ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KATEŞİNİN HeLa HÜCRE HATTINDA APOPTOTİK YOLAKLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hilal Gökçe NALBANTOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hilal Gökçe NALBANTOĞLU tarafından hazırlanan **"Kateşinin HeLa Hücre Hattında Apoptotik Yolaklar Üzerine Etkisinin Araştırılması"** adlı tez çalışması 09/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği /oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Selin ÖZKAN KOTİLOĞLU
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **‘‘Kateşinin HeLa Hücre Hattında Apoptotik Yolaklar Üzerine Etkisinin Araştırılması’’** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (09/02/2023).

Hilal Gökçe NALBANTOĞLU

Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FF211221L25 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KATEŞİNİN HeLa HÜCRE HATTINDA APOPTOTİK YOLAKLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hilal Gökçe NALBANTOĞLU

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN

Kanser günümüzün çok ciddi sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Tedavisinde kullanılan radyasyon ve kemoterapötik ajanların yan etkileri ile kanser hücrelerinin tedaviye direnç göstermesi, tedaviyi kısıtlamaktadır. Bu nedenle kanser hücrelerine seçici ve yan etkileri az olan tedavi yöntemleri araştırılmaya devam etmektedir. Bu tedavi arayışında fitokimyasallardan flavonoidlerin kanser hücreleri üzerindeki etkileri çok sayıda çalışmayla gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında flavonoidlerin en önemli gruplarından olan kateşinlerden Epikateşin (EC) ve Epikateşin gallat (ECG)'ın insan servikal adenokarsinoma hücre hattı olan HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

EC ve ECG'nin 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 100 ppb, 10 ppb ve 1 ppb'lik dozlarının HeLa hücrelerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi. 72 saatlik kateşin maruziyeti sonucunda hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonu olan IC_{50} değeri EC için 48.91 ppm (168,5 μM) ve ECG için 4.47 ppm (10,10 μM) olarak hesaplandı. EC ve ECG'nin HeLa hücrelerinde apoptotik yolaklar üzerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla önemli apoptotik proteinlerden Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 proteinlerinin ifadesi ELISA yöntemi ile araştırıldı. ELISA testi için HeLa hücreleri 72 saat boyunca iki kateşinin de belirlenen IC_{50} değerlerinin 1/10'luk ve 1/100'lük dozları ile inkübe edildi. Bu dozlar EC için sırasıyla 4.89 ve 0.489 ppm, ECG için 0.447 ve 0.0447 ppm olarak hesaplandı. Her iki kateşinin de kontrol grubuna göre apoptozu inhibe eden bcl-2 proteinin ifadesini artırdığı saptandı. EC'nin 4.89 ppm'lik dozunda apoptozu indükleyen bax ifadesinde azalma ve 0.489 ppm'lik dozunda artış görüldü. ECG'nin ise her iki dozunun da bax ifadesini artırdığı belirlendi. Apoptoz oluşumundaki en önemli proteinlerden olan kaspaz-3 ifadesinde ise aynı şekilde EC'nin 4.89 ppm'lik dozunda kontrole göre azalma görülürken 0.489 ppm'lik dozunda ve ECG'nin her iki dozunda belirgin olmayan bir artış görüldü.

Sonuç olarak bax/bcl-2 oranına ve kaspaz-3 ifadesindeki belirgin olmayan artışa göre HeLa hücrelerinde EC'nin apoptozu indüklemediği ve ECG'nin ise az da olsa apoptozu indüklediği belirlendi. Saptanan IC_{50} değerleri literatürdeki diğer hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında EC ve ECG'nin HeLa hücreleri üzerinde iyi bir sitotoksisite gösterdiği anlaşıldı.

2023, 78 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: HeLa, epikateşin, epikateşin gallat, apoptoz, bcl-2, bax, kaspaz-3

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CATECHIN ON APOPTOTIC PATHAWAYS IN HeLa CELL LINE

Hilal Gökçe NALBANTOĞLU

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology Sciences

Advisor: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Pınar ARSLAN

Nowadays, cancer is one of the most serious health problems of human. The cancer treatment is limited by the side effects of radiation and chemotherapeutic agents and also resistance to cancer treatment of cancer cells. For this reason, it has been investigated that the selective treatment methods on cancer cells. There were many researches showed that the effects of phytochemicals flavonoids on cancer cells. In this thesis, it was aimed to investigate the cytotoxic and apoptotic effects of Epicatechin (EC) and Epicatechin gallate (ECG), which are one of the most important groups of flavonoids, on HeLa cells, which have human cervical adenocarcinoma cell line.

The cytotoxic effects of 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 100 ppb, 10 ppb and 1 ppb doses of EC and ECG on HeLa cells were determined by MTT test. The IC_{50} value, which is the inhibition concentration at which show 50% viability of cells, was calculated as 48.91 ppm (168,5 μM) for EC, and 4.47 ppm (10.10 μM) for ECG after 72 hours of catechin exposure. In order to determine the effects of EC and ECG on apoptotic pathways in HeLa cells, the expression of important apoptotic proteins Bcl-2, Bax and Caspase-3 was investigated ELISA method. For the ELISA test, HeLa cells were incubated with doses of 1/10 and 1/100 of the determined IC_{50} values of both catechins for 72 hours. These doses were calculated as 4.89 and 0.489 ppm for EC, and 0.447 and 0.0447 ppm for ECG, respectively. It was found that both catechins increased the expression of Bcl-2 protein, which inhibits apoptosis, compared to the control group. A decrease in apoptosis-inducing bax expression was observed at the 4.89 ppm dose of EC and an increase at the 0.489 ppm dose. It was stated that both doses of ECG increased bax expression. In the expression of caspase-3, which is one of the most important proteins in the formation of apoptosis, a decrease was observed in the 4.89 ppm dose of EC compared to the control, while an insignificant increase was found in the 0.489 ppm dose and in both doses of ECG.

As a result, it was determined that the ratio of bax/bcl-2 and caspase-3 expression, EC did not induce apoptosis in HeLa cells but ECG slightly were. It was dedicated that EC and ECG showed efficient cytotoxicity on HeLa cells when the detected IC_{50} values were compared with other cell lines in the literature.

2023, 78 pages

Keywords: HeLa, epicatechin, epicatechin gallate, apoptosis, bcl-2, bax, caspase-3

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

‘‘Kateşinin HeLa Hücre Hattında Apoptotik Yolaklar Üzerine Etkisinin Araştırılması’’ adlı bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne “Yüksek Lisans Tezi” olarak sunulmuştur.

Tez çalışmamdaki tüm deneylerim için gerekli olan laboratuvardan, cihazlardan, kimyasal malzemeler ve sarf malzemelerinden yararlanma imkânı sunan T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Şap Enstitüsü Müdürü Veteriner Hekim Ertan AĞTÜRK’e, Teknik Hizmetler Koordinatörü Veteriner Hekim Hidayet Bozoğlu’na ve deneylerimde yardımlarını, bilgi birikimlerini esirgemeyen Hücre Bankası Birimi’nden Uzm. Biyolog Hilal PARLAK’a ve diğer tüm birim çalışanlarına, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürü Dr. Veteriner Hekim Cevdet Yaralı’ya ve Virolojik Teşhis Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen, gösterdikleri tüm samimiyet, ilgi ve anlayışlarıyla yanımda olan çok değer verdiğim danışman hocalarım Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK ve Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN’a çok teşekkür ederim.

Tez aşamamda her türlü sorumu çekinmeden sorabildiğim ve her zaman tüm samimiyetiyle bana yardımcı olan Öğr. Gör. Dr. Deniz ÇAKAR’a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her anlamda yanımda olan, maddi, manevi desteklerini, sevgilerini hep hissettiren, her koşulda bana güvenen ve inanan canım annem Uzm. Öğretmen Ayşe NALBANTOĞLU ve canım babam Veteriner Hekim Turan NALBANTOĞLU ile anneannem Necmiye DEDE, teyzem Doç. Dr. Neşe Nuray TOPRAK, dayım Prof. Dr. Murat DEDE’ye ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Lisans ve özellikle yüksek lisans hayatım boyunca her zaman, koşul ve zorlukta yanımda olan, çok sevdiğim canım arkadaşlarım Burcu BARAN ve yüksek lisans eğitimimin

sonlarında tanıştığım her açıdan birbirimize hep destek olduğumuz Sena BAYRAKTAR'a çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimimde TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı (2021-2) kapsamında desteklendiğim için çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tez çalışmamı FF211221L25 numaralı proje ile destekleyen Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne teşekkürlerimi sunarım.

Hilal Gökçe NALBANTOĞLU
Çankırı, Şubat 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **x**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **4**
2.1 Tıbbi ve Aromatik Bitkiler **4**
2.1.1 Flavonoidler **5**
2.1.2 Kateşinler **9**
2.1.3 Epikateşin ve epikateşin gallat **12**
2.2 Kanser **16**
2.2.1 Serviks kanseri **21**
2.2.2 HeLa hücreleri **28**
2.3 Apoptoz **29**
2.3.1 Apoptozun mekanizmaları ve düzenlenmesi **31**
3. MATERYAL VE METOT **38**
3.1 Materyal **38**
3.1.1 Kimyasal malzemeler **38**
3.2 Metot **39**
3.2.1 Hücre kültürü **39**
3.2.2 Kateşin dozlarının hazırlanması ve uygulanması **41**
3.2.3 MTT analizi **43**
3.2.4 Apoptotik yolak testleri **44**
3.2.5 Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi **52**
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **53**
4.1 EC ve ECG'nin HeLa Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri **53**
4.2 EC ve ECG'nin HeLa Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi **55**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **67**

KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 78

SİMGELER DİZİNİ

mg	Miligram
ml	Mililitre
kg	Kilogram
dk	Dakika
nm	Nanometre
cm	Santimetre
ppb	Milyarda bir kısım(mikro)
ppm	Milyonda bir kısım (nano)
ppt	Trilyonda bir kısım (piko)
ppq	Katrilyonda bir kısım (femto)
rpm	Devir/Dakika
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
Gy	Gray
Ca^{2+}	Kalsiyum
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
vd	Ve diğerleri

KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	Apoptoz indükleyici faktör
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
BH	Bcl-2 Homoloji
C	Kateşin
CAD	Kaspaz aktive edici DNAz
CIN	Servikal intraepitelyal neoplazi
DD	Ölüm bölgesi
DISC	Ölüme neden olan sinyal kompleksi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DU145	Metastatik prostat kanser hücre hattı
EC	Epikateşin
ECG	Epikateşin gallat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGC	Epigallokateşin
EGCG	Epigallokateşin gallat
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Endo-G	Endonukleaz-G
FADD	FAS ile ilişkili ölüm domaini
FBS	Fetal sığır serumu
FIGO	Internasyonal federasyon jinekolojik obstetrik
GC	Gallokateşin
HeLa	İnsan serviks adenokarsinoma hücresi
HFFF2	İnsan fibroblast hücre hattı
HH450	Orta derece epiteryal yumurtalık kanseri hücre hattı
HH639	Zayıf farklılaşmış epitelyal yumurtalık kanseri hücre hattı
HH870	Organa sınırlı prostat kanseri hücre hattı
HIV	İnsan bağışık yetmezliği virüsü

HPV	İnsan papilloma virüsü
HSIL	Yüksek dereceli skuamöz intraepiteryal lezyon
HSV	Herpes simplex virüsü
IAP	Apoptoz inhibitörleri
IARC	Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
IC_{50}	%50 canlılık gösteren inhibisyon konsantrasyon
ICAD	İnaktif kaspaz aktive edici DNaz
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
LSIL	Düşük dereceli skuamöz intraepiteryal lezyon
MDA	Malondialdehit
MOMP	Mitokondriyal dış membran geçirgenliği
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid
NGF	Nöron büyüme faktörü
PAP	Papanicolaou
PDAC	İnsan pankreas duktal adenokarsinom
pRb	Retinoblastoma proteini
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SCJ	Skuamo-kolumnar junction
SIL	Skuamöz intraepiteryal lezyon
SKOV-3	İnsan over kanser hücre hattı
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
SOD	Süperoksit dismutaz
TGFa	Sarkomlar tümör büyüme faktörü
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRADD	TNFR-1 ile ilişkili ölüm domaini
TRAIL	TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
XIAP	X bağlantılı apoptoz inhibitör protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Flavonoidlerin yapısı 6
Şekil 2.2 Kateşinlerin kimyasal yapısı 11
Şekil 2.3 EC ve ECG'nin moleküler yapısı 13
Şekil 2.4 ECG'nin kanser hücrelerine karşı kemoprevensiyon etkileri 13
Şekil 2.5 Kanserin oluşum süreci 17
Şekil 2.6 Kanser hücrelerinde görülen 6 ortak ve ayırt edici özellik 19
Şekil 2.7 Dişi üreme sistemi organları 21
Şekil 2.8 Serviksin bölümleri 22
Şekil 2.9 p53 ve pRb tümör baskılayıcı genleri normal fonksiyonlarına engel olan E6 ve E7 onkoproteinleri 25
Şekil 2.10 HPV enfeksiyonu ile servikal kanser oluşumu 25
Şekil 2.11 Prekanseröz lezyonların invaviz servikal kansere dönüşümü 26
Şekil 2.12 Servikal kanser evreleri 27
Şekil 2.13 Apoptozun düzenlenmesinde instrinsik ve ekstrinsik yollar 32
Şekil 2.14 Bax ve bak aktivasyonu 35
Şekil 3.1 Pleyte ekilen hücrelerin inkübasyonu sonrasında kateşin dozlarının uygulanması 42
Şekil 3.2 HeLa hücrelerinin 6 kuyucuklu pleyte ekilmesi 45
Şekil 3.3 ELISA testi için hücrelere kateşin dozlarının uygulanması 46
Şekil 3.4 HeLa hücrelerinin kateşin uygulanmamış kontrol grubunun 72 saatlik mikroskop görüntüsü (200 μm) 47
Şekil 3.5 HeLa hücrelerinin 1/10 konsantrasyonundaki EC'nin 72 saatlik inkübasyonu sonrasındaki mikroskop görüntüsü (200 μm) 47
Şekil 3.6 HeLa hücrelerinin 1/100 konsantrasyonundaki EC'nin 72 saatlik inkübasyonu sonrasındaki mikroskop görüntüsü (200 μm) 48
Şekil 3.7 HeLa hücrelerinin 1/10 konsantrasyonundaki ECG'nin 72 saatlik inkübasyonu sonrasındaki mikroskop görüntüsü (200 μm) 48
Şekil 3.8 HeLa hücrelerinin 1/100 konsantrasyonundaki ECG'nin 72 saatlik inkübasyonu sonrasındaki mikroskop görüntüsü (200 μm) 49
Şekil 3.9 Dondurucuda bekletilen PBS'li hücre pelletleri 50
Şekil 4.1 Epikateşinin hücre canlılık grafiği 54
Şekil 4.2 Epikateşin gallatın hücre canlılık grafiği 55
Şekil 4.3 Bax apoptotik yolak testi absorbans grafiği 57
Şekil 4.4 Kateşinlerin varlığında bax aktivitesi 57
Şekil 4.5 Bcl-2 apoptotik yolak testi absorbans grafiği 58
Şekil 4.6 Kateşinlerin varlığında bcl-2 aktivitesi 58
Şekil 4.7 Kaspaz-3 apoptotik yolak testi absorbans grafiği 59
Şekil 4.8 Kateşinlerin varlığında kaspaz-3 aktivitesi 59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kullanılan malzeme listesi 38
Çizelge 4.1 Apoptoz oluşumunun gösterilmesi 56

1. GİRİŞ

Genetik ve çevresel birçok faktörün etkili olduğu ve çok aşamalı olarak gelişen kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Kansere bağlı ölümler tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık görülen ikinci ölüm nedenidir. Karsinojen ajanların gün geçtikte artması kanser hastalığının görülme sıklığını ve dolayısıyla kansere bağlı ölümleri de artırmaktadır. Genetik olarak meydana gelen mutasyonlar ve karsinojen ajanlar ile serbest radikaller gibi bileşenler DNA'da hasara neden olmaktadır. Bu hasarların zaman içerisinde birikmesi, mutasyonlar sebebiyle onarılamaması ve apoptozun gerçekleşememesiyle hücreler, kontrolsüz olarak çoğalmaya başlar ve tümör oluşumuna neden olur. Genellikle hızlı çoğalan, yayılma eğilimi göstererek uzak organlara sıçrayabilen kötü huylu tümörler kanser oluşturur.

Çok hücreli organizmaların yaşamlarını sağlıklı bir şekilde sürdürebilmeleri için hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengenin sağlanması gereklidir. Hücreler dokularda fizyolojik olarak sürekli çoğalır ve yaşamını tamamlayan hücreler çoğalan hücrelere yer açmak için ölürler. Bu çoğalma ve ölüm arasındaki dengede, genetik olarak programlanan ve kontrollü bir şekilde hücreleri ölüme gönderen apoptoz olayı kritik öneme sahiptir. Apoptozun dokularda az veya çok fazla gerçekleşmesi kanser başta olmak üzere birçok hastalığın patogeneziyle ilişkilendirilmektedir (Favaloro *et al.* 2012). Kanser, apoptozun azalması ve kontrolsüz çoğalmayla karakterize bir hastalıktır.

Kanser hücreleri apoptoza karşı direnç gösterdiklerinden bu hücrelerde apoptozun indüklenmesi tedavi için çok önemlidir. Birçok kemoterapötik ajanın hedefi apoptozu indükleyerek tedaviyi sağlamaktadır. Apoptozun düzenlemesinde görev alan Bcl-2 gen ailesinden pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin oranı apoptozu indükleyen faktörlerdendir. Apoptozu indükleyen bax'ın apoptozu inhibe eden bcl-2'ye oranı arttığında apoptoz oluşumu uyarılır. Apoptozda önemli olan bir diğer protein ailesi de kaspazlardır. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolaklarının her ikisinde de farklı proteinler ile kaspaz-3'ün aktivasyonu sağlanır ve böylece apoptoz gerçekleşir.

Servikal kanser HPV enfeksiyonu ile ilişkili ve bu sebeple diğer kanser türlerinden farklı olarak önlenebilen bir kanser türüdür. Buna rağmen dünyada kadınlarda meme, kolorektal ve akciğer kanserinden sonra dördüncü en sık teşhis edilen kanserdir. Tedavisinde cerrahi müdahale ile birlikte kemoterapi ve radyoterapi kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlar vücutta çok fazla serbest radikal ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretebildiğinden sadece kanserli hücreleri değil sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. Bu durum hasta bireylerde çok ciddi yan etkilere sebep olabilmektedir. Bu yan etkilerin azaltılması, önlenebilmesi ve tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla kanser hücrelerine spesifik olarak etki eden ilaçların keşfi için araştırmalar devam etmektedir. Günümüzde yan etkilerin azaltılması ve kemoterapötik ajanların etkisinin artırılması amacıyla antioksidan, antikanser, antiproliferatif ve apoptotik özellikleri bulunan fitokimyasalların kemoterapi ile birlikte kullanımları mevcuttur.

Flavonoid grubu antioksidanların kanser dahil birçok hastalığa karşı olumlu etkileri bilinmektedir. Birçok kemoterapi ilacı vücudun tolere edebileceğinden daha fazla serbest radikal ve ROS meydana getirir. Hücrede düşük dozda bulunduklarında hücre içi haberleşme uyarımlarında bulunurlarken yüksek dozdayken hücre fonksiyonlarını bozarlar. Bu denge antioksidanlar ile sağlanır. ROS miktarı arttığında hücrelerde oksidatif stres oluşur. Endojen antioksidanlar oksidatif stres durumunda yetersiz kalır ve eksojen antioksidanlara ihtiyaç duyulur. Kateşin, flavonoidlerin flavanol grubunda yer alan bir antioksidandır ve son yıllarda çok sayıda araştırmanın konusu olmuştur. Antikanser, antiproliferatif, antioksidan, antiinflamatuar, antiobezite ve antidiyabetik aktiviteleri bilinmektedir (Isemura 2019).

Yeşil çay, kateşinlerin en sık çalışılan 4 türevini içermektedir. Yeşil çaydaki ana bileşen epigallokateşin gallat (EGCG) olduğundan yapılan kateşin çalışmaları EGCG üzerinde yoğunlaşmıştır. Birçok kanser hücre hattında apoptozun oluşumunda görev alan bcl-2, bax ve kaspaz-3 proteinlerini etkileyerek apoptozu indüklediği ve proliferasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Literatürde epikateşin gallat (ECG) ve özellikle epikateşin (EC) ile yapılan kanser çalışmaları ise kısıtlı sayıdadır. Araştırmalarda en sık kullanılan hücre hatlarından biri olan HeLa servikal kanser hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda da EGCG kullanılmıştır. EC ve ECG'nin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi

bilinmemektedir. Çalışmamız, EC ve ECG'nin HeLa hücre hattında apoptotik yolaklardaki bax, bcl-2 ve kaspaz-3 proteinlerinin aktivitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesini amaçlamaktadır. Literatürde HeLa hücre hattında EC ve ECG'nin, bcl-2, bax ve kaspaz-3 aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmaması sebebiyle çalışmamız özgündür.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Tıbbi ve Aromatik Bitkiler

Bitkiler, hastalıkların tedavisi, gıda, baharat, parfüm, sabun, kozmetik ve ilaç gibi çok çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Tedavi amaçlı olarak kullanılmaları çok eski çağlara dayanmaktadır. Dünya üzerinde yaklaşık 500.000 civarında bitki tanımlanmıştır ve her geçen yıl yeni bitki türleri tanımlanmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre bu bitkilerin yaklaşık 70.000 kadarı tıbbi amaçlı kullanılmaktadır (Demirezer 2010). Birçok hastalığın tedavisinde ve hastalığa karşı korunmada kullanılmaları, tıbbi ve aromatik bitkilerin en dikkate değer ve en çok araştırılan özelliğidir. Tedavi ve korunmanın yanı sıra bazı ilaç tedavilerinde, ilacın etkinliğini arttırarak ya da ilacın yan etkilerini azaltarak tedaviye katkı sağlarlar. Ancak bilinçsizce kullanılan bitkiler, ilacın etkisini değiştirebilir ve tedavide istenmeyen etkilere sebep olabilirler (Yipel vd. 2020).

Bitkilerin koruyucu ve tedavi edici etkileri, sentezledikleri fitokimyasal bileşenlerden kaynaklanır. Bir bitki türü binlerce farklı kimyasal bileşen içerebilir. Bu bileşenler bitkilerin metabolik süreçlerine göre değişkenlik göstermektedir. Hücre bölünmesi ve büyümesi, solunum, fotosentez, üreme gibi temel yaşamsal olaylar için esas olan karbonhidrat, aminoasit ve lipit gibi primer metabolitlerin sentezi hemen hemen tüm bitkilerde aynıdır (Hussein and El-Anssary 2019). Primer metabolitlerden türeyen ve bitkilerin temel metabolik süreçlerinde görev almayan sekonder metabolitler, özellikle stres durumunda sentezlenir ve bitkilerin çevreyle olan ilişkilerinde rol oynar. Tıbbi ve aromatik bitkiler herhangi bir biyotik (bakteri, mantar, böcek gibi) ya da abiyotik (kuraklık, sıcaklık, nem, yaralanma gibi) stres faktörü ile karşılaştığında savunma mekanizması olarak sekonder metabolit sentezlerler (Bakır 2020, Çelik ve Ayran 2020). Bitkilerin tıbbi ve aromatik özellikleri de sekonder metabolitlerden kaynaklanır (Velu *et al.* 2018).

