAP 2016/42.

Er Stres İndüklenmiş C-6 Gloablostama Kanser Hücre Serisinde Curcumin Uygulamasinin Mitokondrial Apoptoz Sinyal Yolağindaki Rolü, Yardımcı Araştırmacı, BAP Proje: TUBAP 2016/130

Nöroblastom ve Astrosit Hücre Hatlarında Naringin ve Farklı Kemoterapi

Ajanları Arasındaki Etkileşimin Belirlenmesi, Yardımcı Araştırmacı, BAP Proje No: TUBAP 2016/231.