Sekonder metabolitler, terpenler, alkoloidler ve fenolik bileşikler olarak üç ana gruba ayrılır. Kimyasal olarak bir veya daha fazla hidroksil (-OH) grubunun aromatik benzen

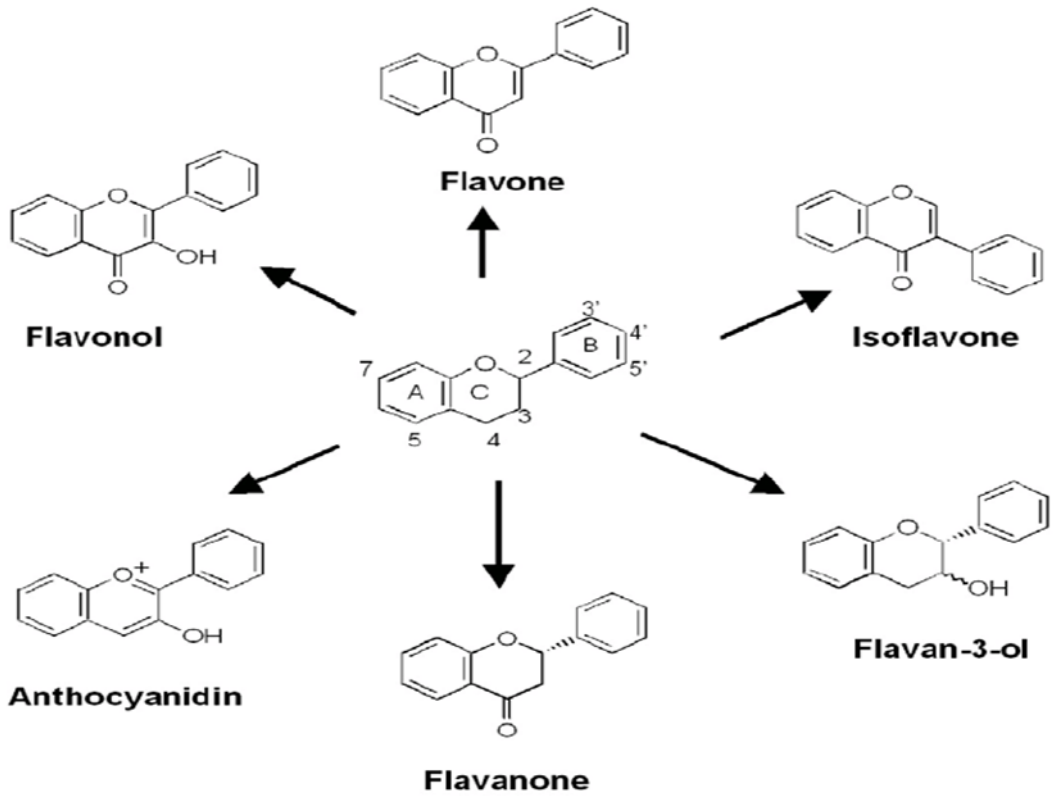
halkasına bağlanmasıyla fenol oluşur. Fenolik bileşikler en az bir fenol grubundan oluşurken iki ya da daha fazla fenolden oluşan bileşikler polifenol adını alır. Birçok meyve, sebze, tahıl ve baklagil fenolik bileşik içerir. Bitkilerin tat, koku ve renk gibi karakteristik özelliklerinden fenolik bileşikler sorumludur (Karabulut ve Yemiş 2019). Fenolik bileşikler açısından zengin diyet gıdalarının uzun süreli alımının, yaygın görülen kanser, diyabet, kardiyovasküler ve nörodejenaratif hastalıkların gelişimine karşı koruyucu etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Mutha *et al*. 2021).

Fenolik bileşikler farklı kaynaklarda farklı şekillerde gruplara ayrılmıştır. Temel olarak flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olarak sınıflandırılabilirler (Karabulut ve Yemiş 2019). Fenolik asitler, stilbenler ve lignanlar flavonoid olmayan fenolik bileşiklerdir ve bugüne kadar 8.000'den fazla polifenol tanımlanmıştır (Kabera *et al.* 2014). Bitkilerin insan sağlığındaki koruyucu etkileri içerdikleri lif, vitamin ve minerallerin yanı sıra fenolik bileşikler ve özellikle flavonoidlerden kaynaklanmaktadır (Crozier *et al.* 2010). Flavonoidler, yüksek antioksidan ve terapötik etkileri sebebiyle son yıllarda en yaygın çalışılan fitokimyasallar arasındadır (Hidalgo *et al.* 2010).

2.1.1 Flavonoidler

Flavonoidler bilim insanları tarafından ilk olarak 1930 yılında portakaldan izole edildiklerinde P Vitamini olarak adlandırılmıştır. Daha sonra vitamin olmadığı anlaşıldığında flavonoid olarak tanımlanmıştır (Kumar and Pandey 2013). Flavonoidler polifenollerin en çeşitli ve en çok izole edilen sınıfıdır. Bugüne kadar bitkilerde 6.000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır ve bu sayı gün geçtikçe artmaktadır (Mutha *et al.* 2021). Kimyasal yapılarında 15 karbon içeren flavonoidler, bir heterosiklik piran halkası ile bağlanmış iki benzen halkasından oluşur (Muhsiroğlu 2017). Düşük molekül ağırlığına sahiptirler ve doğal bileşikler olduğundan biyoflavonoid olarak da adlandırılırlar. Flavonoidlerin çoğu fenilpropanoid ve glikoz metabolizması sonucu oluşan şikimit asit metabolik yolaklarından sentezlenir (Karabulut ve Yemiş 2019). Temel olarak flavanol (kateşin, epikateşin), flavonol (kersetin, kaempferol, mirisetin), flavon (tangeritin, apigenin, luteolin), flavanon (lavanon, hesperetin, naringenin), izoflavon (genistein, daidzein) ve antosiyanidinler (delfinidin, siyanidin) olarak 6 sınıfa ayrılırlar (Şekil 2.1).

Bu sınıfların kimyasal yapılarında heterosiklik piran halkasının oksidasyon seviyeleri farklılık gösterir (Kumar and Pandey 2013).



Şekil 2.1 Flavonoidlerin yapısı (Nishiumi *et al.* 2011)

Flavonoidler meyve, sebze, tahıl, baklagil, yağlı tohum, ot, çay ve şarap gibi çok sayıda gıda bileşeninde, bitkilerin çiçek, yaprak, gövde ile kök kısımlarında farklı tür ve miktarlarda bulunurlar (Muhsiroğlu 2017, Tungmunnithum *et al.* 2018). Çoğu çiçek, meyve ve tohuma rengini veren maddeler flavonoidlerdir. Çiçeklere verdikleri renk sayesinde tozlaştırıcıları bitkiye çekerler. Ayrıca, bitkiyi ultraviyole radyasyondan koruma, hücre döngüsü inhibisyonu, hücre sinyalleşmesi, oksin taşınması, fotosentezin düzenlenmesi ve bazı bitki hastalıklarına karşı savunma gibi çok çeşitli işlevleri vardır (Falcone Ferreyra *et al.* 2012, Batra and Sharma 2013). Flavonoidler insan sağlığı üzerinde çok sayıda olumlu etkiye sahiptir. Antioksidan, antidiyabetik, antibakteriyel, antiinflamatuar, antikanser, antiviral, kardiyoprotektif ve nöroprotektif aktivite gösterdikleri birçok çalışmayla rapor edilmiştir (Tungmunnithum *et al*. 2018, Mutha *et al*. 2021). Flavonoidlerin biyoyararlanımı, metabolizma ve biyolojik aktivitesi,

konfigürasyonlarına, hidroksil grup sayılarına ve fonksiyonel grupların yer değiştirmesine bağlıdır (Kumar and Pandey 2013).

Hemen hemen tüm flavonoid sınıflarının en iyi tanımlanan ve araştırılan özelliği antioksidan aktiviteleridir. Antioksidanlar temel olarak hücre ve dokuları serbest radikallerin toksik etkilerinden korurlar. Serbest radikaller dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron taşıdıklarından diğer maddelerle kolay bir şekilde reaksiyona giren atom veya moleküllerdir. Normal hücre metabolizmasının yan ürünleri olarak vücutta fizyolojik ve patolojik koşullar altında üretilirler. Hücrelerde meydana gelen metabolik reaksiyonların gerçekleşmesi için gereken oksijenin %90'ı mitokondrideki oksidatif fosforilasyon esnasında kullanılmaktadır. Ancak bu oksijenin %1-3'ü reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüşmektedir (Karabulut ve Gülay 2016). ROS normal oksijen molekülüne göre çok daha fazla kimyasal reaktiviteye sahip oksijen formlarıdır (Koca ve Karadeniz 2003). Mitokondrinin yanı sıra inflamasyon sırasında immün sistem hücreleri tarafından ve hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonların bir sonucu olarak üretilirler. Bu şekilde üretilen endojen kaynakların dışında radyasyon, alkol, sigara, çevreyi kirleten kimyasallar, ilaçlar, pestisitler ve ağır metaller gibi eksojen kaynaklar da serbest radikal oluşumuna yol açar. Vücuda nüfuz ettikten sonra eksojen bileşikler ayrışır ve serbest radikallere metabolize edilir (Pham-Huy *et al*. 2008). ROS dışında reaktif nitrojen türleri (RNS) de endojen ve eksojen olarak üretilen serbest radikallerdendir. Bu serbest radikeller arasında başlıcalar süperoksit anyonu, hidroksil ve peroksil radikali ile nitrik oksittir. Serbest radikal olmayan ve oksidan olarak adlandırılan hidrojen peroksit, hipokloröz asit, ozon, nitröz asit, peroksinitrit ve lipit peroksit de kolayca serbest radikal oluşturan reaksiyonlara yol açabilirler.

Serbest radikaller vücut için toksik etkiler dışında yararlı etkilere de sahiptir. Düşük veya orta düzeyleri immün savunma sistemi ve hücre içi sinyalleşme için gereklidir (Koçyiğit ve Selek 2016). Ancak fazla üretildiklerinde oksidatif strese neden olarak hücresel fonksiyonları bozarlar. Normal fizyolojik şartlarda vücuttaki serbest radikal ve ROS miktarı, antioksidan savunma ile dengede tutulur. Bu denge sağlanamadığında, vücudun tolere edebileceğinden daha fazla miktarda serbest radikal üretildiğinde hücrelerde oksidatif stres denilen durum ortaya çıkar. Böylece serbest radikaller hücrede bulunan

lipit, protein, karbonhidrat ve DNA ile reaksiyona girerek oksidatif hasara yol açar. Bu hasarların, kanser, artrit, otoimmün bozukluklar, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik ve dejeneratif rahatsızlıkların gelişiminde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (Pham-Huy *et al*. 2008).

Serbest radikallerin ve sebep oldukları oksidatif stresin ortadan kaldırılması vücutta üretilen endojen ve dışarıdan diyetle alınan eksojen antioksidanlarla sağlanır. Oksidatif stres durumunda vücutta üretilen endojen antioksidanlar yetersiz kalabilir ve eksojen antioksidanlara ihtiyaç duyulur. Dışarıdan diyetle alınan E, A ve C vitaminleri ile flavonoidler, antioksidan aktivite göstererek serbest radikal oluşumuna sebep olan oksidanlar ile bir denge kurmada kilit rol oynarlar. Endojen ve flavonoidler gibi eksojen antioksidanlar farklı etki mekanizmalarına sahip olsalar da amaçları aynıdır ve sinerjik olarak çalışırlar (Koçyiğit ve Selek 2016). Serbest radikallerle reaksiyona girer ve onları kararlı hale getirerek serbest radikallerin hayati moleküllerle etkileşime girmesini engellerler. ROS üretimine sebep olan mikrozomal monooksijenaz, mitokondriyal süksinoksidaz ve NADH oksidaz gibi enzimlerin inhibisyonunu sağlayarak serbest radikal oluşumunun önüne geçerler. Endojen ve enzimatik antioksidanlardan en etkili olanları glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazdır. Bu enzimler enzim ağı şeklinde etkilerini gösterirler. Oksidatif fosforilasyon gibi metabolik reaksiyonlarla açığa çıkan süperoksit anyonu önce SOD tarafından moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüştürülür. Glutatyon peroksidaz ve katalaz, oksidan olan hidrojen peroksiti suya indirgeyerek serbest radikal oluşumunu engeller (Lobo *et al.* 2010).

Flavonoidler ve diğer eksojen antioksidanlar serbest radikalleri indirgeyici, hidrojen verici, ROS oluşturan enzimleri inhibe edici, singlet oksijen tutucu ve metal şelatörü olarak antioksidan etki göstermenin yanı sıra endojen antioksidanların etkilerini de artırırlar. Ancak eksojen antioksidanların antioksidatif etkileri uygun doza bağlıdır. Sağlıklı bireylerde fizyolojik dozlarda antioksidanların güvenli olduğu ve özellikle kansere karşı preventive etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Ancak yüksek dozda alındıklarında pro-oksidatif etki göstererek ROS artışına bağlı kanser riskini artırdıkları düşünülmektedir. Kanser hücrelerinin metabolik aktivitelerinin yüksek olması nedeniyle endojen ROS üretimi sağlıklı hücrelere oranla çok daha fazladır. Kanser hücrelerindeki

ROS, hücre proliferasyonunda artış ve apoptoza karşı direnç sağlar (Batra and Sharma 2013). Yüksek doz antioksidan alımında oluşan pro-oksidatif etki ile fazla ROS'un kümülatif etki göstererek kanser hücrelerini selektif olarak öldürmesinin, flavonoidlerin antikanser etki mekanizmalarından biri olduğu düşünülmektedir. Pro-oksidan aktiviteleri de bu antioksidanların moleküler yapısı ve konsantrasyonları ile ilgilidir. Özellikle bakır, demir gibi metal iyonların varlığında bu aktivitelerini sergilerler (Koçyiğit ve Selek 2016).

Flavonoidlerin antikanser özellikleri literatürdeki *in vitro* ve *in vivo* birçok çalışmayla gösterilmiştir. Flavonoid türevli bazı kanser türlerinde kullanılan antikanser ilaçlar da bulunmaktadır. Fenolik bileşiklerden özellikle flavonoidler kanser tedavisinde kemopreventif ajanlar olarak da rapor edilmişlerdir (Tungmunnithum *et al*. 2018). Flavonoidler antikanser etkilerini hücre döngüsünün durdurulması, apoptozun indüklenmesi, kanser hücre proliferasyonunun ve invazivliğinin baskılanması ve ROS'un süpürülmesi şeklinde gösterirler. Normal şartlarda antioksidan aktivite gösterirken kanser hücreleri için apoptotik süreci uyaran güçlü pro-oksidanlardır. Kanser hücrelerinde anti-apoptotik proteinleri baskılayıp pro-apoptotik proteinleri uyararak kaspaz aktivasyonu ile apoptozu indüklerler. Flavonoidlerin hem antioksidan hem de pro-oksidan aktivite göstermeleri antikanser özelliklerinde rol oynar (Kopustinskiene *et al.* 2020). Kronik inflamasyon da hücresel transformasyon, proliferasyon, invazyon, metastaz ve anjiyogenez yolaklarını modüle ederek tümör gelişimine yol açan olgulardan biridir. Flavonoidlerin, bağışıklık hücre düzenlemesi, kemokinlerin, sitokinlerin, pro-inflamatuar transkripsiyon faktörlerinin ve PI3K/Akt hücre içi sinyal yolağı ile amino-terminal kinazların inhibisyonu yoluyla antiinflamatuar etki gösterdikleri rapor edilmiştir (Gupta *et al.* 2018). Flavonoidler inflamasyonu azaltma ve bağışıklık hücrelerinin kanser hücrelerine karşı savunmasını arttırmada önemli role sahiptir.

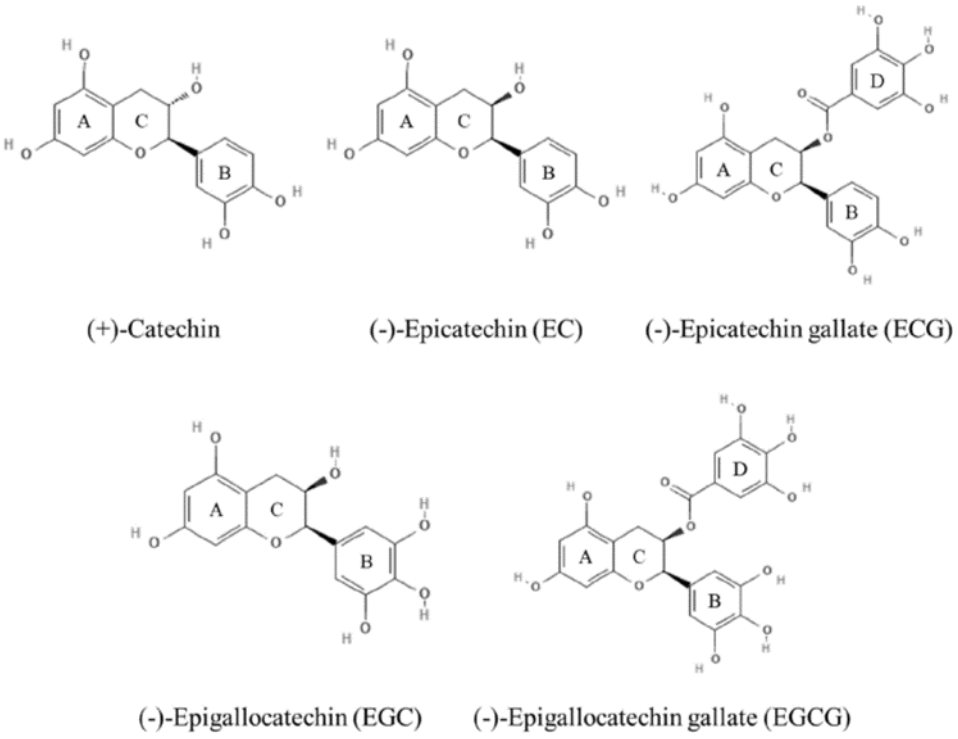
2.1.2 Kateşinler

Flavonoidlerin insan sağlığındaki etkileri açısından önemli bir sınıfı olan kateşinler son zamanlarda çok sayıda araştırmanın konusu olmuştur. Antikanser, antiproliferatif, antioksidan, antiinflamatuar, antiobezite ve antidiyabetik aktiviteleri bilinmektedir

(Isemura 2019). Ayrıca kardiyovasküler ve Parkinson ile Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma sağladıkları da gösterilmiştir (Mandel and Youdim 2004). Kateşinlerin nörodejeneratif hastalıkları baskılamadaki rolünün, kan-beyin bariyerini geçebilmelerinden ve böylece nöronları etkileyebileceğinden kaynakladığı düşünülmektedir (Unno *et al.* 2017). Kateşinlerin, HIV-1'in DNA polimeraz enzimini inhibe ederek antiviral özellik gösterdikleri de belirlenmiştir (Kumar and Pandey 2013).

Kateşinler, flavanoller veya flavan-3-ol olarak da bilinirler. En bilinenleri kateşin (C), epikateşin (EC), epikateşin gallat (ECG), epigallokateşin gallat (EGCG), epigallokateşin (EGC) ve gallokateşin (GC)'dir. Kateşinlerin ana diyet kaynağı yeşil ve siyah çaydır. Siyah üzüm, elma, çilek, kayısı, kiraz, dut, böğürtlen, muz, şeftali, armut gibi meyveler ile bakla ve kakaoda, kateşin ve türevlerini içeren gıdalar arasındadır. Flavan-3-ol olarak adlandırılmaları kimyasal yapılarında hidroksil grubunun her zaman C halkasının 3. pozisyonuna bağlı olması sebebiyledir. Çoğu flavonoidin aksine, 2. ve 3. konumları arasında çift bağ bulunmaz (Kopustinskiene *et al*. 2020). Flavan-3-oller, hidroksillenmiş aromatik halkalarla karakterize edilirler ve heterosiklik benzopiran halkası C, kaynaşmış aromatik halka A ve fenil bileşeni de B halkası olarak bilinir (Braicu *et al.* 2011).

Çay bitkisi 4000'den fazla bileşene sahip olmakla birlikte en fazla flavonoid içeren bitkiler arasında yer alır (Elmas ve Gezer 2019). Çayda bulunan en önemli polifenoller kateşinlerdir. Çay kuru ağırlığının %25 ila %35'ini kateşinler oluşturur. Çay, kateşin haricinde flavonol, proantosiyanidin ve fenolik asitleri de içerir. *Camellia sinensis* bitkisinin yapraklarından elde edilen çay, hasadından sonraki işlenme süreçlerinden dolayı siyah, yeşil ve oolong çay olarak 3 farklı şekilde üretilir. Siyah çay fermantasyon ile üretildiğinden içeriğindeki kateşinler okside olarak yerini theaflavin bileşiklerine bırakırlar. Fermantasyon işlemi endojen polifenol oksidaz ve peroksidaz enzimleri ile gerçekleştirilir. Oolong çay da kısmen fermente edilerek üretilmektedir. Yeşil çay ise oksidasyona uğratılmadan, pişirilip ardından kurutularak elde edilmektedir ve fermentasyon işlemi uygulanmadığından kateşinler en fazla yeşil çayda bulunur (Zaveri 2006). Bu kateşinlerin yaklaşık %70'ini EGCG oluştururken kalan kısmı sırasıyla ECG, EGC ve EC takip eder (Shirakami and Shimizu 2018, Elmas ve Gezer 2019). Kateşinlerin kimyasal yapılarında farklılıklar bulunmaktadır ve bu yapılar Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Kateşinlerin kimyasal yapısı (Kim and Heo 2022)

Yeşil çayın tüketiminin plazmadaki antioksidan seviyesinde artış sağladığı bildirilmiştir. Serumda SOD aktivitesini artırdığı ve oksidatif stres göstergesi olan malondialdehit (MDA) seviyesini azalttığı gösterilmiştir (Gübür 2015). Kateşinlerin sağlık üzerindeki çok sayıda olumlu etkisi nedeniyle kateşin içeren gıdaların günlük diyete dahil edilmesi önerilmektedir (Singh *et al.* 2011).

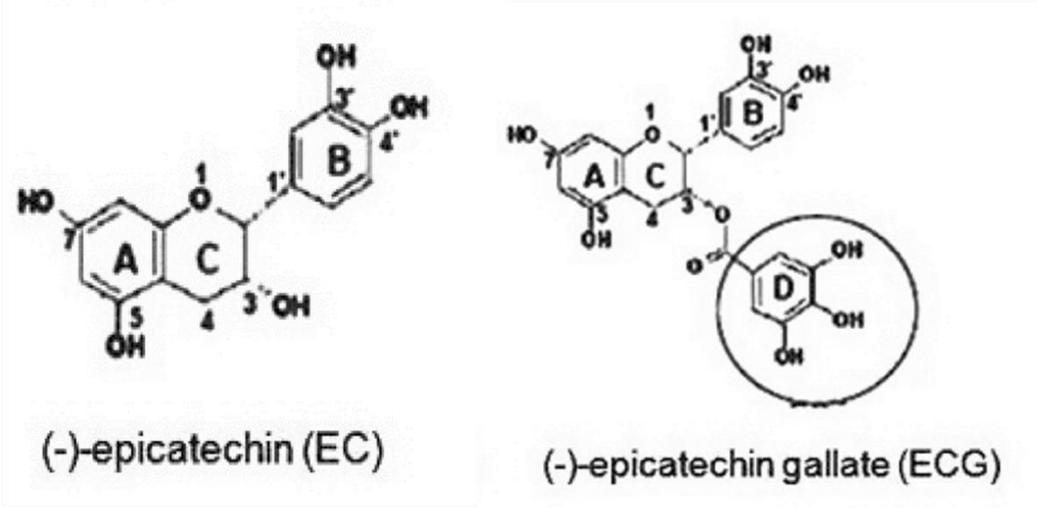
Kateşinlerden antioksidan etkinliği en güçlü olan EGCG'nin kanser önleyici etkisi ilk kez 1987 yılında bildirilmiştir (Suganuma *et al*. 2016). Kateşinlerin antikanser aktiviteleri altında yatan olası mekanizmalar çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir ancak tam olarak belirlenememiştir. Bu mekanizmalar pro-oksidan, antioksidan ve antiinflamatuar aktivite, apoptoz indüksiyonu, hücre döngüsünün durdurulması, transkripsiyonel faktörlerin, anjiyogenezin ve reseptör tirozin kinaz yollarının inhibisyonu, immün sistem modülasyonu ve epigenetik değişiklikler olarak belirlenmiştir (Shirakami and Shimizu 2018). Kateşinle ilgili kanser çalışmalarının büyük bir kısmı EGCG'nin hücre proliferasyonu ile kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerine yoğunlaşmıştır ve birçok kanser hücre hattında apoptozu indüklediği ve proliferasyonu baskıladığı

gösterilmiştir. Kanser haricindeki diğer çalışmalarda da en sık araştırılan kateşin EGCG'dir.

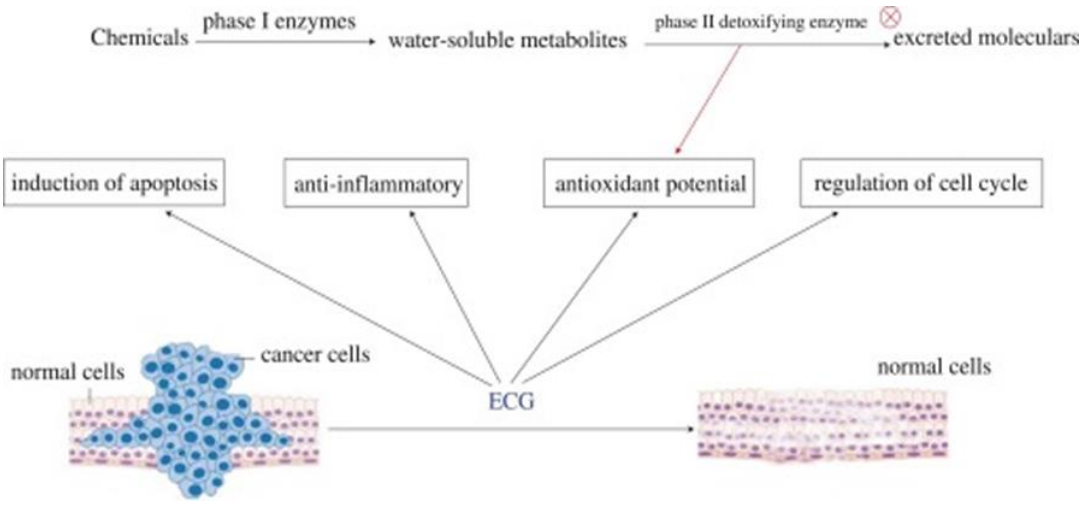
2.1.3 Epikateşin ve epikateşin gallat

EC ve ECG kateşin içeren bitkilerde en fazla bulunan dört kateşinden ikisidir. EC, B halkasında 2 veya 3 hidroksil grubu ve C halkasında bir hidroksil grubu içeren kateşinin epimeridir. ECG, EC'nin ester türevidir ve C halkasının hidroksil pozisyonunda gallat ile bağlanır (Şekil 2.3) (Kim and Heo 2022).

Yeşil çayın intragastrik uygulamasından sonra ECG'nin emilimi ile 75–300 mmol/L konsantrasyonlarda lümende biriktiği ve bu birikimin EGCG dahil diğer kateşinlerden daha yüksek miktarda olduğu bildirilmiştir. Ayrıca ECG'nin normal hücrelerde EGCG'den daha az sitotoksik ve hücre içi düzeyde daha kararlı olduğu gösterilmiştir. ECG, normal hücreleri hasardan, sitotoksisiteden ve kronik enflamasyondan güçlü bir şekilde korur ve kanser hücrelerinin apoptozunu indükler (Şekil 2.4). ECG'nin in vivo ve in vitro çalışmalarda farklı karsinogenez aşamalarında antikanser mekanizmaları gösterilmiştir. ECG tedavisinin, kolon, meme, prostat, akciğer, pankreas, karaciğer, melanom ve dil kanseri hücreleriyle yapılan çalışmalarda, EGCG'ye eşit veya ondan daha fazla etki ile doza ve zamana bağlı bir şekilde kanser hücresi büyümesini önleyebildiği belirtilmiştir (Li *et al*. 2022).



Şekil 2.3 EC ve ECG'nin moleküler yapısı (Braicu *et al*. 2011)



Şekil 2.4 ECG'nin kanser hücrelerine karşı kemoprevensiyon etkileri (Li *et al*. 2022)

ECG açısından zengin yeşil çay kateşinlerinin Hepatit B, Hepatit C, HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü), HSV (Herpes simpleks virüsü), influenza, adenovirüs, enterovirüs ve rotavirüse karşı antiviral etkiler gösterdiği de bilinmektedir. Bu antiviral özelliği, virüsün konak hücrelere bağlanıp girmesini engelleyerek, viral RNA veya DNA sentezi ile gen transkripsiyonunun inhibisyonunu sağlayarak göstermektedir (Xu *et al.* 2017).

EC'nin normal hücreleri radyasyonun yan etkilerinden koruduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada çeşitli EC konsantrasyonlarının radyoterapi ile tedavi edilen hücreler üzerindeki etkisi incelenmiş ve EC'nin birincil kültürlenmiş fibroblastları doza bağlı bir şekilde radyasyona bağlı sitotoksisiteden önemli ölçüde koruduğu keşfedilmiştir. Radyasyon öncesinde 50 μM EC ile ön muamele, fibroblastların hayatta kalma oranlarını artırmıştır. 50 μM EC tedavisi, 20 Gy radyasyonun oluşturduğu hücre içi ROS'un büyük ölçüde inhibisyonunu sağlamıştır. Aynı çalışmada yine EC'nin *in vivo* radyokoruyucu etkisini belirlemek için zebra balığı embriyolarını 20 Gy radyasyon ve 200 μM EC'ye maruz bırakmışlar ve EC ile tedavi sonrasında embriyoların hayatta kalma oranının önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Shin *et al.* 2014). EC ile yapılan başka bir *in vivo* çalışmada akut miyeloid lösemili sıçanlara 22 gün boyunca 40 mg/kg vücut ağırlığı dozunda oral olarak verilen EC tedavisinin sıçanlarda akut miyeloid lösemi hücrelerinde DNA hasarı ve apoptoz oluşturduğu gösterilmiştir (Papież *et al.* 2010).

Yeşil çaydaki ana bileşen EGCG olduğundan yapılan kateşin çalışmaları EGCG üzerine odaklanmıştır. Literatürde ECG ve özellikle EC ile yapılan kanser çalışmaları kısıtlı sayıdadır. Baek vd. (2004) HCT-116 insan kolorektal karsinom hücreleriyle yaptıkları çalışmada hücrelere 4 farklı kateşini de uygulamışlardır. Hücrelere 50 μM kateşin konstantrasyonları ilave edilip 48 saat inkübasyona bırakmışlardır. Apoptoz indüksiyonu yüksek oranda ECG ile sağlanırken sırasıyla EGCG, EC ve EGC daha az oranda apoptoz indüksiyonu göstermiştir. 7 günlük kateşin muamelesi sonrasında ise ECG'nin hücre büyümesini tamamen inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. EGCG, EC ve EGC sırasıyla ECG'ye göre çok daha az oranda hücre büyümesini inhibe etmiştir. Bu sonuçlar HCT-116 hücrelerinde ECG tedavisinin yüksek oranda apoptoz indükleyicisi olduğunu göstermektedir (Baek *et al.* 2004).

Kateşinlerin bazı kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımının kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde EC'nin en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan bleomycin ile olan etkisi araştırılmıştır. İnsan over kanser hücre hattı SKOV-3 ve insan fibroblast hücre hattı olan HFFF2 hücrelerine tek başına bleomycin ve 10, 25 ve 50 μM EC ile kombine bleomycin

tedavisi uygulanmıştır. Kombine tedavi kanser hücrelerinin büyümesini tek başına bleomycin tedavisinden daha fazla inhibe etmiştir. Tek başına EC'nin uygulanan üç dozu da SKOV-3 hücrelerinde inhibisyona neden olmamıştır. EC'nin 50 µM dozu bleomycinle birlikte SKOV-3 hücrelerinde sitotoksisiteyi %83 ile önemli ölçüde artırmıştır. 10 ve 25 µM dozu ile kombine bleomycin tedavisinde ise sitotoksisitede artış gözlenmediği belirtilmiştir. Buna karşılık normal HFFF2 hücrelerine EC, tek başına uygulandığında sitotoksisiteye neden olmamıştır. Bleomycin ile birlikte EC uygulaması da sitotoksisitede artış göstermemiştir. Bu çalışma EC'nin sitotoksik etkisinin kanser hücrelerine spesifik olduğunu doğrular niteliktedir (Hosseinimehr *et al.* 2013).

Ravindranath vd. (2006) EC, ECG, EGC ve EGCG'nin cinsiyete bağlı kanserlerden türetilen hücre hatları üzerine etkilerini incelemişlerdir. Organa sınırlı (HH870) ve metastatik (DU145) prostat kanserinden ve orta derecede (HH450) ve zayıf farklılaşmış (HH639) epitelyal yumurtalık kanserinden geliştirilen hücre hatları ile çalışmışlardır. EC tedavisinin HH639 hücre hattında hücrelerin çoğalmasını %50 oranında azalttığı ve EGCG ile ECG'nin 4 hücre hattında da çoğalmayı aynı oranda azalttığı gösterilmiştir. ECG 24, 27, 29 ve 30 µM konsantrasyonlarda DU145, HH870, HH450 ve HH639 hücrelerini inhibe ederken, EGCG'nin 89, 45, 62 ve 42 µM konsantrasyonlarında inhibisyonu sağladığı belirlenmiştir. ECG'nin bu hücre hatlarında en güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Ravindranath *et al.* 2006).

Kurbitz vd. (2011) pankreas kanseri üzerinde EGCG dışındaki diğer kateşinlerin etkisinin araştırıldığı ilk çalışmayı yapmışlardır. İnsan pankreas duktal adenokarsinom (PDAC) hücre hatları olan PancTu-I, Panc1, Panc89 ve BxPC3 üzerinde ECG'nin doza ve zamana bağlı olarak pankreas kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Karşılaştırma amaçlı EGCG uygulaması da yapılmıştır. ECG ve EGCG'nin 40 µM ve daha fazla konsantrasyonda etkili bir inhibisyon sağladığı belirtilmiştir. Uygulamalardan 24 saat sonra inhibisyon etkisinin gözlenmeye başlandığı ve 48 ile 72 saat sonra çok daha belirgin hale geldiği gösterilmiştir. ECG'nin EGCG'den çok daha güçlü antiproliferatif etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Ancak PancTu-I hücrelerinin Hoechst boyaması sonucunda parçalanmış çekirdek görülmemesi hücrelerin apoptoza uğramadığını göstermiştir. Bu sonuç PancTu-I hücrelerinde ECG ve EGCG'nin antiproliferatif etkisinin apoptozun

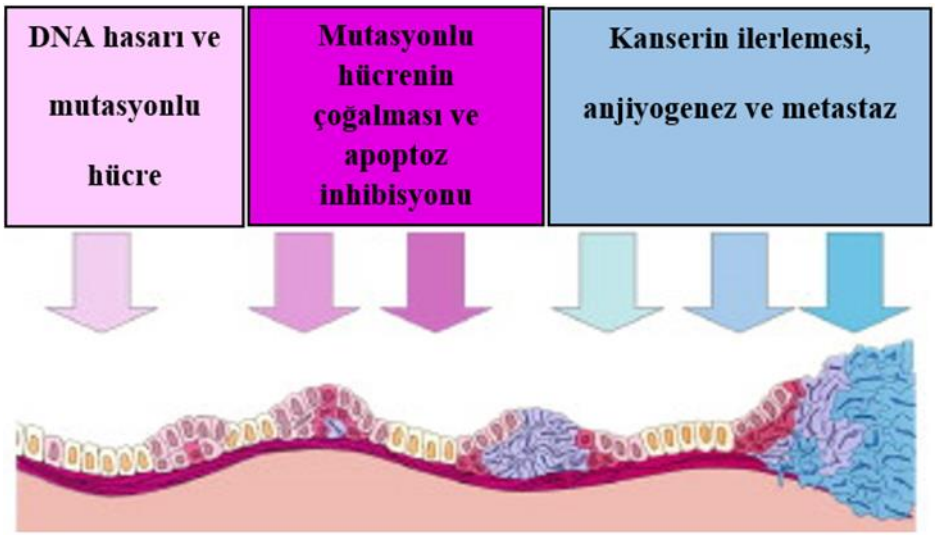
indüklenmesinden değil, proliferasyonun inhibisyonundan kaynaklandığını göstermektedir (Kurbitz *et al.* 2011).

2.2 Kanser

Kanser genetik ve çevresel birçok faktörün etkili olduğu karmaşık bir hastalıktır. Tüm tedavi ve gelişen teknolojilere rağmen tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından üretilen GLOBOCAN 2020 tahminlerine göre 2020 yılında yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon kanser sebepli ölüm meydana gelmiştir. Türkiye'de ise 2020 yılında 233.834 kişiye yeni teşhis konmuş ve 126.335 kişi kanserden hayatını kaybetmiştir (IARC 2020).

Genel bir tanım yapacak olursak kanser, hücrelerin DNA'da meydana gelen hasarlar sebebiyle kontrolsüzce bölünüp çoğalmaları şeklinde tanımlanabilir. DNA sürekli olarak ultraviole ışınlar, zararlı kimyasallar, hücre metabolizması sonucu oluşan serbest radikal gibi bileşenlere maruz kalarak hasara uğrar. Normal şartlarda hücrelerde oluşan DNA hasarı, koruyucu ve tamir edici çeşitli mekanizmalar yoluyla onarılır. Bu mekanizmalarda oluşan delesyon, insersiyon ve nokta mutasyonu gibi mutasyonlar sonucunda DNA onarılamaz ise hücre, programlı hücre ölümü olan apoptoza gönderilerek bölünmesi engellenir. Apoptozda görev alan gen ve proteinlerdeki mutasyon sonucunda da hücre, apoptoza gidemez ise kontrolsüz bir şekilde bölünmeye başlar. Proto-onkogenler de hücre çoğalmasının düzenlenmesinde görev alırlar. Ancak bu genlerdeki mutasyonlar onları, kanserin başlamasını ve ilerlemesini sağlayan onkogenlere dönüştürmektedir (Sawyers *et al*. 2013). Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşmesi, DNA hasarı ve hipoksi durumlarında aktive olan p53 tümör baskılayıcı geni, hücre döngüsünü durdurur ve DNA'nın onarılamadığı durumlarda, geri dönüşü olmayan hasarlı hücrelerde apoptozu başlatır. Bu gende meydana gelen fonksiyon kaybı yaratan mutasyonlar apoptoz direnci ile sonuçlanır ve genellikle ileri evre tümör ile ilişkilendirilmektedir (Labi and Erlacher 2015). Tüm bu genlerin tek birindeki hasardan ziyade birkaçında eş zamanlı meydana gelen hasarlar sonucunda kanser oluşumu çok daha muhtemeldir (Şekil 2.5) (Yokuş ve Çakır 2012).

Hücrelerin bölünme süreci hücre döngüsü olarak adlandırılır. Hücre, bölüneceği zaman büyüme sinyalleri üretir ve bu sinyallerin salınmasıyla hücre döngüsü başlatılır. Bu döngü G0, G1, S, G2 ve M fazlarını içerir. Bölünmeyen hücreler G0 fazındadır. Sağlıklı bir hücre döngüsünde büyüme sinyallerini alan hücre G0 fazından G1 fazına geçerek döngüye giriş yapar. Sırasıyla G1/S, G2/M ve mitoz fazındaki metafaz-anafaz geçişindeki kontrol noktalarını geçebilen hücreler bölünerek hücre döngüsünü tamamlar. Döngü boyunca meydana gelen herhangi bir hasar durumunda döngü durdurulur ve hasar onarılana kadar yeniden başlatılamaz. Hasar onarıldığında hücre döngüsü devam eder ancak tam olarak onarılamaz ise döngü durdurulur ve apoptoz uyarılır. p53 geni hasarın tamir edilemediği durumlarda apoptozda görevli bax proteinini uyararak hücre için apoptoz yolağını başlatır. Kanser hücreleri ise proto-onkogenlerdeki ve tümör baskılayıcı genlerdeki mustasyonlar sebebiyle kontrol mekanizmalarından kaçmayı başarırlar. Kanserlerin çoğunda G1-S kontrol noktasındaki proteinlerin işlevsiz olduğu belirtilirken G2-M kontrol noktalarındaki proteinlerde meydana gelen değişikliklerin daha az görüldüğü gösterilmiştir (Molinari 2000).



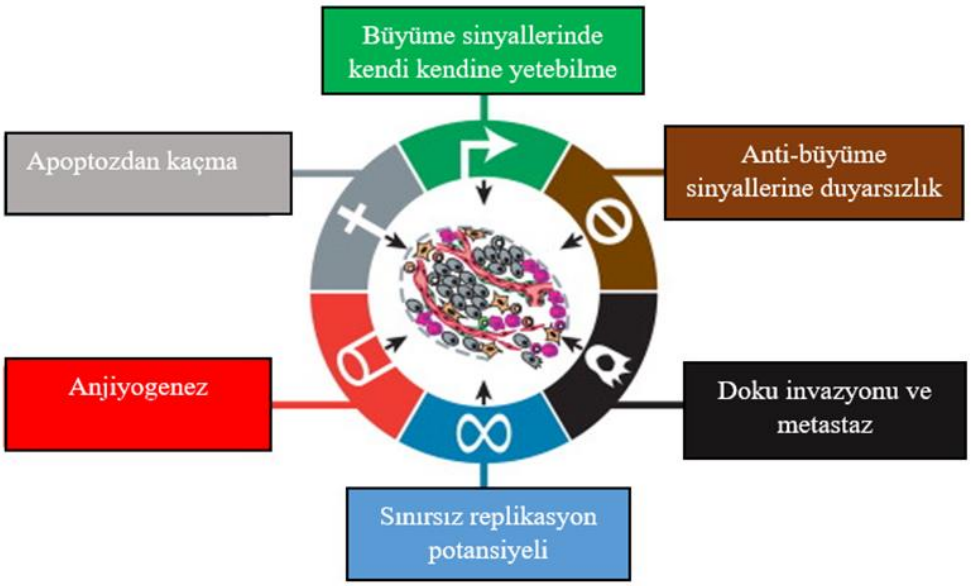
Şekil 2.5 Kanserin oluşum süreci (Ognjanovic and Hainaut 2010)

Temel olarak, DNA hasarına sahip olan hücre apoptoza uğrayamadığında bölünüp, çoğalarak tümör meydana getirir. Ancak oluşan her tümör dokusu kanser değildir. Oluştuğu bölgeyle sınırlı kalan, vücudun diğer dokularına yayılmayan, hayatı tehdit etmeyen ve genellikle tekrarlamayan tümörler iyi huylu (bening) tümörlerdir. Kanser, bu

tümörler kötü huylu (malign) olduğunda oluşan bir hastalıktır. Kötü huylu tümörler genellikle hızlı büyür, oluştuğu dokuyla sınırlı kalmayıp dolaşıma katılarak yayılma eğilimi gösterir ve metastaz yaparak uzak organlara yerleşebilirler. Organizmadaki tüm doku ve hücrelerden tümör gelişebilir ve köken aldıkları dokuya göre farklı isimler alırlar. Epitel hücrelerinden köken alan tümörler karsinoma olarak adlandırılır ve en sık görülen kanser türüdür. Farklı epitel hücre tiplerine göre adenokarsinom, skuamöz, bazal ve geniş hücreli karsinom olarak ayrılırlar. Kas, kemik ve bağ doku gibi mezenkimal doku hücrelerinden köken alan kemik ve yumuşak doku tümörlerine de sarkoma adı verilir. Kemik iliğinin kan oluşturan dokusunda başlayan, hematopoietik hücrelerden köken alan kanserler lösemidir ve katı tümör oluşturmazlar. Yine hematopoietik hücrelerden köken alıp lenf damarlarında meydana gelen kanser ise lenfoma adını alır (https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer, 2022).

Kanser semptomları, gelişimi, tedavisi ve metastaz durumu kişiye ve kanserin türüne göre değişiklik göstermektedir. Her kanser kendine özeldir ancak hepsinde görülen ortak özellikler bulunmaktadır. Hanahan ve Weinberg (2000) tarafından kanserin 6 ayırt edici ve ortak özelliği yayınlanmıştır (Şekil 2.6). 2011 yılında yayınladıkları derlemeyle de bu 6 özelliğe, enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık tepkisinden kaçmak şeklinde 2 yeni potansiyel özellik eklemişlerdir (Hanahan and Weinberg 2011).

Fizyolojik koşullarda hücrelerin hücre döngüsüne girmeleri büyüme sinyalleri varlığında gerçekleşmektedir. Bu sinyallerin üretimi ve salınımı kontrollü bir şekilde gerçekleşir ve böylece doku homeostazı korunur. Ancak kanser hücreleri kendi büyüme sinyallerini üretme yeteneğine sahiptirler ve hücre dışı ortamla etkileşime girmeden proliferasyonlarını sağlayabilirler. Örneğin sarkomlar tümör büyüme faktörü (TGFa) üretirler (Hanahan and Weinberg 2000). Büyüme sinyalleri dışında doku homeostazını sürdürmek için çoğalmayı önleyici antiproliferatif sinyaller de üretilir. Moleküler düzeyde bu sinyallerin çoğu tümör baskılayıcı retinoblastoma proteini (pRb) tarafından yönlendirilir. Kanser hücreleri ise büyümeyi önleyici sinyallere karşı duyarsızdır ve bu sinyallerden etkilenmeden çoğalmaya devam ederler (Hanahan and Weinberg 2000).



Şekil 2.6 Kanser hücrelerinde görülen 6 ortak ve ayırt edici özellik (Hanahan and Weinberg 2011)

Kanser hücreleri çeşitli mekanizmalarla apoptozdan kaçabilmektedir. *p53* genini işlevsiz kılan ve inaktive olmasını sağlayan mutasyonlar kanser hücrelerinin çoğu apoptotik uyarana duyarsız hale gelmesine neden olmaktadır. Tümörlerde anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin kaybı da söz konusudur. Bu değişiklikler tümöre büyüme ve hayatta kalma avantajı sağlar ancak bu durum her tümör hücresinin apoptotik uyarana duyarsız olduğu anlamına gelmemektedir (Fouad and Aanei 2017).

Anjiyogenez, sağlıklı bireylerde sık görülmeyen, yara iyileşmesi ve dişilerde üreme döngüsü esnasında gerçekleşen yeni damar oluşumudur. Kanserde ise patolojik anjiyogenez gerçekleşmektedir. Tümör belirli bir boyuta ulaştığında merkezdeki hücreler oksijen ve besinden yoksun kalırlar. Bu durumda kendilerine oksijen ve besin sağlamak için anjiyogenezi uyarırlar. Tümör hücrelerinin anjiyogenezinde oluşan yeni damarlar normal dokulardaki damarlara göre çok daha dolambaçlıdır ve sürekli yeni damar oluşturma özelliği gösterir (Valastyan and Weinberg 2011). Büyüyen tümörden ayrılan metastatik hücreler de anjiyogenezle oluşan damarlarla ana dolaşıma katılırlar. Kanserin tanımlayıcı özelliklerinden olan metastaz, kanser ölümlerinin %90'ının fazlasından sorumludur (Fouad and Aanei 2017). Kanser hücrelerinin bulunduğu dokudan uzak

dokulara sıçraması çeşitli aşamalarla gerçekleşir. Bu aşamalar metastatik kaskad olarak adlandırılır ve temel olarak lokal invazyon, intravazasyon, dolaşımda sağ kalma, ekstravazasyon, mikrometastaz ve kolonizasyondan (makrometastaz) oluşur (Fares *et al*. 2020). Tümör oluşumunda genetiğin etkisi her kanser türünde aynı değildir, farklı kanser türleri arasında değişkenlik gösterir. Ancak metastaz oluşumundaki moleküler, biyokimyasal ve hücresel süreçler tüm kanser türlerinde büyük benzerlikle ortaya çıkar (Bogenrieder and Herlyn 2003).

Oluştukları doku ve hücre tipine göre isim alan yaklaşık 200 farklı kanser türü vardır (Sawyers *et al*. 2013). Kanserin tedavisi de kanserin türü, evresi ve kanser hücrelerinin genetik özelliklerine göre belirlenir. Cerrahi operasyon, kemoterapi ve radyoterapi başlıca kanser tedavilerindendir. Bazı kanser türlerinde immünoterapi de yapılabilmektedir. Tümörün alınabildiği durumlarda genellikle cerrahi operasyon ile tedavi sağlanır. Radyoterapide X ve gama ışınları ile iyonize ışınlar kullanılmaktadır. Bu ışınlar kanser hücrelerinin yapısında hasara yol açarak etki etmektedirler. İmmünoterapide biyolojik moleküllerle bağışıklık sisteminin uyarılması sağlanarak kanser hücrelerine karşı daha etkili olmaları amaçlanmaktadır. Kemoterapide çeşitli kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan sitotoksik ilaçlar, kanser hücrelerinin metabolik yolaklarını ve yapılarını bozarak etki göstermektedir (Sabuncuoğlu ve Özgüneş 2011). Apoptotik etki gösteren ilaçlar da kanser hücrelerinin apoptozunun uyarılmasını hedefler. Kanserin gelişmesi ve metastazında etkili olan anjiyogenezin engellemesine yönelik antianjiyojenik ilaçlar da yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlar arasındadır. Tedavinin önündeki en büyük engel kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara karşı direnç oluşturmasıdır. Diğer bir sorun da bu ajanların sadece kanser hücrelerini değil sağlıklı hücreleri de etkilemesidir. İlaçların çoğu özellikle yüksek miktarda oksidatif stres oluşturduklarından ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Kemoterapötik ajanların neden olduğu bu yan etkilerin en çok görüldüğü kanser türlerinden biri de serviks (rahim ağzı) kanseridir.

2.2.1 Serviks kanseri

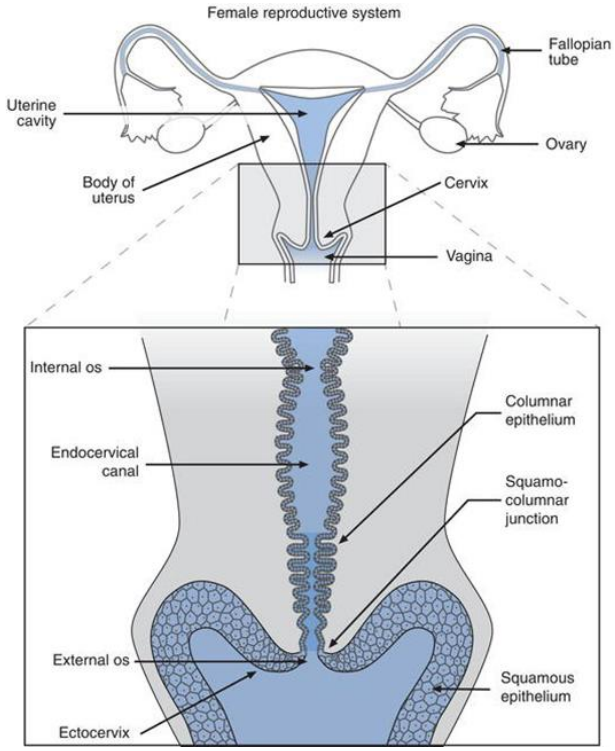
Dişi üreme sistemi serviks, fallop tüpleri, uterus (rahim), yumurtalıklar (over), vajina ve dış genital organları içerir. Latince adı cervix uteri olan serviks, rahmin alt bölümüdür ve rahmi vajinaya bağlar (Şekil 2.7). 3-4 cm uzunluğunda, 2-3 cm çapında silindirik şekilli bir organdır. Kadının yaşına, doğum sayısına ve hormonal durumuna bağlı olarak büyüklüğü ve şekli değişmektedir.



Şekil 2.7 Dişi üreme sistemi organları (https://www.drozdogan.com/rahim-agzi-kanseri-belirtileri-ve-tedavisi, 2022)

Serviks endoserviks ve ektoserviks olarak iki kısımdan oluşur (Şekil 2.8) Rahime yakın olan iç kısım endoservikstir ve erişkinlerde glandular (kolumnar) epitel ile kaplıdır. Dış kısım ise vajinaya bakar, ektoserviks olarak adlandırılır ve skuamöz epitel ile kaplanmıştır. Skuamöz epitel, glikojen içerir, nonkeratinize yapıdadır ve çoklu hücre (15-20) tabakasından oluşur. Ayrıca serviksin rahime yakın olan ucuna internal os ve vajinaya bakan ucuna ise external os adı verilir. Endoserviksi uçtan uca geçen endoservikal kanal, rahim boşluğu ile vajinayı bağlar ve internal os'tan eksternal osa uzanır. Ektoservikstek çok katlı skuamöz epitel ile endoserviksi örten tek katlı kolumnar epitelin karşılaştığı bölgeye de skuamo-kolumnar junction (SCJ) adı verilir. Burada iki farklı hücre tipi karşılaştığı için histolojik olarak keskin bir sınır görülür. Belirli fizyolojik veya patolojik koşullar altında, SCJ'deki kolumnar epitel, skuamöz epitel ile değiştirilir. Bu olaya

skuamöz metaplazi adı verilir. Metaplazi bir tip matür dokunun yerini, eşit derecede matür diğer bir tip dokunun almasıdır. Servikste metaplazi ile kolumnar epitelin yerini çok katlı skuamöz epitel almaktadır. Bu değişimin gerçekleştiği bölge transformasyon zonu olarak adlandırılır. Bu bölgedeki metaplazi, servikal kanserlerin etiyolojik bir ajanı olan insan papilloma virüsü (HPV) ile ilişkilendirilmiştir (Chumduri *et al*. 2021). Histolojik olarak servikal kanserlerin yaklaşık %70-80'i skuamöz hücreli karsinomlar olup yaklaşık kalan kısım kolumnar hücrelerde başlayan adenokarsinomdur (Waggoner 2003).



Şekil 2.8 Serviksin bölümleri (https://nursekey.com/24-cervical-screening-test, 2022)

Servikste gelişen kanser de diğer kanser türleri gibi çok aşamalı ve karmaşık bir süreçten geçer. Ancak servikal kanserin etiyolojisi diğer kanserlere göre daha belirlidir. Servikal kanser gelişiminde Human Papilloma Virus (HPV) enfeksiyonu, çoğu skuamöz hücreli servikal karsinom tipinin gelişimi için gerekli bir koşul olarak kabul edilmektedir. Skuamöz hücreli servikal kanserlerin %90'ından fazlası HPV DNA'sı içerir (Waggoner 2003). HPV'nin malign tümör gelişimindeki etiyolojik rolü sadece servikal karsinomlar

için değil vulva, vajina, penis, orofarenks, anüs ve rektum kanserlerinde de belirtilmiştir (Volkova *et al*. 2021).

HPV günümüzde en sık saptanan cinsel yolla bulaşan hastalık etmenlerinden biridir. Genom yapısı, 6.8 ila 8 kb uzunluğunda ve erken bölge, geç bölge ile uzun kontrol bölgesi olmak üzere üç bölgeden oluşur. Boyutları çok küçüktür ancak moleküler yapıları oldukça karmaşıktır (Avcı ve Bozdayı 2013). Günümüze kadar bilinen 216 HPV alt tipi tanımlanmış ve düşük, orta ve yüksek riskli tipler olarak sınıflandırılmıştır (Olusola *et al*. 2019). Düşük riskli HPV alt tipleri HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 ve 81'dir. Genellikle dış genital bölge siğillerinden sorumludur ve siğillerin %90'ında HPV 6 ve 11 tespit edilmiştir. Yüksek riskli alt tipler ise HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68'dir. Bu grup onkojeniktir ve serviks, vulva, anüs ve penis kanseri ile servikal preinvaziv lezyonlardan sorumludur. Servikal kanserlerin yaklaşık %55-60'ı HPV 16 ve yaklaşık %10-15'i HPV 18'den kaynaklanırken diğer yüksek riskli alt tipleri de kalan kısımdan sorumludur (Yıldırım ve Gökaslan 2015). Servikal kanserin HPV dışındaki risk faktörleri;

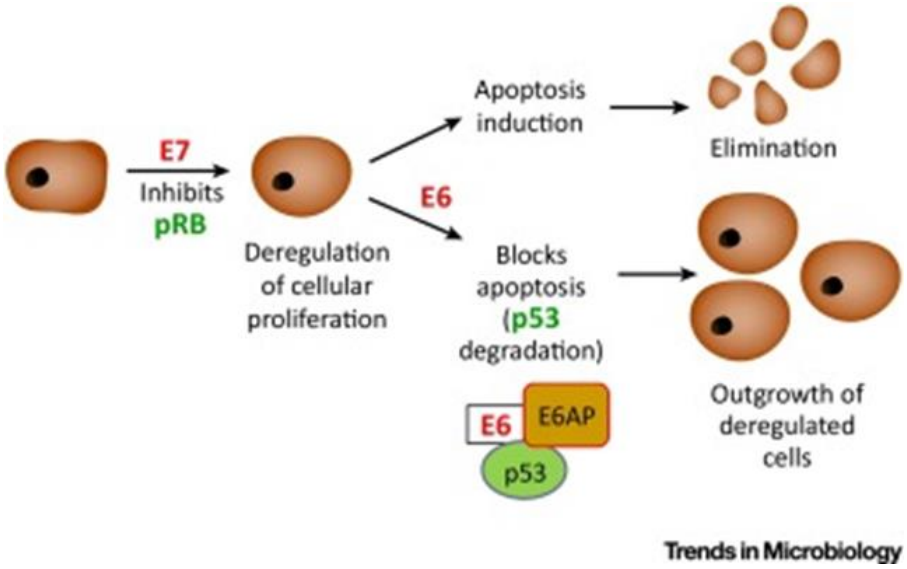
- Cinsel yolla bulaşan başka enfeksiyonların da olması
- Erken yaşta (16 yaştan önce) ilk cinsel ilişki
- Birden fazla cinsel partner varlığı
- Tütün kullanımı
- Beslenme alışkanlığı
- Yüksek doğurganlık sayısı
- Düşük sosyoekonomik düzey
- Özellikle 5 yıldan daha uzun süreli doğum kontrol hapı kullanımı ve
- Bağışıklık sisteminin baskılanmasıdır.

HPV enfeksiyonu servikal kanser gelişimi için tek başına yeterli değildir. Enfeksiyonun kalıcı olması ve diğer risk faktörlerinin de devreye girmesi gerekir. HPV

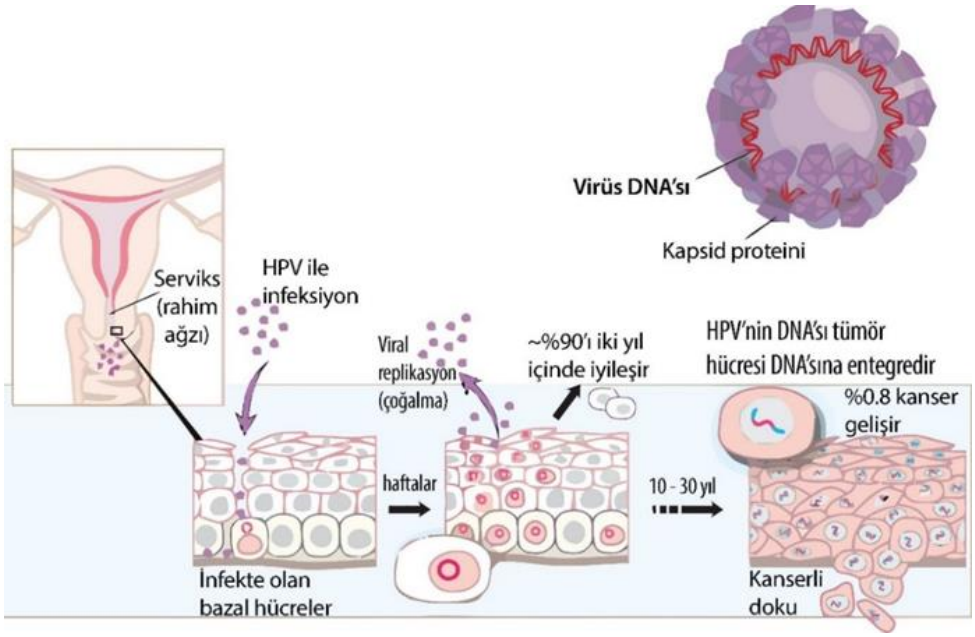
enfeksiyonlarının yaklaşık %90'ı birkaç yıl içerisinde kendiliğinden iyileşmektedir. Gerileme görülmeyen ve devam eden HPV enfeksiyonlarının bir kısmı invaziv serviks kanseri meydana getirmektedir. HPV enfeksiyonunun kalıcı olmasında etkili olan bütün mekanizmalar tam olarak bilinmiyor olsa da sigara kullanan, immün sistemi baskılanmış, HIV enfeksiyonu bulunan ve 30 yaş üzeri kadınlarda HPV enfeksiyonunun kalıcılığının arttığı bilinmektedir (Yıldırım ve Gökaslan 2015).

HPV genomu tarafından kodlanan proteinler ekspresyon sırasına göre erken ve geç proteinler olarak adlandırılır. E1, E2, E4, E5, E6 ve E7 erken proteinler olup viral replikasyon ile hücre transformasyonunda görev alırlar. HPV 16 ve 18, viral replikasyon için gerekli proteinleri kodlayan iki transkripsiyonel ünite olan E6 ve E7'ye sahiptir. HPV pozitif kanser hücrelerinin büyümesi, viral E6 ve E7'nin sürekli ekspresyonuna bağlıdır. HPV DNA'sının konak DNA'ya viral entegrasyonu sırasında genellikle E1 ve E2 bölgelerinde kırılma meydana gelmektedir. Kırılma, bu bölgelerin kaybıyla sonuçlanmaktadır. E2 proteini E6 ve E7'nin transkripsiyonunu baskılayan proteinleri kodlamaktadır. Bu sebeple E2 proteininin kaybının E6 ve E7 onkojenik proteinlerinin kontrolsüz ve artan ekspresyonuyla sonuçlandığı bilinmektedir (Motoyama *et al*. 2004). Bu iki majör onkoprotein tümör baskılayıcı genler üzerinde inaktive edici etkiye sahiptir (Şekil 2.9).

E6 onkoproteini, hücre döngüsü kontrol noktasını bozan ubikuitin bozunması yoluyla p53'e bağlanarak bu geni inaktifleştirirken E7 de pRb geninin inhibisyonunu sağlar. Ayrıca apoptozda görev alan bazı proteinleri de inaktive ederler. E6 onkoproteininin telomeraz aktivitesini uyarardığı ve böylece hücre ölümsüzleşmesi ve tümörijenez ile ilişkili olduğu da bilinmektedir (Hoppe-Seyler *et al.* 2018). Tümör baskılayıcı genlerin ve bazı apoptoz proteinlerinin inhibisyonuyla hücre proliferasyonunda kontrolsüz artış gerçekleşir (Şekil 2.10).



Şekil 2.9 p53 ve pRb tümör baskılayıcı genleri normal fonksiyonlarına engel olan E6 ve E7 onkoproteinleri (Hoppe-Seyler *et al*. 2018)

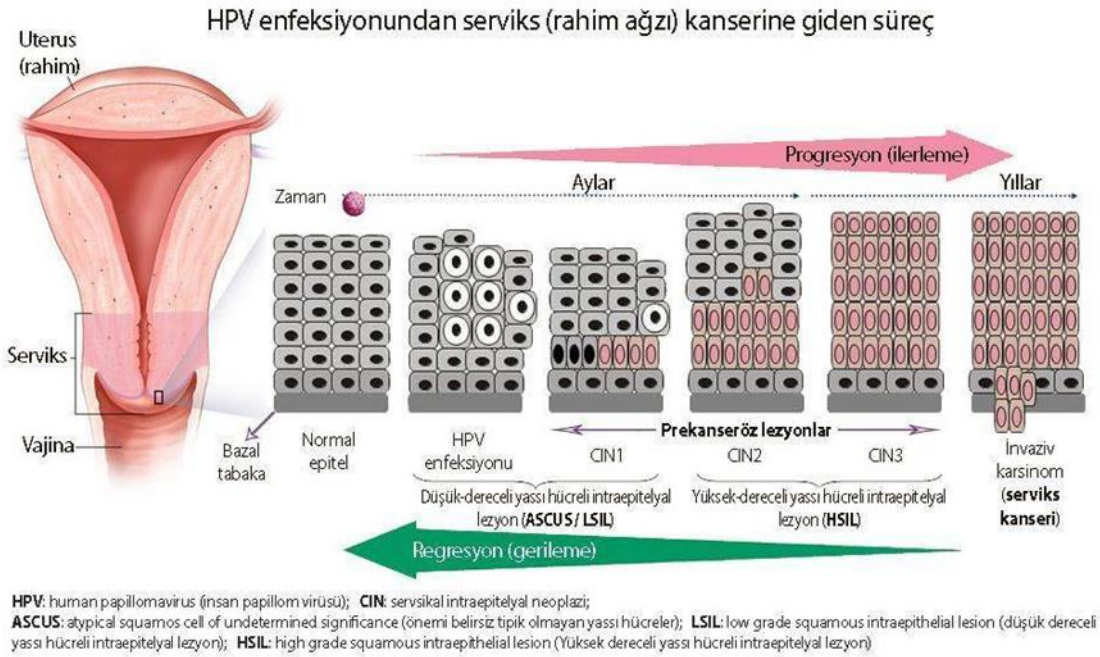


Şekil 2.10 HPV enfeksiyonu ile servikal kanser oluşumu (https://www.drozdogan.com, 2022)

Serviksin epitel DNA'sına entegre olan HPV DNA'sı bu hücrenin DNA'sında E6 ve E7 onkoproteinlerinin etkisiyle değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler sonucunda kontrolsüz çoğalan transforme hücreler normal serviks epitelinin yerini alır ve servikal displazi meydana gelir. Servikal displazi, Servikal İntraepitelyal Neoplazi (CIN) veya

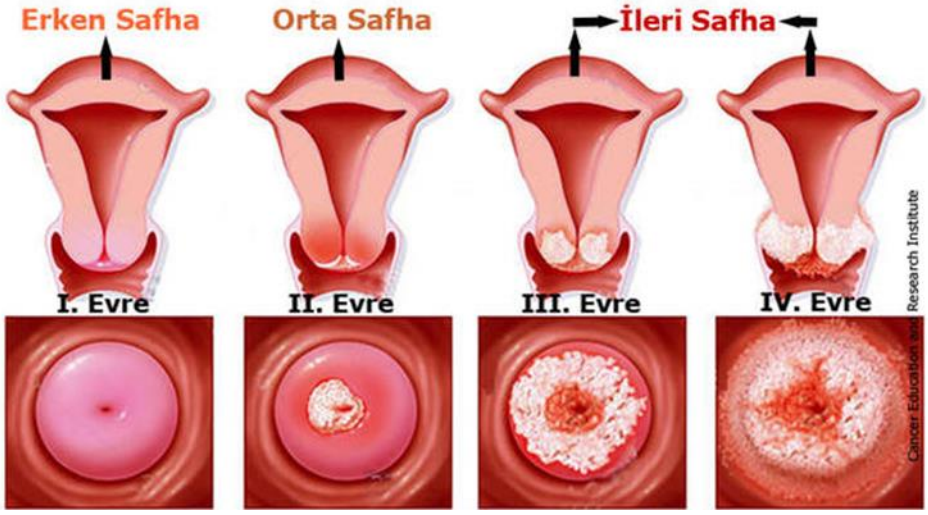
Skuamöz İntraepitelyal Lezyon (SIL) olarak iki farklı şekilde sınıflandırılır. SIL, düşük dereceli (LSIL) ve yüksek dereceli (HSIL) olarak ayrılır (Cooper and McCathran 2021). CIN, düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 derece olarak adlandırılır. Düşük dereceli CIN1 veya HSIL, epitelin üçte birinin displazi gösterdiği hafif displaziyi belirtir. Epitelin üçte ikisi etkilendiğinde, CIN2 veya orta dereceli displazi olarak adlandırılır. Epitelin tüm kalınlığının üçte ikisinden fazlası etkilendiğinde ise şiddetli displazi CIN3 olarak derecelendirilir. CIN2 ve CIN3 lezyonları topluca yüksek dereceli HSIL olarak sınıflandırılır (Balasubramaniam *et al*. 2019).

Servikal displazi ve invaziv kanserin tanısı Papanicolaou (Pap) Smear Testi, HPV Testi, kolposkopi ve servikal biyopsi ve tıbbi görüntüleme teknikleri yapılarak konmaktadır. CIN2, CIN3 veya HSIL olası prekanseröz lezyonlardır ve tedavi gerektirir. Tedavide elektrokoterizasyon, kriyoterapi, lazer vaporizasyonu, konizasyon, LEEP ve histerektomi yöntemleri yer almaktadır. Bu yöntemlerin temel amacı HPV'nin yerleştiği transformasyon zonunun çıkarılmasıdır (Avcı ve Bozdayı 2013). Bu lezyonlar tedavi edilmediğinde yıllar içinde invaziv kansere dönüşebilmektedir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 Prekanseröz lezyonların invaziv servikal kansere dönüşümü (https://www.drozdogan.com, 2022)

İnvaziv servikal kanser teşhisi konulduğunda öncelikle kanserin evrelemesi yapılmaktadır. Evre klinik olarak, esas olarak serviksteki tümörün boyutuna veya pelvise yayılmasına göre belirlenmektedir. Standart olarak kullanılan Internasyonal Federasyon Jinekolojik Obstetrik (FIGO) evrelemesine göre kanserin evreleri I'den IV'e kadar sınıflandırılmıştır (Şekil 2.12). Evre I'de tümör serviksle sınırlıyken Evre II'de serviksi aşmış ancak pelvis duvarına yayılmamıştır. Evre III'te pelvis duvarına yayılmıştır ve Evre IV'te komşu ve uzak organlara metastaz görülmektedir. Evreler kendi içinde de tümörün büyüklük ve yayılmasına göre ayrıca sınıflandırılmıştır. Kanserin hangi evrede olduğu teşhis edildikten sonra tedavi belirlenir. Tedavi, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi işlem uygulamalarıyla yapılmaktadır.



Şekil 2.12 Servikal kanser evreleri (https://www.canceredinstitute.org, 2022)

Servikal adenokarsinom teşhisi skuamöz hücreli karsinomdan çok daha güçtür. Adenokarsinom endoserviksteki salgı yapan glandüler hücrelerin enfekte olmasıyla meydana geldiğinden muayene ile görülemeyebilir ve Pap Smear testinde atlanabildiğinden erken evre teşhisi zorlaştırır. Son yıllarda skuamöz hücreli karsinom görülme sıklığı azalmakta ve adenokarsinom görülme oranı artmaktadır (https://hpv.com.tr, 2022).

Servikal kanser diğer kanser türlerinden farklı olarak uzun yıllar içinde gelişen bir kanser türüdür. Pap Smear gibi tarama testlerinin varlığı, prekanseröz lezyonların kansere

dönüşmeden önce tedavi edilebilmesi ve HPV aşısının varlığı ile tamamen önlenebilir bir hastalıktır. Özellikle adenokarsinomların teşhisinin zor olması sebebiyle HPV aşısı servikal adenokarsinomların birincil önlenmesinde önemli yere sahiptir (Seoud *et al*. 2011). Yüksek riskli HPV tipleri ve genetik siğillere neden olan HPV tiplerine karşı koruma sağlayan aşı ile HPV enfeksiyonundan ve dolayısıyla servikal kanserden korunmak mümkündür. Ancak ülkemizde ve gelişmekte olan ülkelerde tarama ve aşılama istenilen düzeyde değildir.

Servikal kanser tüm bu önlenebilirliğine rağmen dünyada kadınlar arasında meme, kolorektal ve akciğer kanserinden sonra dördüncü en yaygın görülen kanser türüdür. IARC, 2020'de dünya çapında 600.000'den fazla kadına servikal kanser teşhisi konduğunu ve yaklaşık 342.000 kadının hayatını kaybettiğini tahmin etmektedir. Ayrıca kadınlarda kanser ölümlerinin dördüncü en yaygın sebebidir. Gelişmiş ülkelerde HPV aşılaması ve tarama programlarının uygulanması sebebiyle servikal kanser insidansı, gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelere göre daha düşüktür. Servikal kanser 23 ülkede kadınlarda en sık teşhis edilen kanser türüdür ve 36 ülkede de kanser ölümlerinin birincil sebebidir. Dünya genelinde 2020 yılında en sık teşhis edilen kanser türleri içinde 9. sırada yer almıştır (Sung *et al*. 2021, IARC 2020). Türkiye'de ise 35 kanser türü içinde 19. sıradır. Ülkemizde 2020 yılında 2532 kadına servikal kanser teşhisi konmuş ve 1245 kadın servikal kanserden hayatını kaybetmiştir (IARC 2020).

2.2.2 HeLa hücreleri

HeLa servikal kanser hücreleri, serviksin glandüler epitel hücrelerinden köken alan adenokarsinom hücreleridir. 1951 yılında Henrietta Lacks isimli kanser hastasının serviks dokusundan izole edilmiştir. Hastanın kanserli serviks dokusundan alınan biyopsi örneğindeki hücreler biyolog George Gay tarafından hastanın haberi ve onamı olmadan laboratuvar ortamında çoğaltılmıştır. Bu zamana kadar sağlıklı ve kanserli birçok dokudan alınan hücreler çoğaltılmaya çalışılmış ancak hiçbir hücre laboratuvar ortamında birkaç günden fazla yaşayamamıştır. HeLa hücreleri, hızlı bir şekilde bölünüp sürekli çoğalarak kültürü yapılan ilk hücre hattı olmuştur. Aynı yıl Henrietta Lacks, kanserinin tüm vücuda yayılması sonucu hayatını kaybetmiştir. Bu hücrelere Henrietta Lacks'e

ithafen isim ve soyisminin ilk iki harfi kullanılarak HeLa hücreleri adı verilmiştir (Lucey *et al*. 2009).

HeLa hücreleri çok hızlı bölünüp kolayca ve sürekli çoğalmaları sebebiyle ölümsüz olarak anılmaktadır. Bu ölümsüzlük aşırı aktif telomeraz ekspresyonuna bağlanmıştır. HeLa hücrelerinin bu özelliği, çok sayıda araştırma ve buluşu beraberinde getirmiştir. 1952'den beri kanser başta olmak üzere çok sayıda hastalıkta, virüs, radyasyon ve toksik maddelerin etkileri ile gen haritalaması ve sayısız bilimsel araştırmada kullanılmıştır.

1953 yılında Dr. Jonas Salk çocuk felci hastalığının çalışmalarında virüsü büyütmek için HeLa hücrelerini kullanmış ve enfekte mekanizmasının anlaşılmasını sağlayarak aşı geliştirmiştir. 1960'larda HeLa hücreleri, uzaya gönderilerek yer çekimsiz ortamın canlı hücre ve dokular üzerindeki uzun vadeli etkilerini belirlemek için kullanılmış ve burada daha hızlı bölündüğü anlaşılmıştır. 1980'lerde Harald zur Hausen, HeLa hücrelerinin HPV 18 içerdiğini keşfetmiştir. HPV ile servikal kanser arasındaki ilişkinin aydınlatılmasını sağlayan çalışmalarıyla Nobel Ödülü kazanmış ve HPV aşısının geliştirilmesinin önünü açmıştır. HeLa hücreleri tüberküloz aşısı ve HIV ile AIDS için ilaç geliştirilmesine de zemin hazırlamıştır. Kanser ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar HeLa hücreleri üzerinde çalışılmıştır. Bir kromozomun her iki ucunda telomeraz enzimi tarafından doldurulan bir telomerin varlığının keşfedildiği çalışmada araştırmacılar Jack W. Szostak, Elizabeth H. Blackburn ve Carol W. Greider, HeLa hücrelerini kullanmışlardır. Bu çalışmayla 2009 Nobel Tıp/Fizyoloji Ödülü kazanmışlardır. Henrietta Lacks'in hücreleri sayesinde 11.000 patent alınmış ve bu hücreler tıp ve bilim dünyasına çok önemli katkılar sağlamıştır (Ursuno 2012, Ünsal ve Büken 2018).

2.3 Apoptoz

Apoptoz, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun yaşamı boyunca meydana gelen, fizyolojik ve patolojik olarak düzenlenen hücresel bir süreçtir. Tipik morfolojik özelliklerle hücrelerin kendilerini kontrollü olarak yok etmelerini tanımlayan apoptoz terimi, ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Elmore 2007).

Organizmada sürekli olarak yeni hücreler oluşur ve homeostazın sağlanması için var olan hücrelerin ölmesi gerekir. Hücre çoğalması ve ölümü arasındaki denge kontrollü bir şekilde sağlanmaktadır. Genetik olarak programlanmış mekanizmaları içeren apoptoz, bu dengenin korunmasında kritik öneme sahiptir. Deri, immün ve gastrointestinal sistem gibi birçok sistem dokularının devamlılığı, apoptoz ve mitoz arasındaki denge ile korunur (Dinçel ve Kul 2016). Embriyolojik dönemde, kadınlarda menstrual döngüde, görevini tamamlamış ve yaşlanmış, enfekte, DNA hasarlı ve radyasyona maruz kalmış hücrelerin yok edilmesinde fizyolojik apoptoz gerçekleşir. Dokularda az veya çok fazla görülen apoptoz patolojik apoptoz olup kanser başta olmak üzere, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler bozukluklar, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi birçok hastalığın patogeneziyle ilişkilendirilmektedir (Favaloro *et al.* 2012). Tümör, kontrolsüz çoğalma ve azalan apoptoz ile karakterizedir. Bu sebeple kanserin tedavisinde, azalmış olan apoptotik yolakların aktivasyonu tedavinin ana hedefleriden biridir.

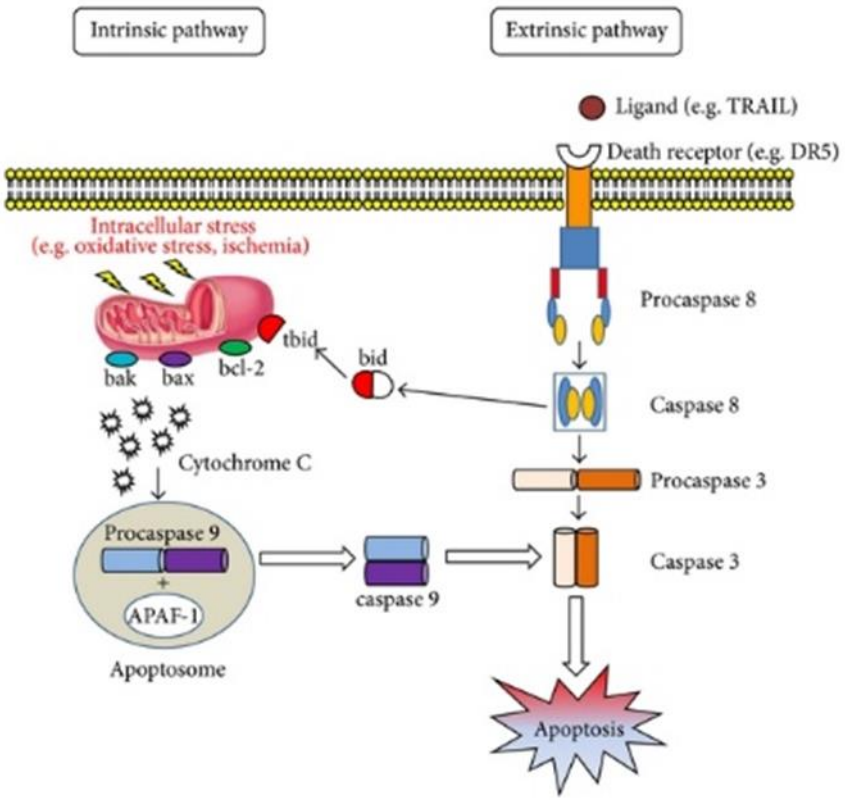
Apoptotik hücreler morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gösterir. Karakteristik morfolojik özellikleriyle çevre hücre ile dokulardan ve diğer hücre ölümü tiplerinden kolayca ayırt edilebilirler. Hücre şeklinin yuvarlaklaşması, komşu hücrelerle bağlantının kopması, büzülerek küçülme, kromatin ve sitoplazma yoğunlaşması ile hücre yüzeyinde tomurcuklanmalar apoptotik hücrelerde görülen morfolojik değişikliklerdir. Son aşamada hücre membranı ile birlikte hücre yüzeyinden ayrılan parçalar apoptotik cisimcikleri oluşturur. Apoptotik cisimcikler yüzeylerinde makrofajların onları tanımasını sağlayan sinyaller sayesinde makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Böylece dokuda inflamatuar yanıt oluşması ve çevre hücrelerin zarar görmesi önlenir. Bu olay apoptozu diğer hücre ölüm tiplerinden olan nekrozdan ayıran en önemli farklılıklardan biridir (Xu *et al.* 2017).

Apoptozda gözlemlenen biyokimyasal değişiklikler kaspazların aktivasyonu, DNA ve protein yıkımı ile membran değişiklikleri ve hücrenin fagositik hücreler tarafından tanınmasıdır (Wong 2011). Bcl–2 ailesinin üyeleri ile Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) ve kaspazların biyokimyasal aktivasyonuyla apoptozda morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Apoptotik hücre ölümünün morfolojik değişiklikleri tüm hücre tiplerinde dikkate değer ölçüde benzerlik göstermektedir. Apoptozun

başlamasından hücrenin yok edilmesine kadar geçen süre yaklaşık birkaç saattir. Bu süre hücre tipine, uyarana ve apoptotik yola bağlı olarak değişkenlik gösterir (Wong 2011).

2.3.1 Apoptozun mekanizmaları ve düzenlenmesi

Apoptoz evrimsel süreçte korunmuş, tüm hücrelerde genetik olarak çok iyi bir şekilde kontrol edilen biyolojik bir süreçtir. Enerjiye bağımlı ve karmaşık olan bu süreç birçok moleküler olaylar dizisi içerir. Apoptozun gerçekleşmesinde görevi olan tüm bileşenler DNA'da kodlanmıştır ve apoptoz sinyali aldıklarında aktive edilirler. Apoptozun başlaması için önce bir uyaran olması gerekir. Hücre içi ve hücre dışı birçok uyaran apoptozu tetikler. Bu uyaranlar arasında tümör nekroz faktörü (TNF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), nöron büyüme faktörü (NGF), glukokortikoidler, radyasyon, sitotoksik ilaçlar, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, sitokinler, p53'ün aktivasyonu, hücre içi kalsiyum artışı ve DNA hasarı sayılabilir (Akşit ve Bildik 2008). Bu uyaranların varlığıyla tetiklenen mitokondriyal iç yol (intrinsik) veya ölüm reseptörlerini içeren dış yolda (ekstrinsik) kaspazların aktivasyonu ile apoptoz başlatılır (Şekil 2.13). Tüm apoptotik yolakların ortak noktası kaspazlardır ve hem başlatıcı hem uygulayıcı (efektör) olduklarından apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alırlar (Pistritto *et al.* 2016). Kaspazların aktivasyonunu sağlayan her iki yol da birbiriyle bağlantılıdır ve yapılan çalışmalar bir yoldaki moleküllerin diğer yoldaki molekülleri etkilediğini göstermiştir. Bu iki yol dışında daha az yaygın olan T-hücre aracılı sitotoksisiteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren bir yol daha vardır (Eröz vd. 2012). Tüm bu süreç başlamadan önce bir hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceği ise Bcl-2 ailesinin proteinleri arasındaki denge ile belirlenir (Pistritto *et al.* 2016).



Şekil 2.13 Apoptozun düzenlenmesinde instrinsik ve ekstrinsik yollar (Loreto *et al*. 2014)

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum gibi iyonlar, bazı genler, moleküller (seramid), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Apoptoz sırasında hücre içerisine sürekli kalsiyum girişi olur. Ancak bu kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir (Ulukaya 2001).

2.3.1.1 Kaspazlar

Sistein aspartat proteazları olan kaspazlar apoptozun en önemli bileşenleridir. Tüm kaspazlar hücrede zimojen olarak üretilir ve proteolitik parçalanma ile aktive edilirler. Apoptozda görevli olan başlatıcı kaspaz-2, 8, 9 ile 10 iç ve dış yollar tarafından aktifleştirilir. Efektör kaspaz-3, 6 ve 7 de başlatıcı kaspazlar tarafından aktifleştirilip sonraki aşamalarda görev alırlar. Kaspaz-1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 ise apoptozda görevi olmayan ve inflamatuar süreçlerde görevli olan kaspazlardır. Başlatıcı kaspazlar apoptotik yolaklar tarafından aktive edilirken efektör kaspazlar genellikle başlatıcı

kaspazlar tarafından aktifleştirilir. İntrinsik ve ekstrinsik yollar farklı başlatıcı kaspazları aktive ederler. Her iki yolda da efektör kaspaz-3, 6 ve 7 aktifleştirilir. Kaspaz-3 çeşitli hücre içi proteinlerin proteolitik bozunmasından sorumludur. Nükleer DNA'yı parçalayan kaspazla aktive olan DNAazları (CAD) aktive eder. CAD, bir alt birime bağlandığında inaktif kaspaz aktive edici DNaz (ICAD) formundadır. Efektör kaspaz-3 aktive edildiğinde çekirdeğe göç eder ve inhibitör alt birimi bölerek CAD'ı aktive eder. DNA, CAD tarafından 50-300 kb'lik parçalara ayrıldıktan sonra sonra endonükleazlar ile 180-200-bp'lik parçalara bölünür (O'Brien and Kirby 2008).

Kaspaz aktivitesinin kaybı tümör ilerlemesinin önemli bir nedenidir (Jiang *et al.* 2020). Meme kanserinde yapılan *in vitro* çalışmalarda, düzensiz kaspaz aktivitesinin kemoterapötik dirençte rol oynadığını göstermiştir. Yüksek seviyede kaspaz-3 ekspresyonunun da küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve hepatoselüler karsinomlu hastalarda iyileştirilmiş prognoz ile önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pu *et al.* 2017).

Apotozda görev alan protein ailelerinden biri de apoptoz inhibitörleri (IAP)'dir. Survivin, XIAP (X bağlantılı apoptoz inhibitör protein) ve Apollon gibi IAP'lar hem intrinsik hem de ekstrinsik yolağın merkezinde olan kaspazların endojen inhibitörleridir. Survivin hücre döngüsünü düzenler ve kaspaz-3 ve 7'yi inhibe ederken XIAP da kaspaz-3, 7 ve 9'u inhibe eder. IAP'lar apoptoz dışında hücre bölünmesi ve immün yanıtın düzenlenmesinde de rol almaktadırlar. IAP'ların aşırı ekspresyonu, kanser hücrelerinin ilaca dirençli fenotipi ile ilişkilendirilmektedir (O'Brien and Kirby 2008). Apollon'un gliomalarda aşırı ekspresyonunun, yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan sisplatin ve kamptotesine karşı direncinden sorumlu olduğu bulunmuştur. Survivin ve XIAP'ın, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomlarında aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir (Wong 2011).

2.3.1.2 İntrinsik yol

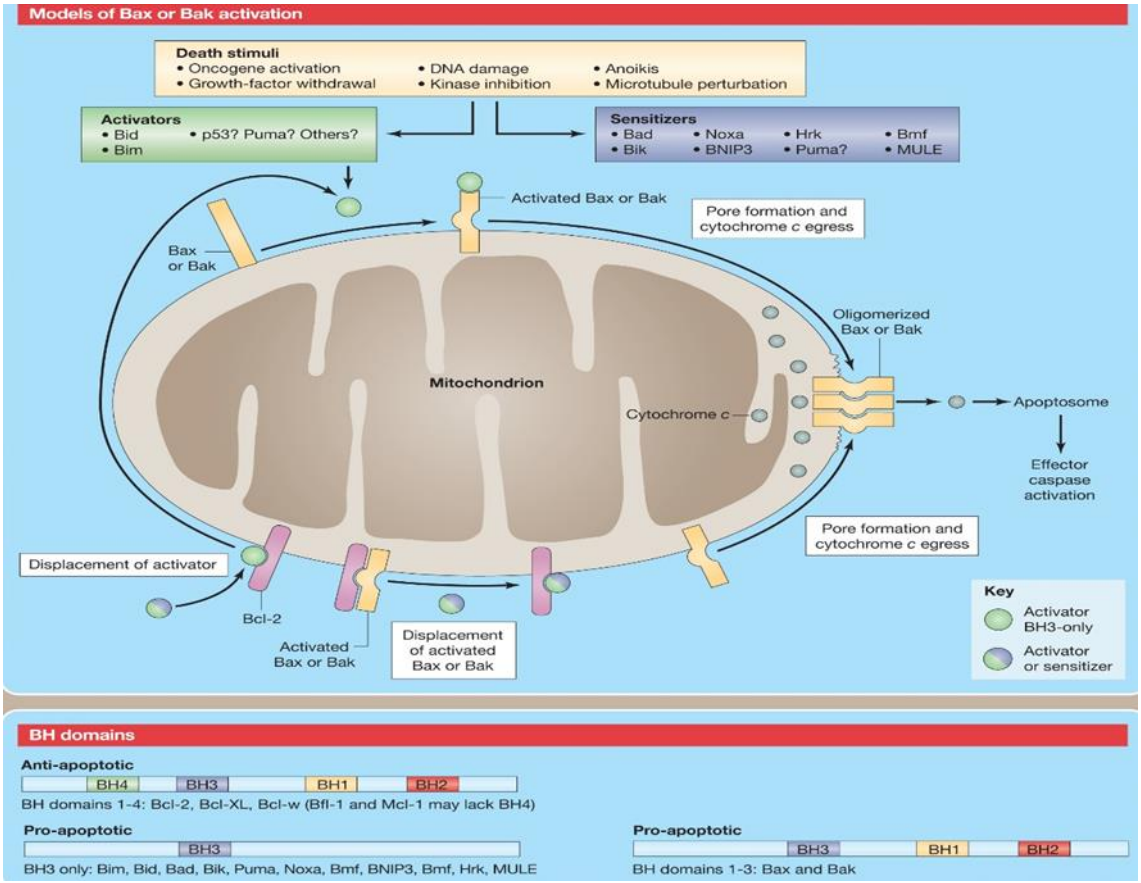
Hücre içinde başlatılan mitokondriyal yol, onarılamaz DNA hasarı, hipoksi, yüksek Ca^{2+} konsantrasyonu, şiddetli oksidatif stres ve pH azalışı gibi iç uyaranlar tarafından tetiklenir. Mitokondriyel yol Bcl-2 ailesine ait proteinler tarafından düzenlenmektedir.

Hücre uyarıldığında pro-apoptotik olan bid, anti-apoptotik bcl-2'yi inhibe ederken pro-apoptotik bax ile bak proteinini de aktive eder. Bax ve bak mitokondriyal zar potansiyelini değiştirerek zarda değişiklikler meydana getirir. Böylece mitokondriyal geçirgenlik artar ve sitokrom-c, Endo-G (Endonukleaz-G), IAP inhibitörü olan Smac/Diablo, Ca^{+2} ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) gibi apoptotik faktörler zarlar arası boşluktan sitoplazmaya salınır. Sitoplazmaya salınan sitokrom-c, ATP ve Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) ile birleşerek apoptozomu oluşturur. Apoptozom, kaspaz kaskadını başlatacak olan kaspaz aktive edici komplekstir. Apoptozom ile başlatıcı kaspazlardan prokaspaz-9'un aktivasyonu indüklenir ve aktive kaspaz-9 da efektör kaspazlar olan prokaspaz-3, 6 ve 7'yi aktifleştirir. Kaspaz-3 ICAD'ın inhibitör alt birimini bölerek CAD'ı serbest bırakır. Böylece aktif hale gelen CAD, çekirdekte kromatin yoğunlaşmasını ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde parçalanmasını sağlayarak apoptozu gerçekleştirir (Coşkun ve Özgür 2011).

2.3.1.3 Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi hücrenin iç uyaranlar sonucunda ölüme gidip gitmeyeceğini büyük oranda belirleyen protein ailesidir. Bcl-2 ismini, ilk olarak tanımlandığı, B hücreli lenfomadan (B cell lymphoma/leukemia-2) almıştır. Bcl-2 proteinleri, BH1'den BH4'e kadar sıralanan tipik BH (Bcl-2 Homoloji) alanlarının bileşimine bağlı olarak, bir grup anti-apoptotik ve ikisi pro-apoptotik işlevli olmak üzere üç alt grupta sınıflandırılır. Anti-apoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl1, A1 (Bfl-1) ve Bcl-B'dir ve 4 BH alanını da içerir. Pro-apoptotiklerden BH-1, 2 ve 3'ü içerenler Bax ve Bak, sadece BH-3 içerenler Bid, Bim, Bik, Bad, Puma ve Noxa proteinleridir. Bu proteinler özellikle mitokondriyal yolda zar geçirgenliğinin düzenlenmesinde görev alırlar. Anti-apoptotik proteinler apoptoz inhibitörüdür ve sitokrom- c'nin mitokondriyal salınımını bloke ederek apoptozun regülasyonunu sağlarlar. Pro-apoptotik proteinler bu salınımı teşvik ederek etki eder ve apoptoz indükleyicisi olarak çalışırlar (Pistritto *et al*. 2016). Homeostatik koşullarda, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, pro-apoptotik bax ve bak proteinlerinin inhibisyonunu sağlayarak mitokondriyal hasara neden olmasını önler ve mitokondriyal bütünlüğü korur. Ancak hücresel stres varlığında bid gibi sadece BH3 içeren pro-apoptotik proteinler aktif hale gelir ve Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerini baskılarlar. Anti-apoptotik

proteinlerin inhibisyonu da bax ve bak proteinlerinin aktifleşmesine sebep olur (Şekil 2.14). Böylece mitokondriyal dış membran geçirgenliği (MOMP) ile pro-apoptotik proteinler sitozole salınır (Brunelle and Letai 2009). MOMP, mitokondriyal yolağın geri dönüşü olmayan noktasıdır.



Şekil 2.14 Bax ve bak aktivasyonu (Brunelle and Letai 2009)

Sürekli ve kalıcı ölüm sinyalleri alan hücreler, hayatta kalmaları için Bcl-2'ye bağımlıdır. Bazı kanser hücrelerinin hayatta kalmak için Bcl-2 ve diğer anti-apoptotik proteinlere bağlı olduğu bilinmektedir (Brunelle and Letai 2009). Literatürde Bcl-2 ailesinin kanser hücreleri üzerine etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda Bcl-2'nin aşırı eksprese edildiği ve böylece prostat kanseri hücrelerinin apoptozdan kaçtığı, nöroblastom, glioblastoma ve meme kanseri hücrelerinde ekstrinsik yoldaki ölüm ligandlarından TRAIL (TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand) ile indüklenen apoptozun inhibisyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Wong 2001). Miquel vd. (2005), bax proteininde çerçeve kayması mutasyonlarının sebep olduğu bozulmuş apoptozun,

kolorektal kanserin tedavi direncine katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Miquel *et al.* 2005). Bcl-2 proteininin aşırı ekspresyonu, hücrenin hayatta kalmasını ve çoğalmasını desteklediğinden son yıllarda, kanser tedavileri için bcl-2 proteinini spesifik olarak hedeflemek üzere bazı bcl-2 protein inhibitörleri geliştirilmiştir. Bcl-2 onaylanmış bir ilaç hedefidir ve bcl-2'yi hedef alan inhibitörlerin çok çeşitli klinik uygulamaları bulunmaktadır (Rahman *et al.* 2021).

2.3.1.4 *p53* geni

Kanser başta olmak üzere birçok patolojik olgu *p53* geninde fonksiyon bozukluğu ve düzensiz apoptoz seviyeleriyle karakterizedir. Kanser vakalarının yaklaşık %50'si *p53* gen mutasyonlarını taşımaktadır. HPV'nin E6 onkoproteini gibi *p53* inhibitörlerinin ekspresyonunu uyaran çeşitli mekanizmalarla da *p53*'ün fonksiyonu engellenmektedir. *p53*, DNA hasarı, hücre döngüsünün kontrolü ve durdurulması, genom stabilizasyonu, yaşlanma, gen ifadesinin düzenlenmesi ve apoptoz gibi çok sayıda hücresel olayda görevlidir. *p53*'e bağlı apoptoz indüksiyonu hem intrinsik yol hem de ekstrinsik yol ile gerçekleşmektedir. Ekstrinsik yolda, DR5 ve Fas ölüm reseptörleri, *p53*'e bağlı bir şekilde DNA hasarı ile uyarılmaktadır ve kaspaz-8'in aktivasyonu sağlanmaktadır (Haupt *et al*. 2003). Bir transkripsiyon faktörü olarak *p53*, bax, puma, noxa ve bid başta olmak üzere birçok pro-apoptotik bcl-2 üyesini indükler ve bcl-2 ile bcl-xL dahil olmak üzere belirli anti-apoptotik genlerin transkripsiyonunu baskılar (Speidel 2010). İntrinsik yolda görevli olan bax geninin promotörü, bir *p53* bağlama bölgesi içerir ve *p53*'e duyarlı olduğu bilinmektedir. Noxa proteini de radyasyon ile *p53*'e bağlı bir şekilde indüklenir. Bax gibi, BH3 alanı yoluyla anti-apoptotik bcl-2 ailesi üyeleri bcl-2, bcl-xL ve mcl-1 ile etkileşime girer. Noxa'nın aşırı ekspresyonunun, bir dizi kanser hücre hattında apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Puma pro-apoptotik proteini de yine BH3 alanı aracılığıyla bcl-2 ve bcl-xL ile etkileşime girer. Aşırı ekspresyonu hücre büyümesini inhibe eder ve MOMP ile kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktifleşmesini içeren intrinsik yol aracılığıyla apoptozu indükler (Benchimol 2001).

2.3.1.5 Ekstrinsik yol

Apoptozun dışsal yolu özellikle immün yanıtta önemli bir rol oynar ve ölüm sinyallerinin bir ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Bu sinyaller TNF süper ailesine ait ölüm ligandlarıdır. TNF-a, FasL ve TRAIL bilinen en önemli ligandlardır. Bu ligandlar sırasıyla TNFR1, Fas ve TRAIL-R reseptörlerine bağlanırlar. TNF reseptör ailesinin üyeleri olan bu reseptörler, ölüm alanı olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik alana sahiptir (Elmore 2007). Dış yoldaki ölüm reseptörlerinin tümü, transmembran bölgeleriyle hücre zarına bağlanır. Ligand reseptöre bağlandığında, ölüm sinyalleri sitoplazmik ölüm alanları aracılığıyla hücre içi boşluğa iletir. Reseptörler birbirlerine benzeyen sisteinden zengin hücre dışı bölgeleri ve ölüm bölgesi (death domain, DD) olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik sitoplazmik bir alan içermektedirler. Bu alan, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içine iletilmesinde kritik bir rol oynar (Gökhan vd 2020). Reseptörlere doğal olarak bağlı bulunan TRADD (TNFR-1 ilişkili ölüm domaini) ve FADD (Fas ilişkili ölüm domaini) bölgeleri, ligand ve reseptör ile birleşerek ölüm indükleyici sinyal kompleksi olan DISC (ölüme neden olan sinyal kompleks)'i oluşturur. DISC oluşumuyla prokaspaz-8'in aktivasyonu sağlanır. Aktif kaspaz-8 direkt olarak prokaspaz-3'ü aktive edebilir ya da pro-apoptotik bid'i keserek mitokondriyal yolağı uyarır ve prokaspaz-9'u aktifleştirir. Aktif hale gelen kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktifleştir ve iki şekilde de aktive olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonunu sağlayarak DNA fragmentasyonuna neden olur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Tez çalışmasının kateşin uygulamaları için kateşin uygulama dozları Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi ABD Laboratuvarı'nda hazırlandı. Çalışmanın hücre kültürü deneyleri T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Şap Enstitüsü Hücre Bankası Laboratuvarı'nda yapıldı ve bu aşamada kullanılan kimyasal malzemeler ile sarf malzemeleri laboratuvar tarafından karşılandı. Deneyde kullanılan HeLa hücre hattı (Hükük Kayıt No: 90061901) T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Şap Enstitüsü'nden temin edildi. Deneyin apoptotik yolakların belirlenmesinde kullanılan ELISA testi aşaması T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Virolojik Teşhis Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.1.1 Kimyasal malzemeler

Çalışmada kullanılan malzemelerin listesi Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan malzeme listesi

Kimyasal Madde Adı	Üretici Firma	Katalog No
Fetal Bovine Serum	HIMEDIA	RM1112-500 mL
DMEM High Glucose (with stable glutamine-sodium pyruvate) (4.5 g/L)	Capricorn Scientific	DMEM-HPSTA
Trypsin/EDTA (0.5 Trypsin-0.53 mM EDTA)	Multicell	325-542-EL
Penicillin-Streptomycine	Multicell	
MTT((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) (5 mg/ml)	Sigma	56T51G
(-)-Epicatechin Gallate 1 mg	Cayman	CAY11808-1 mg
(-)-Epicatechin 1 mg	Cayman	CAY11807-1 mg

3.2 Metot

Bu çalışmanın deney aşamasında önce hücreler kültüre edilmiştir. Kateşin dozlarının uygulamasından sonra MTT analizi yapılmış ve son olarak ELISA yöntemi ile bcl-2, bax ve kaspaz-3 ifadesi belirlenmiştir.

3.2.1 Hücre kültürü

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Şap Enstitüsü Hücre Bankası Laboratuvarı'nda 20 kez pasajlama işlemi uygulanmış ve -196 °C sıvı azot tankında dondurulan HeLa An2 (Hükük Kayıt No: 90061901) hücre hattı kullanılmıştır.

3.2.1.1 Hücrelerin çözdürülmesi ve çoğaltılması

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Şap Enstitüsü Hücre Bankası Laboratuvarı'nda -196 °C sıvı azot tankından çıkarılan HeLa hücre hattı önce -80°C dondurucuda birkaç dakika bekletilip daha sonra 37 °C sıcak su banyosunda (Memmert) çözdürüldü. Hücre medyumu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ve FBS (Fetal Bovine Serum) +4 °C'den alınarak 37 °C sıcak su banyosunda birkaç dakika bekletilip oda sıcaklığına getirildi. Hücrelerin içinde bulunduğu kriyotüp, sıcak su banyosunda çözdürüldükten sonra 800 rpm'de 5 dakika santrifüj (Eppendorf-Centrifuge 5804 R) edildi. Laminar hava akımlı kabin (SafeFAST Elite) içerisinde kriyotüpteki medyum otomatik pipet (Eppendorf) yardımıyla atıldı ve kriyotüpün tabanındaki pelletin üzerine 1 mL %10 FBS içeren medyum eklenerek pipetasyon işlemi yapıldı. Pipet yardımıyla hücreleri içeren medyum T25 cm^2'lik kültür kabına aktarıldı. Üzerine 6 mL, FBS'li medyum eklenerek 37 °C'de %5 CO_2 içeren inkübatöre (Nüve-EC 160) alındı. Kültür kabının yüzeyine tutunarak (monolayer) çoğalan HeLa hücreleri her gün invert mikroskop ile incelenerek yeterli miktarda çoğaldıklarında pasajlama yapıldı.

3.2.1.2 Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması

İnkübasyona bırakılan hücreler invert mikroskop altında incelendi ve %80-90 oranında çoğaldıklarında pasajlama yapıldı. Üretilen hücrelerin bir kısmı MTT analizi için 96 kuyucuklu hücre pleytlerine alındı. Bir kısmı da 6 kriyotüp olacak şekilde daha sonra kullanılmak üzere donduruldu.

Kültür kabı laminar kabin içerisine alındı ve medyum, pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. Kültür kabına 6 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklenip karıştırıldıktan sonra döküldü. Tekrar 6 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklenip karıştırıldıktan sonra 5 mL solüsyon pipet ile çekildi ve kültür kabının içinde 1 mL solüsyon bırakıldı. İnkübatöre alınıp 5 dk bekletildikten sonra invert mikroskop altında hücrelerin kabın tabanından ayrılıp ayrılmadığına bakıldı. Kültür kabında süspanse hale gelen hücrelerin üzerine 7 mL DMEM medyumu eklenerek pipetasyon işlemi yapıldı. Hücre yoğunluğunu belirlemek amacıyla kültür kabındaki hücre solüsyonundan otomatik pipet yardımıyla 0,9 mL alınarak eppendorf tüpe konuldu. Üzerine 0,1 mL tripan mavisi (%0.4) boyası eklenerek karıştırıldı. Karışım Bürker Lamı üzerine konularak hücre sayımı yapıldı. 16 karede sayılan hücre sayısı ile 10.000 sayısı çarpılarak 1 mL hücre solüsyonunda ne kadar hücre bulunduğu belirlendi. Her pasajda belirlenen farklı sayıda hücre miktarına göre T25 cm^2'lik kültür kaplarına aktarılan hücre solüsyonunun üzerine 6 ml, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM medyumu eklenerek inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde 6 seri pasaj yapıldı ve üç pasaj sırasında hücreler MTT analizi için 96 kuyucuklu pleytlere bölündü.

Hücrelerin dondurulması için inkübatörden çıkarılan dört adet T25 cm^2'lik kültür kabı laminar kabine alındı. Medyum uzaklaştırıldı ve pasajlama işleminde yapıldığı gibi tripsinizasyon işlemi yapılarak 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası süspanse hale gelen hücrelerin üzerine DMEM medyumu eklendi ve falkon tüpüne alınarak santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında bulunan süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücreleri içeren tüpün dibindeki pelletin üzerine 6 mL dondurma kültür vasatı eklendi ve pipetasyon işlemi yapıldı. Dondurma kültür vasatı %10 DMSO ve %90 FBS olacak şekilde hazırlandı. 1 mL'lik 6 kriyotüp laminar kabin içerisine alındı ve falkon tüpündeki

6 mL'lik hücreleri içeren dondurma vasatından her kriyotüpe 1 mL konularak hücre dondurma kabı içerisine alındı. Herhangi bir kontaminasyon olup olmadığını tespit etmek amacıyla üç adet aerob, anaerob ve fakültatif besi yeri içeren tüplere hücreler eklendi. Birkaç gün sonra kontaminasyon olmadığı görüldü.

6 kriyotüpün bir tanesi Şap Enstitüsü Hücre Bankası Laboratuvarında -80°C dondurucuya alındı. 3 kriyotüp Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji ABD Laboratuvarında, 2 kriyotüp Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi ABD Laboratuvarı'nda -80°C dondurucuya konuldu.

3.2.1.3 Hücrelerin 96 kuyucuklu pleytlere ekimi

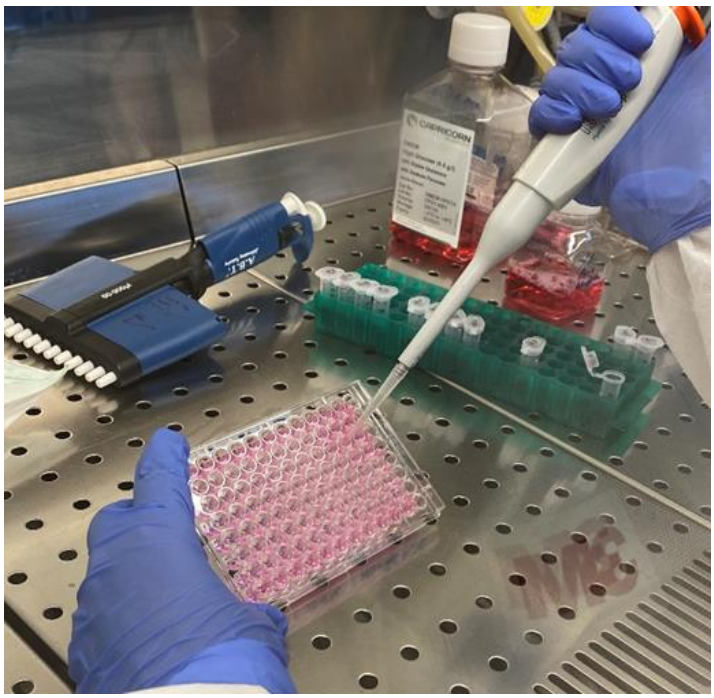
Hücreler MTT testi için üç farklı pasajla eş zamanlı olarak pleytlere bölündü. Pasaj sırasında yapılan hücre sayımı ile pleyte bölünecek hücre miktarı belirlendi. İstenilen hücre sayısı ile istenilen hacim (mL) çarpıldı ve hücre sayımında hesaplanan mL'deki hücre sayısına bölünerek pleytlere aktarılıcak hücre miktarı tespit edildi. Laminar kabin içerisinde, belirlenen hücre miktarının üzerine 30 mL'ye tamamlayacak şekilde DMEM medyumu eklenerek pipetasyon işlemi yapıldı. Hücre solüsyonu serolojik pipet yardımıyla laboratuvar küvetine aktarıldı. Otomatik pipet ile 96 kuyucuklu pleytin her kuyucuğuna 100'er µl hücre solüsyonu eklendi. Kontrol amaçlı olarak bir pleyte daha aynı şekilde ekim yapıldı. Kontrol ve test pleytleri ekim sonrası 37 °C'de % 5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

3.2.2 Kateşin dozlarının hazırlanması ve uygulanması

Kateşin dozları Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi ABD Laboratuvarı'nda hazırlandı. Toz halde satın alınan 1 mg EC ve 1 mg ECG, bulundukları tüp içerisinde DMEM medyumu eklenip vortekslendi. Çözüldükten sonra filtreden (Sartorius Minisart 0.2 µm) geçirildi. Filtrasyon sonrasında EC için yaklaşık 300 µl ve ECG için 500 µl 1000 ppm stok çözeltisi elde edildi. Her iki kateşin için hücrelere uygulanacak en yüksek doz 100 ppm olarak belirlendi. Ana stoğun medyum ile 1/10

oranında dilüe edilmesiyle 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 100 ppb, 10 ppb, 1 ppb, 100 ppt, 10 ppt, 1 ppt, 100 ppq, 10 ppq ve 1 ppq şeklinde toplam 12 dilüsyon hazırlandı. Her dilüsyon 1 mL'lik eppendorf tüplerin içerisinde vortekslenerek homojen hale getirildi. Bu şekilde dilüe edilerek tüm deney boyunca üç kez taze dilüsyon hazırlandı. Dozlar literatür taraması yapılarak EC ve ECG'nin farklı hücre hatlarındaki IC_{50} değerlerine göre belirlendi.

96 kuyucuklu pleytlere ekilen hücrelerin 24 saatlik inkübasyonundan sonra MTT analizi için kateşin dozlarının uygulaması yapıldı (Şekil 3). Laminar kabin içerisinde %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren 60 mL'lik DMEM içeren vasat hazırlandı. Test ve kontrol pleytleri inkübatörden çıkarılarak laminar kabine alındı ve pleytlerdeki hücreler döküldü. Kontrol pleytine 100'er µl vasat, test pleytine 100 µl EC ve ECG dozları eklendi. Pleytler 37 °C'de % 5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakıldı. Bu işlem farklı inkübasyon sürelerinde olmak üzere üç kez tekrarlandı.



Şekil 3.1 Pleyte ekilen hücrelerin inkübasyonu sonrasında kateşin dozlarının uygulanması

3.2.3 MTT analizi

EC ve ECG'nin HeLa hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla MTT analizi üç ayrı inkübasyon süresinde yapıldı. İlk MTT testinde EC ve ECG'nin hazırlanan 12 dozu uygulanırken diğer iki testte ilk 6 doz uygulandı.

MTT analizi, *in vitro* olarak sitotoksisite, hücre canlılığı ve çoğalmasının belirlenmesinde yaygın kullanılan kalorimetrik metodların başında gelmektedir. MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) pozitif yüklü bir tetrazolyum bileşiğidir. Ökaryot hücrelerin membranını kolayca geçebilir ve hücre içerisinde alındığında mitokondride süksinat dehidrogenaz enzimiyle indirgenir. İndirgenen MTT, formazan tuzlarını oluşturmaktadır. Formazan suda çözünemez, çökelir ve renk değişikliği meydana getirir. Tetrazolyum halkası aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve bu yüzden renk reaksiyonu sadece canlı hücrelerde görülmektedir. Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeyemedikleri için herhangi bir renk değişimine sebep olmamaktadır (Tokur ve Aksoy 2017). DMSO ve izopropanol gibi organik çözücüler kullanılarak bu formazan tuzları çözünür ve oluşan renk konsantrasyonu spektrofotometri cihazıyla ölçülerek hücre canlılığı ve sitotoksisite analizi yapılır.

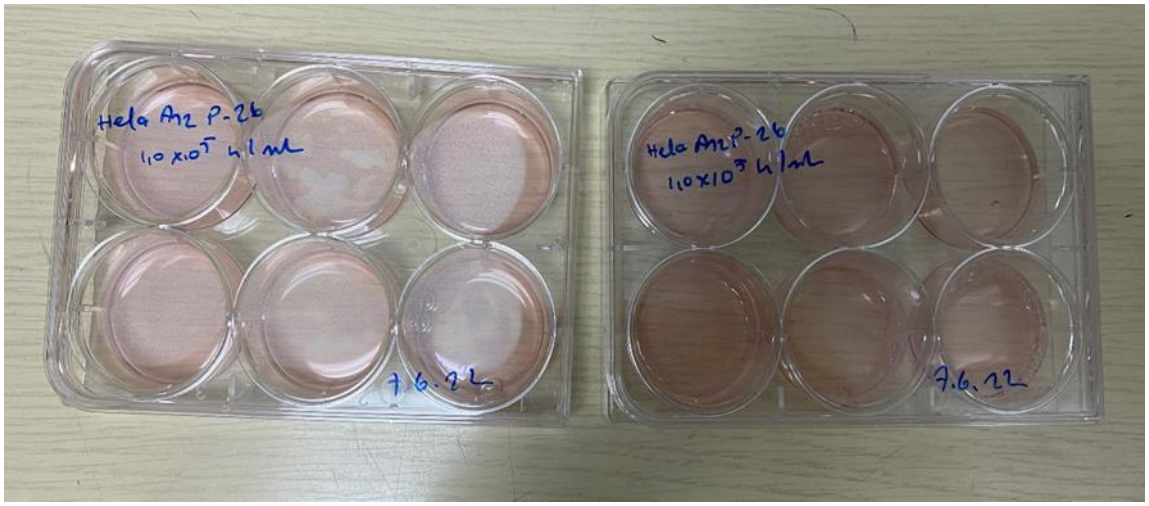
Deneyimizde MTT analizi 20, 28 ve 72 saatlik inkübasyon süreleriyle 3 tekrarlı olarak yapıldı. EC ve ECG dozlarının uygulanmasından sonra inkübasyona bırakılan test ve kontrol pleytleri inkübatörden çıkarılarak laminar kabine alındı. Her iki pleytteki vasat ve kateşin dozları çoklu otomatik pipet ile çekilerek uzaklaştırılıp her kuyucuğa 100 µl %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren vasat eklendi. Karanlık ortamda her iki pleytteki vasatın üzerine 13 µl MTT boyası konuldu ve 4 saatlik inkübasyona bırakıldı. Pleytler 4 saat sonra inkübatörden çıkarıldı ve her kuyucuğa 100 µl izopropil alkol eklenerek formazan tuzlarının çözünmesi sağlandı. Son olarak pleytlerin absorbans değerleri 540 nm dalga boyunda spektrofotometri cihazında ölçüldü.

3.2.4 Apoptotik yolak testleri

EC ve ECG'nin HeLa hücrelerindeki apoptotik yolaklar üzerindeki etkilerini anlamak amacıyla bu yolaklarda görev alan bcl-2, bax ve kaspaz-3 aktiviteleri araştırıldı. Bcl-2 (BCLX BT-LAB Kit), bax (BAX BT-LAB Kit) ve kaspaz-3 (CASP3 BT-LAB Kit) Sandviç ELISA kitleri temin edildi. Deneyimizin bu aşaması T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Virolojik Teşhis Laboratuvarı'nda yapıldı.

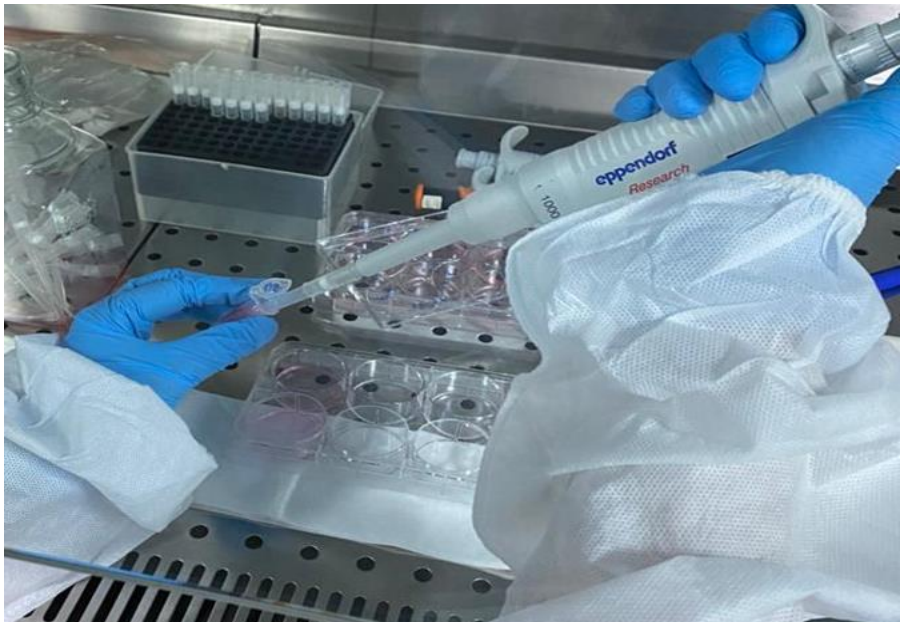
ELISA yönteminin temel prensibi antikor ile antijen arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. Sandviç ELISA testi ile numunedeki antijen miktarı belirlenmektedir. Sandviç ELISA'da plakadaki kuyucukların katı fazı antikorla (yakalama antikoru) kaplanır. Antijeni içeren numune ilave edildikten sonra antijen-antikor kompleksinin oluşması beklenir. Bağlanmayan proteinler yıkama yapılarak uzaklaştırılır. Yakalama antikoruna bağlanan antijenin farklı bir epitopuna bağlanması için enzim işaretli ikinci bir antikor (deteksiyon antikoru) eklenir. Bağlanmayan deteksiyon antikorları da yıkama işlemi ile uzaklaştırılır ve ortama enzime ait substrat eklenir. Substrat deteksiyon antikoruna bağlı enzimle reaksiyona girer ve numunedeki antijen miktarına bağlı olarak renk değişimi gerçekleşir. Bu renk değişiminin absorbans değeri de spektrofotometre cihazında ölçülerek antijen miktarı belirlenir.

MTT analizinden elde edilen sonuçlara göre EC ve ECG'nin IC_{50} değerleri belirlendi. Dondurduğumuz HeLa hücrelerinden bir kriyotüp -80°C dondurucudan çıkarılarak çözdürüldü ve T25 cm^2'lik kültür kabında kültüre edildi. Yeterli miktarda çoğaldıklarında tripsinizasyon ile hücreler kaldırılarak sayım yapıldı. Yapılan hesaplamaya göre hücreler her kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu pleytlere ekilerek 37 °C'de % 5 CO_2 içeren inkübatöre alındı. İki pleyte ekim yapıldı (Şekil 3.2). Her gün invert mikroskopta hücrelerin çoğalma durumuna bakıldı. %90 oranında çoğaldıklarında inkübatörden çıkarılarak laminar kabine alındı.



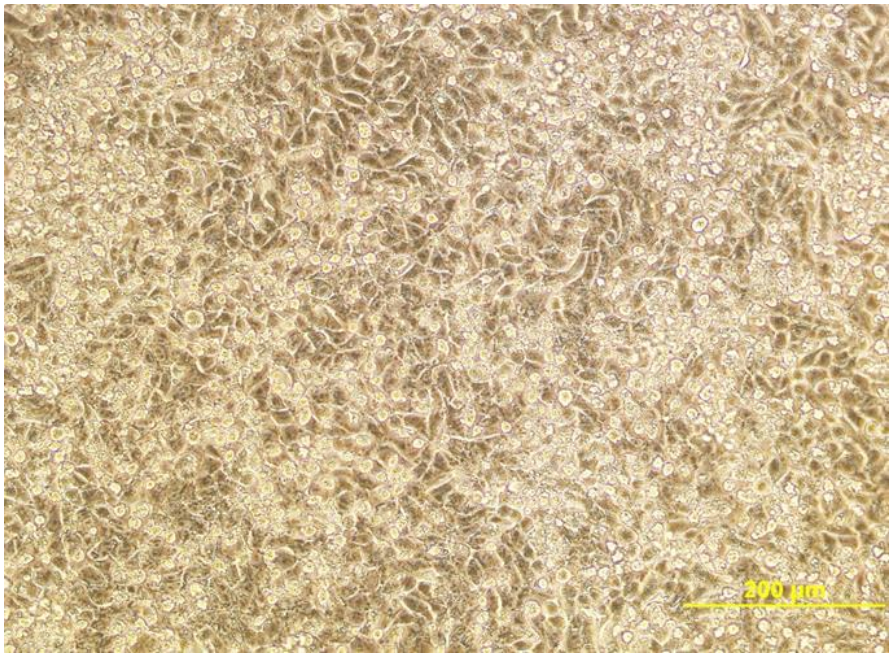
Şekil 3.2 HeLa hücrelerinin 6 kuyucuklu pleyte ekilmesi

EC ve ECG'nin MTT analizinden elde edilen veriler doğrultusunda IC_{50} değerlerinin 1/10 ve 1/100'lük dozları hazırlandı. Önce EC ve ECG'nin ana stok çözeltilerinden 1/10'luk taze dilüsyon hazırlandı. Bu dilüsyonlardan kateşinlerin IC_{50} değerlerinin 1/10 ve 1/100'lük dilüsyonlarını hazırlamak amacıyla hesaplanan miktarda EC ve ECG otomatik pipet ile çekilerek eppendorf tüpüne alındı. Üzerine 1000 µl'ye tamamlayacak şekilde DMEM medyumu eklenip vortekslenerek uygulama dozları hazırlandı. İnkübasyondan alınan pleytlerdeki medyum pipetle çekilerek uzaklaştırıldı. Yüzen hücreleri de uzaklaştırmak için tekrar 1000 µl medyum eklenip çekildi. 6 kuyucuklu pleytlerin iki kuyucuğuna negatif kontrol olarak 1000 µl medyum ve diğer dört kuyucuğa EC ve ECG'nin hazırlanan dozları eklendi (Şekil 3.3). 37 °C'de % 5 CO_2'li inkübatöre alınarak 72 saat inkübasyona bırakıldı.

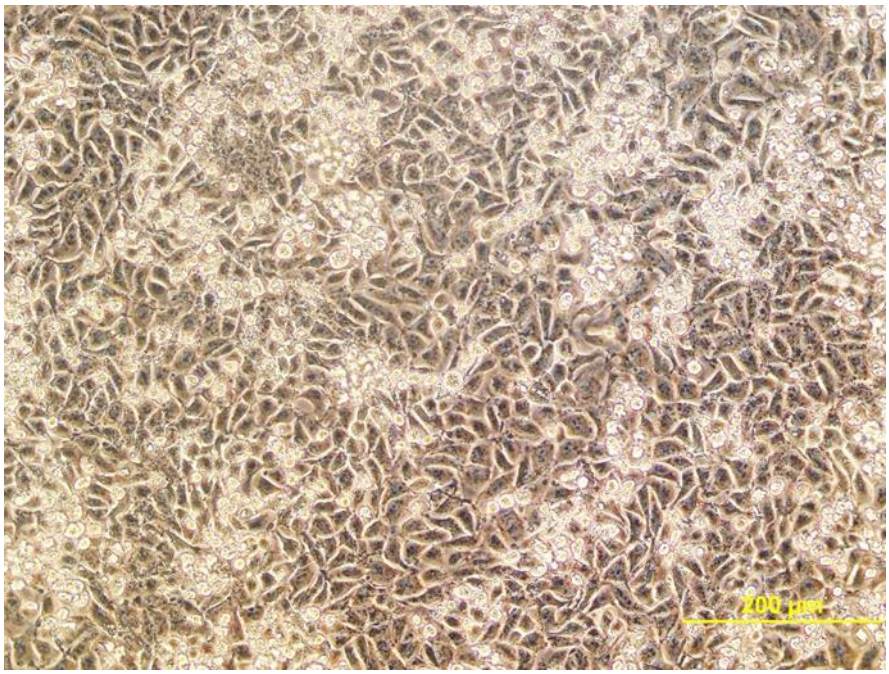


Şekil 3.3 ELISA testi için hücrelere kateşin dozlarının uygulanması

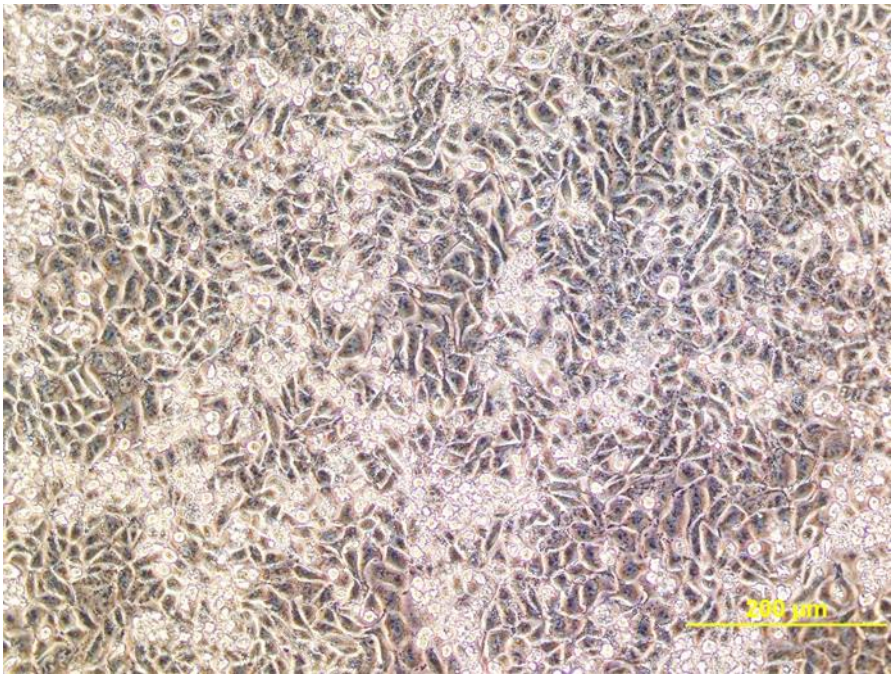
ELISA testi için 72 saatlik inkübasyon sonrasında hücreler toplandı. Önce birinci pleyt inkübatörden çıkarılarak mikroskop altında tüm kuyucuklar incelendi. Kuyucuklardaki hücrelerin mikroskop görüntüleri Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de gösterildi. Her kuyucuk için eppendorf tüpleri hazırlandı ve kuyucuklardaki medyumlar çekilerek eppendorflara alındı. Hücrelerin yüzeyden ayrılması için kuyucuklara 1000 µl tripsin eklenerek 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında mikroskop ile hücrelerin pleytin yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıklarına bakıldı. Pipetasyon işlemi yapılarak yüzeyden ayrılmayan hücreler varsa ayrılmaları sağlandı. Hücreler otomatik pipet ile çekilerek eppendorf tüplerine toplandı. İkinci pleyt de inkübatörden çıkarılarak mikroskop altında incelendi. Daha sonra birinci pleytte olduğu gibi aynı şekilde hücreler toplandı.



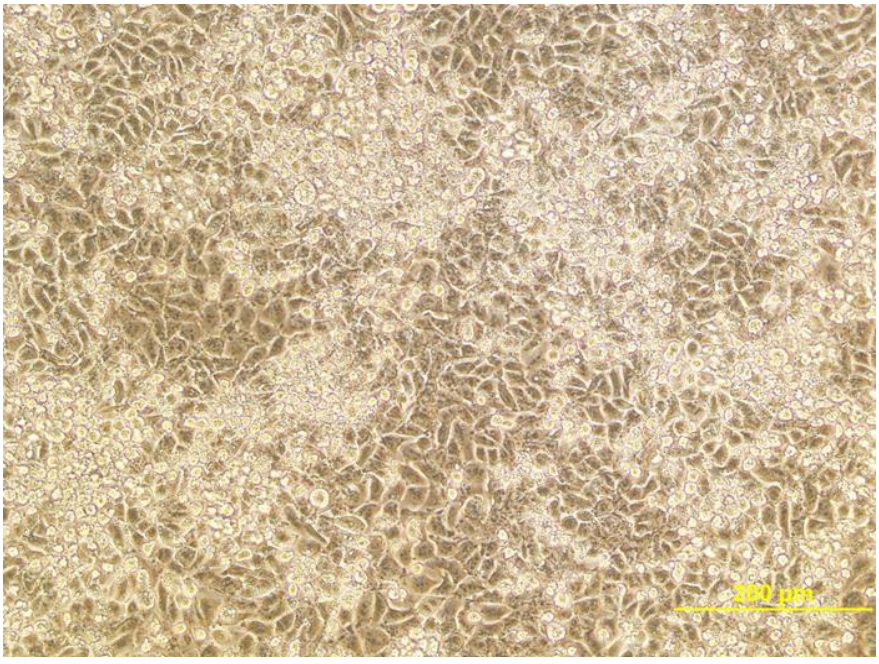
Şekil 3.4 HeLa hücrelerinin kateşin uygulanmamış kontrol grubunun 72 saatlik mikroskop görüntüsü (200 µm)



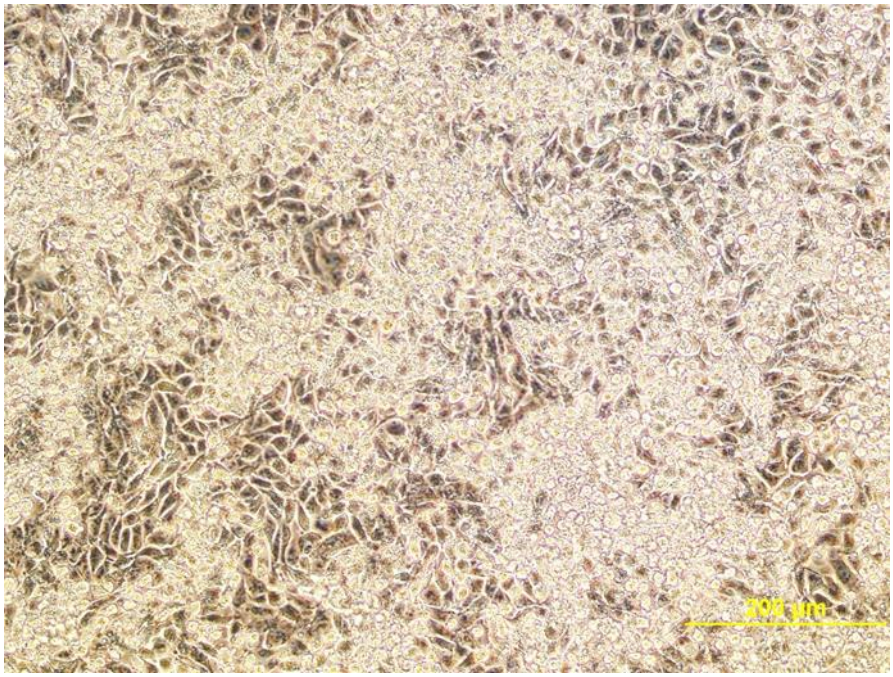
Şekil 3.5 HeLa hücrelerinin 1/10 konsantrasyonundaki EC'nin 72 saatlik inkübasyonu sonrasındaki mikroskop görüntüsü (200 µm)



Şekil 3.6 HeLa hücrelerinin 1/100 konsantrasyonundaki EC'nin 72 saatlik inkübasyonu sonrasındaki mikroskop görüntüsü (200 µm)



Şekil 3.7 HeLa hücrelerinin 1/10 konsantrasyonundaki ECG'nin 72 saatlik inkübasyonu sonrasındaki mikroskop görüntüsü (200 µm)



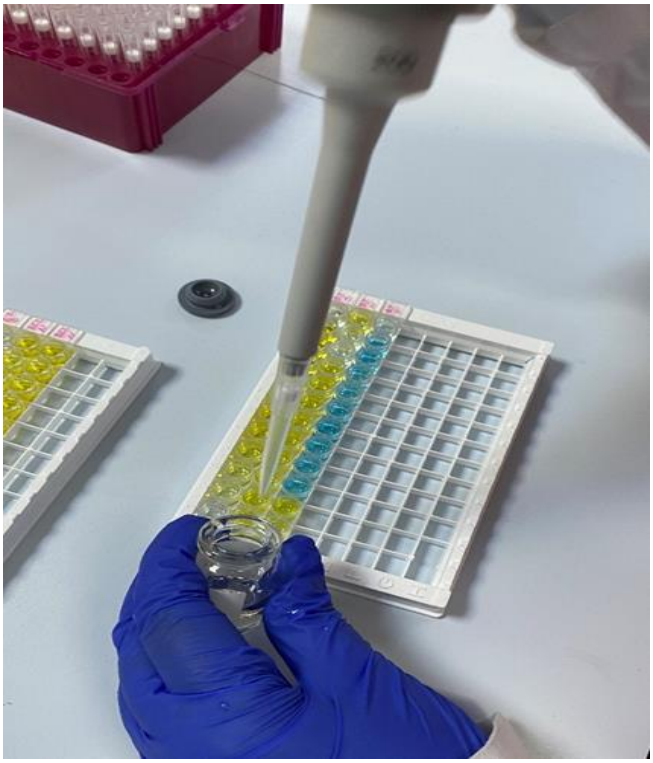
Şekil 3.8 HeLa hücrelerinin 1/100 konsantrasyonundaki ECG'nin 72 saatlik inkübasyonu sonrasındaki mikroskop görüntüsü (200 µm)

ELISA test kitlerinin prosedürlerine göre, toplanan hücrelerden süpernatant elde edildi. Önce eppendorf tüplerindeki hücreler 20 dk 3000 rpm'de santrifüj edildi. Sonra dikkatli bir şekilde dipte kalan pellete temas etmeden süpernatant toplanarak ayrı eppendorf tüplerine alındı. Pelletin bulunduğu eppendorfların üzerine 1000 µl fosfat tamponu (PBS) eklendi ve 10 dk -80°C dondurucuda bekletildi (Şekil 3.9). Çıkarılıp elde ısıtılarak çözdürüldükten sonra tekrar -80°C dondurucuya alındı. Bu dondurma ve çözdürme işlemi üç kez tekrarlandı. Son olarak çözdürüldükten sonra steril enjektör ile eppendorf içinde çek-bırak yapılarak hücreler parçalandı. Ardından 3000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatantlar toplandı.

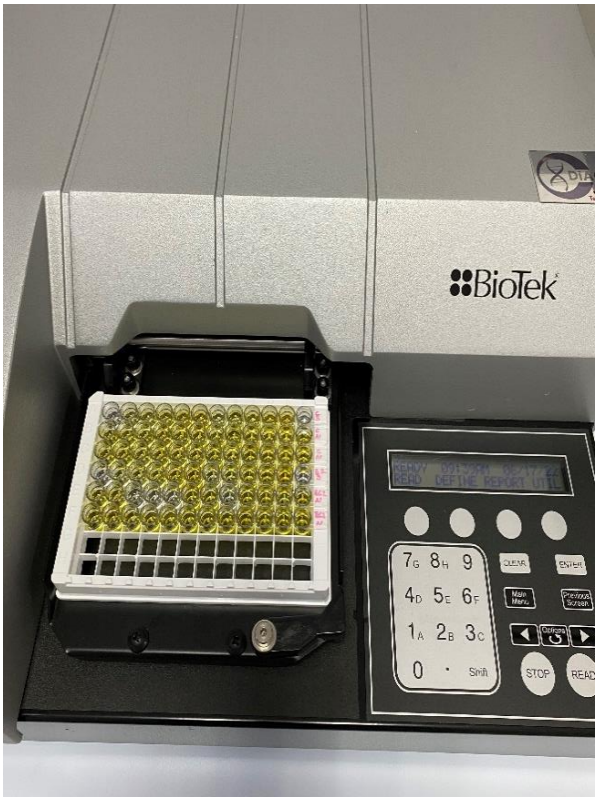


Şekil 3.9 Dondurucuda bekletilen PBS'li hücre pelletleri

Bcl-2, bax ve kaspaz-3 ELISA testleri kit prosedürlerine uyularak yapıldı. Kit içerisindeki reaktifler oda sıcaklığına getirildi ve standart çözeltisi hazırlandı. Şeritler belirlenen şekilde çerçevelere yerleştirildi. Her protein için üç şerit kullanıldı. Şeritlerdeki standart kuyularına 50 µl standart çözeltisi eklendi. Numune kuyularına 40 µl süpernatant ve ardından 10 µl her biri kendi şeritlerine olmak üzere bcl-2, bax ve kaspaz-3 antikorları eklendi. Numune ve standart kuyularına 50 µl streptavidin-HRP eklenerek plakanın üzeri örtüldü ve termo çalkalayıcıda (MB100-4A Thermo Shaker) 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda her kuyuya 300 µl yıkama tamponu eklenerek 5 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında her bir kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi A ve ardından 50 µl substrat çözeltisi B eklendi. Plakalar üzeri örtülerek karanlıkta 37 ° C'de 10 dakika inkübe edildi. Son aşamada reaksiyonu durdurmak amacıyla kuyucuklara stop solüsyonu eklendi ve mavi rengin sarı renge dönüşümü gözlendi (Şekil 3.10). Plakaların absorbans değerleri 450 nm'de mikroplaka okuyucuda (Biotek Elx800) okunarak ölçüldü (Şekil 3.11).



Şekil 3.10 Stop solüsyonu sonrasındaki renk değişimi



Şekil 3.11 Mikroplaka okuyucuda absorbans ölçümü

3.2.5 Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Hücre canlılık deneyleri sonunda elde edilen sonuçların Microsoft Excel 2013 programına girilmesinin ardından GraphPad Prism 5 istatistik programına girilerek inhibisyon konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. ELISA deneylerinin ardından elde edilen sonuçlar Microsoft Excel 2013 programına girilerek regresyon grafikleri çizdirilmiştir. Ardından sonuçlar, GraphPad Prism 5 istatistik programına girilerek normal dağılım ve varyansların homojenliği testleri açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen bütün veriler parametrik olmayan bir dağılım gösterdikleri için Kruskall Wallis testi ile analiz edilerek gruplar arasında anlamlılık dereceleri istatistiksel olarak belirlenmiştir. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmektedir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Günümüzde diğer kanser türleri ve servikal kanser tedavisinde kemoterapinin kullanımı birçok istenmeyen yan etkiye sebep olmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde güvenli ve etkili yeni bileşiklerin keşfi birçok araştırmanın odak noktası olmuştur. Literatürde bitkisel kökenli maddelerin kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça fazladır ve gün geçtikçe artmaya devam etmektedir. Flavonoidler en çok araştırılan bitkisel bileşenlerin başında gelmektedir ve insan diyetinde oldukça geniş yer alır (Birman 2012). Ana diyet kaynağı *Camellia sinensis* olan kateşinlerin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri birçok çalışmayla gösterilmiştir. Kateşinlerin farklı kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlenmiştir. Ancak yapılan literatür çalışmasında kateşinlerden EC ve ECG'nin insan servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücreleri üzerinde apoptotik yolaklar üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

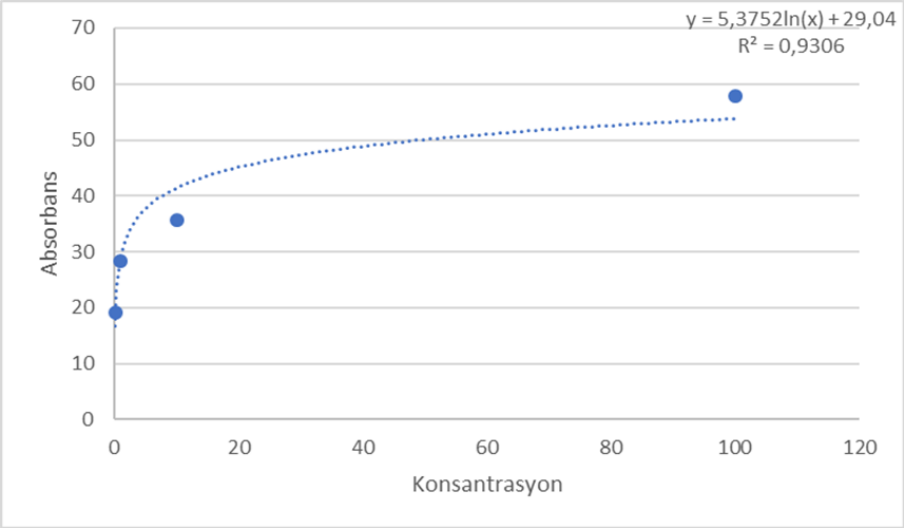
Bu çalışmada en önemli dört kateşinden ikisi olan epikateşin (EC) ve epikateşin gallat (ECG)'ın HeLa servikal kanser hücrelerinde, hücre sitotoksisitesi ve apoptotik yolaklarda görevli olan bcl-2, bax ve kaspaz-3 proteinlerinlerin aktivitesinde bir değişime sebep olup olmadığı araştırıldı. İlk olarak EC ve ECG'nin HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini saptamak amacıyla sitotoksisite testlerinden MTT testi yapıldı. EC ve ECG'nin elde edilen MTT test sonucuna göre hesaplanan IC_{50} değerleri kullanılarak bcl-2, bax ve kaspaz-3 proteinlerinin aktivitesine olan etkileri ELISA test kitleri uygulanarak belirlendi.

4.1 EC ve ECG'nin HeLa Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

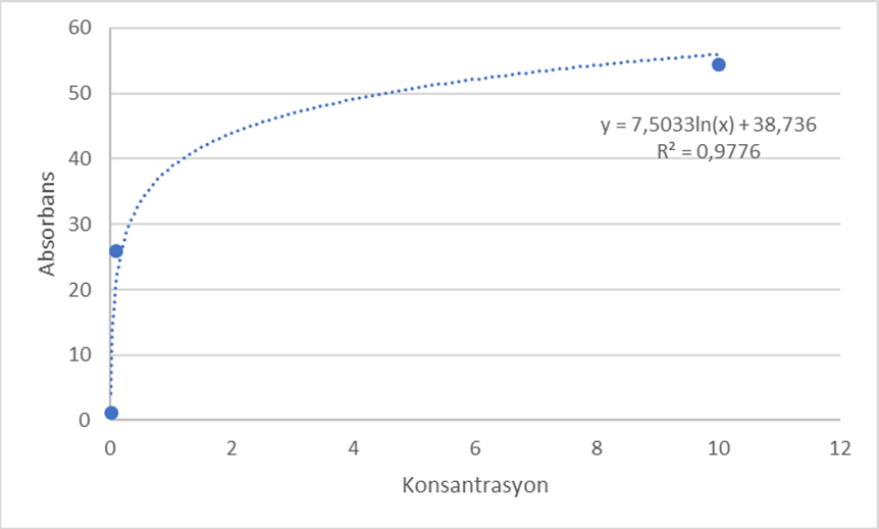
HeLa hücrelerinde EC ve ECG'nin hücre canlılığına olan etkilerini belirlemek amacıyla sitotoksisite testlerinden MTT testi yapıldı. Test için HeLa hücrelerine 20, 28 ve 72 saatlik, farklı dozlarda EC ile ECG uygulandı. 20 ve 28 saatlik, 100 ppm'den başlanarak 1/10 oranında dilüsyonla hazırlanan 12 dozun uygulandığı MTT testi sonucuna göre EC ve ECG'nin hücre canlılığı üzerinde belirgin bir etkisi görülmedi. Her iki kateşinin de 20 ve 28 saatlik inkübasyon sonrasında IC_{50} değeri hesaplanamadı. 72 saatlik EC ve ECG

uygulaması için, hazırlanan ilk 6 doz olan 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 100 ppb, 10 ppb ve 1 ppb'lik dozlar seçildi. 72 saatlik inkübasyon sonrasında yapılan MTT testi sonucuna göre her iki kateşinin de sitotoksik etki gösterdiği saptandı. Dozlar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi. Kontrole göre hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonu olan IC_{50} değeri, 72 saatte EC için 48.91 ppm ve 168,5 µM, ECG için 4.47 ppm ve 10,10 µM olarak hesaplandı. HeLa hücrelerinde ECG'nin EC'den çok daha fazla sitotoksik etki gösterdiği belirlendi.

HeLa hücrelerine 72 saat boyunca 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 100 ppb, 10 ppb ve 1 ppb'lik EC ve ECG uygulaması sonrasında elde ettiğimiz hücre canlılık grafikleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Epikateşinin hücre canlılık grafiği



Şekil 4.2 Epikateşin gallatın hücre canlılık grafiği

4.2 EC ve ECG'nin HeLa Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi

Apoptozu, nekroz gibi diğer hücre ölümlerinden farklı kılan bazı spesifik özellikler vardır. Apoptotik hücre ölümü sırasında gerçekleşen, kromatin kondensasyonu, hücre zarında kabarcık oluşumu, DNA fragmentasyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu bu hücre ölüm tipine özgüdür. Bu morfolojik özellikler dışında apoptoz sırasında çevre hücre ve dokuların zarar görmemesi de apoptozu nekrozdan ayıran en önemli özelliklerdendir. Apoptoz morfolojik, genetik, biyokimyasal ve moleküler olarak çeşitli yöntemlerle belirlenebilmektedir. Bizim çalışmamızda da EC ve ECG'nin HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkiye sahip olup olmadıklarını bcl-2, bax ve kaspaz-3 ELISA test kitleri uygulanarak incelenmiştir.

Çalışmamızda HeLa hücrelerine, EC ve ECG'nin apoptotik proteinlerden bcl-2, bax ve kaspaz-3'ün aktivitesini araştırmak amacıyla belirlenen IC_{50} değerlerinin 1/10 ve 1/100'lük dozları uygulanmıştır. Bu dozlar, EC için sırasıyla 4.89 ppm ve 0.489 ppm, ECG için ise 0.447 ppm ve 0.0447 ppm olarak hesaplanmıştır. µM olarak karşılığı ise EC için 16.8 ve 1.6 µM, ECG için 1 ve 0.1 µM olarak bulunmuştur. Hücrelere her kateşinin hesaplanan iki dozu uygulanmış ve 72 saat inkübasyon sonrasında hücreler toplanmıştır. ELISA testleri, kit prosedürlerine göre uygulanmıştır. Mikroplaka okuyucuda 450 nm'de

absorbans ölçümleri yapılarak her üç proteinin de EC ve ECG varlığındaki aktiviteleri belirlenmiştir.

Apoptozun gösterilmesi için yapılan ELISA testinden elde edilen verilere göre HeLa hücrelerine 72 saatlik EC ve ECG uygulaması sonucunda bax ifadesinde EC'nin 4.89 ppm'lik dozu dışında artış meydana gelmiştir. Bcl-2 miktarında ise iki kateşin ve dört dozda da artış görülmüştür. Kaspaz-3 miktarında da yine EC'nin 4.89 ppm'lik dozu haricinde artış olmuştur.

Apoptoz indüksiyonunda bax/bcl-2 oranı önemli rol oynar. Bax düzeyi artıp bcl-2 düzeyi azaldığında bu oran artar ve apoptoz uyarılır. Elde ettiğimiz bax ve bcl-2 değerlerine göre apoptoz oluşumu Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

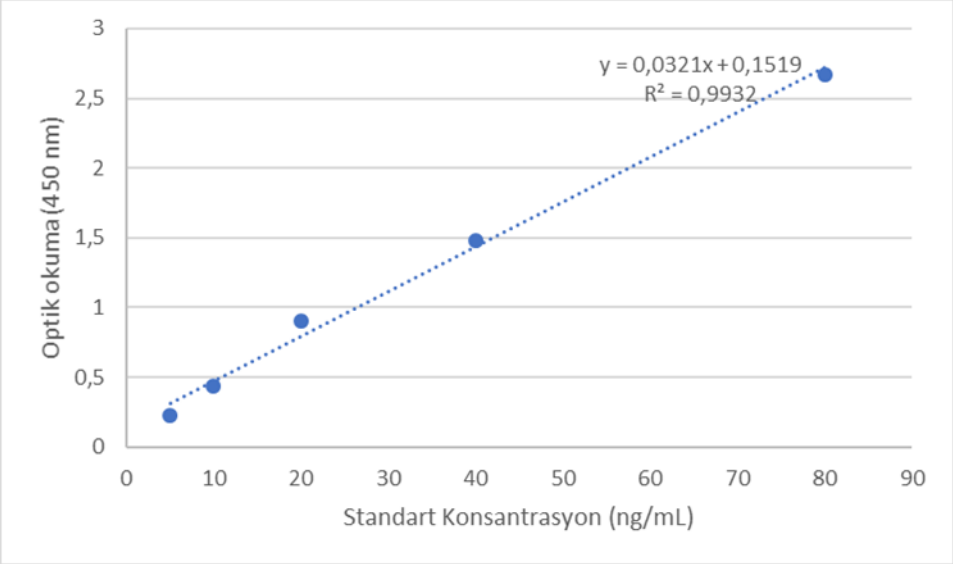
Çizelge 4.1 Apoptoz oluşumunun gösterilmesi

	Bax	**Bcl-2**	**Apoptoz oranı**
Negatif Kontrol	25,51	16,81	1,51
EC 4.89 ppm	24,55	16,94	1,44
EC 0.489 ppm	27,69	21,14	1,31
ECG 0.447 ppm	31,04	17,79	1,74
ECG 0.0447 ppm	34,98	20,35	1,71

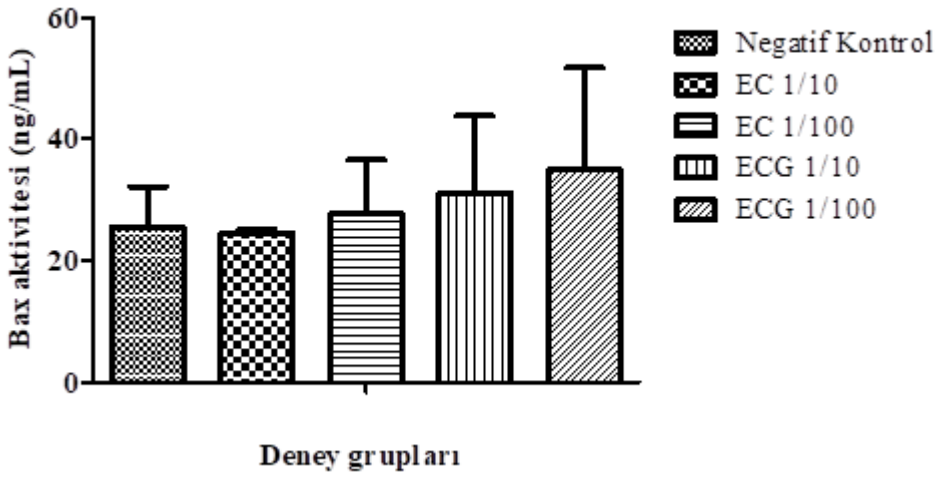
Kontrole göre HeLa hücrelerinde apoptoz oluşumunun yalnızca ECG uygulaması sonucunda artış gösterdiği belirlenmiştir. EC uygulamasının bax miktarında belirgin bir değişikliğe sebep olmaması ve bcl-2 miktarında da artış görülmesi sebebiyle apoptoz oluşumunda kontrole göre azalma görülmüştür.

Bax ELISA test kitinden elde ettiğimiz verilerden negatif kontrole göre EC'nin 4.89 ppm'lik dozu varlığında bax ifadesinde azalma ve 0.489 ppm'lik dozu varlığında artış görülmüştür (P>0.05). ECG'nin ise her iki dozunun varlığında da artış görülürken daha

düşük dozu olan 0.0447 ppm'lik dozunda bax ifadesi 0.447 ppm'lik doza göre daha fazla artmıştır (P>0.05). En fazla artış ECG'nin 0.0447 ppm'lik dozunda görülmüştür. Bu sonuçlar ECG'nin her iki dozu ve EC'nin 0.0447 ppm'lik dozunun apoptozu uyaran, pro-apoptotik protein olan bax proteinini ve böylece apoptozu indüklediğini göstermektedir. HeLa hücreleri üzerinde her iki kateşinin de daha düşük dozları bax aktivasyonunda daha etkilidir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

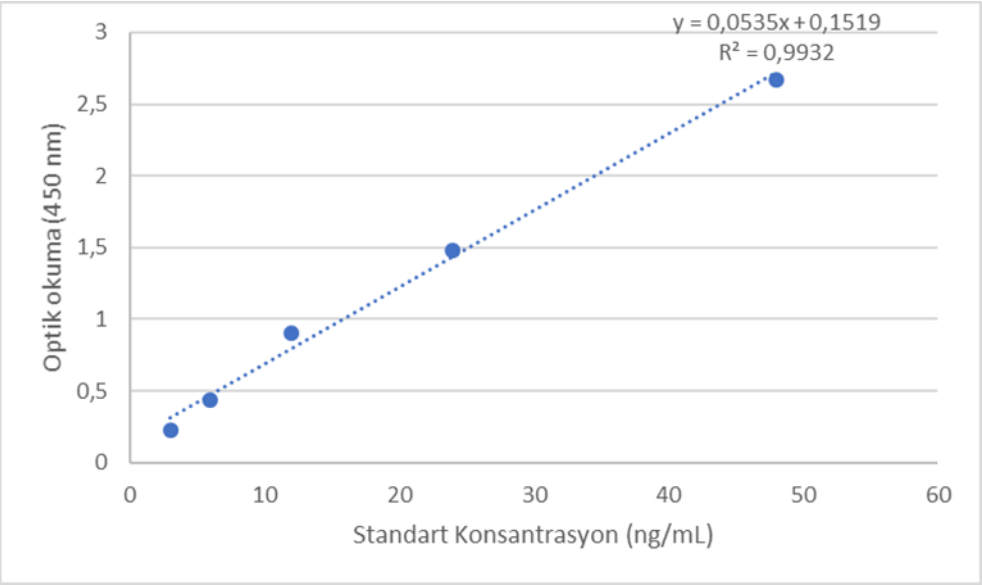


Şekil 4.3 Bax apoptotik yolak testi absorbans grafiği

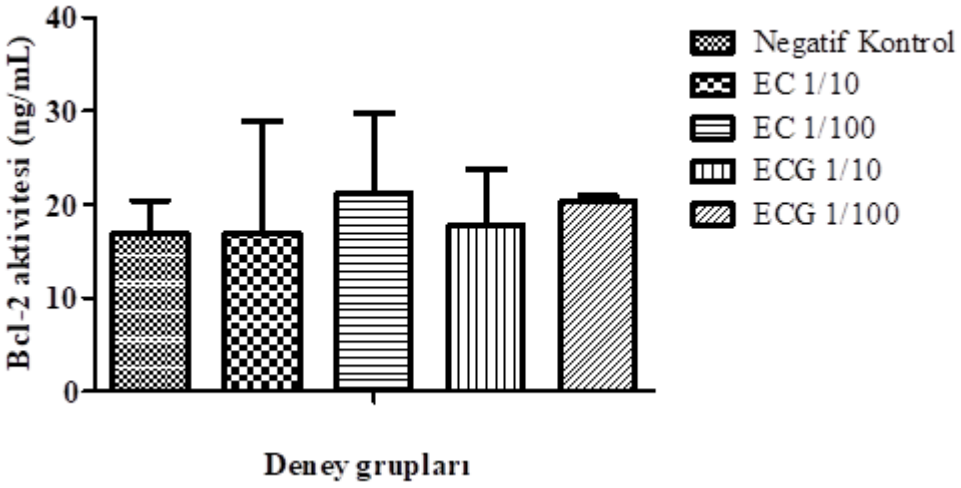


Şekil 4.4 Kateşinlerin varlığında bax aktivitesi

Bcl-2 ELISA test kitinden elde ettiğimiz verilerden negatif kontrole göre EC ve ECG'nin her iki dozunda da bcl-2 miktarında artış görülmüştür. Her iki kateşinin de daha düşük dozlarında yüksek doza göre daha fazla artış meydana gelmiştir (P>0.05). Elde ettiğimiz bu sonuçlar apoptozu baskılayan, anti-apoptotik protein olan bcl-2'ye karşı EC ve ECG'nin inhibe edici özelliğinin bulunmadığını göstermiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

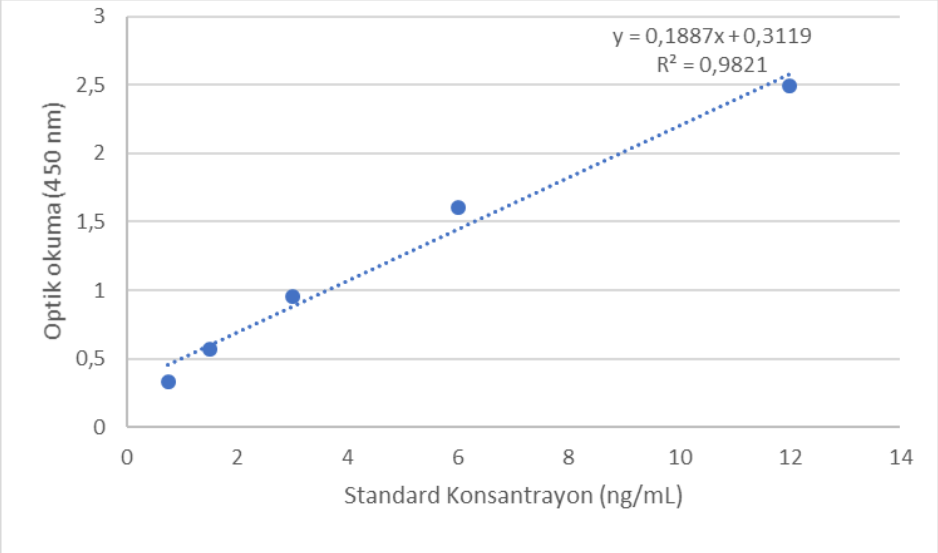


Şekil 4.5 Bcl-2 apoptotik yolak testi absorbans grafiği

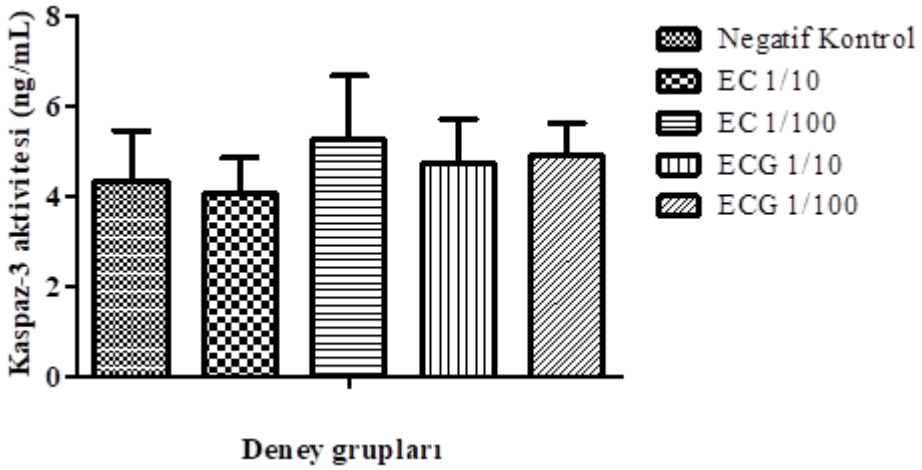


Şekil 4.6 Kateşinlerin varlığında bcl-2 aktivitesi

Kaspaz-3 ELISA test kitinden elde ettiğimiz değerlerden negatif kontrole göre EC'nin 4.89 ppm'lik dozu varlığında kaspaz-3 miktarında azalma ve 0.489 ppm'lik dozu varlığında artış görülmüştür (P>0.05). ECG'nin ise her iki dozunun varlığında da artış görülürken daha düşük dozu olan 0.0447 ppm'lik dozda kaspaz-3 ekspresyonu 0.447 ppm'lik doza göre daha fazla artmıştır (P>0.05). En fazla artış EC'nin 0.489 ppm'lik dozunda görülmüştür. HeLa hücrelerinde 72 saatlik EC ve ECG maruziyetinden sonra kaspaz-3 aktivitesinde belirgin bir artış görülmemiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.7 Kaspaz-3 apoptotik yolak testi absorbans grafiği



Şekil 4.8 Kateşinlerin varlığında kaspaz-3 aktivitesi

Pereyra-Vergara vd. (2020), insan meme kanserinin en yaygın ve en agresif histolojik alt tipinin modelleri olan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında EC'nin sitotoksik etkisini MTT testi ile belirlemişlerdir. Çalışmada araştırmacılar hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda (50-500 μM) EC uygulaması yapmış ve 72 saat inkübasyon sonrasında MTT testi uygulamışlardır. Araştırmacılar MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde 72 saatlik EC maruziyeti sonrasında her iki hücre hattında da IC_{50} değerini 350 μM olarak belirlemişlerdir. Hücre canlılığındaki bu azalma apoptozun indüklenmesiyle açıklanabileceğinden, hücre hatlarının EC'nin IC_{50} değeriyle 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonrasında elektroforez ile DNA fragmentasyonunu analiz etmişlerdir. Araştırmacılar, Annexin V/PI (propidyum iyodür) metodu ile akım sitometri analizi yapmışlar ve EC'nin her iki meme kanser hücre hattında apoptotik etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu etkinin moleküler temelini araştırmak amacıyla da İnsan Apoptoz Antikor Dizi analizi yapmışlardır. Analiz sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinde prokaspaz-3 ekspresyonunda ve MCF-7 hücrelerinde de bax ekspresyonunda artış olduğunu bildirmişlerdir (Pereyra-Vergara *et al.* 2020).

Ramos vd. (2005), insan hepatoma hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde EC'nin de içinde bulunduğu bir grup polifenolün, hücre canlılığı ve apoptoz üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Hücre canlılığını Neubauer Lamında sayım yaparak belirlemişlerdir. Hücrelerin, 1000 μM EC ile 4 ve 18 saatlik tedavi sonrasında canlılıkları sırasıyla %8 ve %15−20 oranında azalmıştır. Analiz edilen konsantrasyon ve sürelerde IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Araştırmacılar 500 μM EC ile 18 saatlik tedavi sonrasında DNA fragmentasyonu gözlemişler ve daha yüksek konsantrasyonda fragmentasyonun daha belirgin hale geldiğini saptamışlardır. Bu çalışmada 18 saatlik tedaviden sonra HepG2 hücrelerinde canlılık ve apoptoz üzerinde belirgin bir etki göstermeyen EC'nin hücre döngüsü üzerindeki etkilerine de bakılmıştır. 250-1000 μM EC ile yine 18 saatlik tedavi sonrasında hücreler propidyum iyodür ile boyanmış ve akım sitometri analizi yapılmıştır. EC en yüksek konsantrasyonda bile G1, G2/M ve S fazlarında bir değişikliğe sebep olmamıştır (Ramos *et al.* 2005).

Ramos vd'nin 2005 yılında yaptıkları çalışmadan sonra Granado-Serrano vd. (2007) HepG2 hücrelerinde EC'nin apoptotik moleküler mekanizmasını incelemişlerdir.

Antioksidan aktivitenin belirlenebilmesi için de hücre içi ROS seviyesini test etmişlerdir. Hücrelerde 100 µM EC varlığında 18 saat sonunda ROS seviyesinde belirgin bir azalma gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar apoptotik yolakların saptanması için kaspaz-3, bcl-xL ve bax proteinlerinin aktivitesini araştırmışlardır. Bcl-xL ve bax aktivitesi Western Blot Analizi, kaspaz-3 aktivitesi ise florometrik analiz ile belirlenmiştir. 1-100 µM 18 saatlik EC uygulamasından sonra kaspaz-3 aktivitesinde belirgin bir artış görülmemiştir. HepG2 hücrelerine aynı süre ve konsantrasyondaki EC uygulaması, Bcl-2 ailesinden anti-apoptotik protein olan bcl-xL ve pro-apoptotik olan bax seviyelerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Granado-Serrano *et al*. 2007).

Ravindranath vd. (2006) cinsiyete bağlı kanserlerden türetilen hücre hatları üzerinde ECG'nin IC50 değerini belirlemişlerdir. Organa sınırlı (HH870) ve metastatik (DU145) prostat kanserinden ve orta derecede (HH450) ve zayıf farklılaşmış (HH639) epitelyal yumurtalık kanserinden geliştirilen hücre hatları ile çalışmışlardır. EC tedavisinin HH639 hücre hattında hücrelerin çoğalmasını %50 oranında azalttığı ve ECG'nin 4 hücre hattında da çoğalmayı aynı oranda azalttığı gösterilmiştir. ECG'nin HH870, DU145, HH450 ve HH639 hücre hatlarında IC_{50} değerlerini sırasıyla 27.44 µM, 24.09 µM, 28.95 µM ve 29.59 µM olarak bulmuşlardır (Ravindranath *et al.* 2006).

Ravindranath vd. 2009 yılında yaptıkları çalışmada da melanoma hücre hatları MB-1133 ve GE-0208 hücrelerinde 20, 40 ve 60 µM ECG'nin IC_{50} değerlerini sırasıyla 45 µM ve 41 µM olarak bulmuşlardır (Ravindranath *et al.* 2009).

Braicu vd. 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada bir meme kanseri hücre hattı olan Hs578T hücrelerinde kateşinlerin etkileri araştırılmıştır. 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında yaptıkları MTT testine göre ECG'nin 0-750 µM dozlarından elde ettikleri IC_{50} değerleri sırayla 155.1 µM ve 32.56 µM olarak hesaplanmıştır (Braicu *et al.* 2011).

Babich vd. (2005) ECG'nin insan ağız boşluğu karsinoma HSC-2 hücrelerine ve normal fibroblast HGF-2 hücreleri üzerindeki biyolojik aktivitesini değerlendirmiştir. HSC-2 ve HGF-2 hücre hatlarında ECG'nin apoptotik etkisinin de araştırıldığı çalışmada kaspaz-3 indüksiyonuna bakılmıştır. 18 saat boyunca 150 µM ECG'ye maruz kalma HSC-2

hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. Kaspaz-3 aktivasyonuyla birlikte DNA fragmentasyonu ve apoptoz morfolojisi gözlenmiştir. Normal HGF-2 hücrelerinde ise 250 uM EC uygulamasında kaspaz-3 indüksiyonu gözlenmemiştir. Bu çalışma ECG'nin karsinoma HSC-2 hücrelerine karşı normal HGF-2 fibroblastlarına göre daha fazla sitotoksik olduğunu ancak sadece karsinom hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir (Babich *et al.* 2005).

Ganguly vd. (2005) yüksek metastatik akciğer kanser hücre hattı olan NCI-H460 hücrelerine çay polifenollerinin p53 ve bcl-2 proteinlerinin ekspresyon seviyesine olan etkilerini Western Blot Analizi ile belirlemişlerdir. 72 saatlik ECG tedavisinden sonra p53 ekspresyonunda kontrol grubuna göre %30 oranında artış ve 24 saatlik ECG tedavisinden sonra bcl-2 ekspresyonunda azalma gözlemlemişlerdir (Ganguly *et al.* 2005).

Suganuma vd'nin. 1999 yılında yaptıkları çalışmada insan akciğer kanser hücre hattı PC-9 hücrelerinde dört kateşinin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmayla EGCG-EC, ECG-EC ve EGC-EC ile birlikte tedavinin apoptozu sinerjetik olarak artırdığına dair ilk kanıtı sunmuşlardır. ECG için IC_{50} değeri 40 µM olarak belirlenmiştir (Suganuma *et al.* 1999).

Kim vd. (2012) *Bulnesia sarmienti* bitkisinden elde ettikleri EC'nin SW480 insan kolon kanseri hücre hattındaki antikanser etkilerini incelemişlerdir. 48 saatlik 0, 25, 50 ve 100 µM EC maruziyeti sonrasındaki IC_{50} değerini < 60 µM olarak belirlemişlerdir. Aynı süre ve konsantrasyonlardaki EC tedavisinin SW480 hücrelerinde p53 ile bax proteininin ifadesini artırdığı ve bcl-2 ifadesini azalttığını Western Blot analizi ile göstermişlerdir. Ayrıca morfolojik olarak DNA fragmentasyonu da saptamışlar ve bax/bcl-2 oranının artışıyla da EC'nin SW480 hücrelerinde apoptoza neden olduğunu tespit etmişlerdir (Kim *et al.* 2012).

Chung vd. (2001) insan prostat kanser hücre hattı olan DU145 hücrelerinde kateşinlerin apoptotik etkisini incelemişlerdir. Hücreler, en çok araştırılan dört kateşin olan EC, ECG, EGC ve EGCG'nin 100 µM'lık dozlarıyla 72 saat tedavi edilmiş ve kateşinlerin apoptoz üzerindeki etkisi DNA fragmentasyonu ile belirlenmiştir. Araştırmacılar DNA

fragmentasyonunu en çok indükleyen kateşinin ECG ve en az indükleyen kateşinin EC olduğunu saptamışlardır. Çalışmada kateşinlerin apoptozu indükleyen yollardan biri olan ROS oluşumuna olan etkilerini incelemek için peroksit ve süperoksit seviyelerine de bakılmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonrasında ECG peroksit seviyesini önemli ölçüde artırırken EC'nin bir etkisi gözlenmemiştir. Süperoksit seviyesinde ise dört kateşinin de bir etkisi olmamıştır. ECG, DU145 hücrelerinde DNA fragmentasyonu ve ROS oluluşumunun indüklenmesinde en çok araştırılan kateşin olan EGCG'den daha etkili olmuştur. Araştırmacılar DU145 hücrelerinde 100 μM EGCG'nin bcl-2 ve bax proteinleri üzerindeki etkisini de incelemişler ve önemli bir etkisinin bulunmadığını belirlemişlerdir. Çalışmada ECG ve EC'nin bcl-2 ve bax proteinleri üzerindeki etkisine bakılmamıştır (Chung *et al.* 2001).

Fare oral skuamöz hücreli kanser SCC7 hücre hattında yapılan bir çalışmada ECG'nin farklı konsantrasyonları ile 72 saatlik tedavi sonrasında hücre büyümesi ölçülmüştür. 10 ve 50 μM ECG ile SCC7 hücrelerinin büyümesinin yüksek oranda inhibisyon ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada ECG'nin hücre döngüsü ve apoptozu etkileyip etkilemediği de araştırılmıştır. 50 μM ECG'nin hücre döngüsünü G1 noktasında durdurduğu ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir (Lim *et al.* 2006).

Kanser tedavisinde kemoterapötik ajanların istenmeyen yan etkilerine karşı kateşinlerin olumlu etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda kateşinler ile birlikte kemoterapötik ajanların kombine tedavisi araştırılmıştır. Çalışmalardan birinde Malik vd. (2016) sıçanlarda ECG'nin yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan sisplatinin sebep olduğu akut böbrek hasarının zayıflatılmasındaki etkilerini incelemişlerdir. Sisplatin uygulaması, oksidatif stres oluşturarak sıçan böbrek tübüllerinde pro-apoptotik proteinler bax ve kaspaz-3'ün ekspresyonunu artırmış ve anti-apoptotik protein bcl-2'nin ekspresyonunu azaltmıştır. Buna karşılık, ECG (5 mg/kg) tedavisi, renal tübüllerde bax ve kaspaz-3 ekspresyonunu azaltmış ve bcl-2 ekspresyonunu artırmıştır. Ayrıca, TUNEL testi kullanılarak değerlendirilen apoptozda, sisplatin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ECG ile tedavi edilen sıçanlarda azalmış DNA fragmantasyonu gözlenmiştir. Çalışmadaki bu bulgular ECG tedavisinin renal tübüllerde sisplatin kaynaklı hasarı ve

apoptozu önlediğini göstermiştir (Malik *et al.* 2016). Ayrıca bu çalışma ECG'nin verilen dozda normal hücrelerde apoptotik etkisinin olmadığını doğrulamıştır.

Kanser tedavisinin normal hücreler üzerindeki etkilerinin azaltılması için yapılan bir çalışmada fibroblast hücrelerinde radyoterapinin yan etkileri için EC tedavisi uygulanmıştır. Shin vd. (2014) 20 Gy radyasyon tedavisinden sonra apoptotik yolaklarda önemli olan p-JNK, p38 ve kaspaz-3 ekspresyonunda artış gözlemlemiş ve 100 μM EC tedavisinin, artmış olan p-JNK, p38 ve kaspaz-3'ün ifadesini azalttığını belirlemişlerdir. Bu çalışma da EC'nin, fibroblast hücrelerinde radyasyona bağlı apoptozu inhibe ettiğinden normal hücreler için apoptotik etkisinin olmadığını doğrular niteliktedir (Shin *et al.* 2014).

Literatürde EC ve ECG'nin farklı kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinde çok farklı IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bazı hücre hatlarında EC ve ECG'nin hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları oldukça düşük bulunurken bazı hücre hatlarında düşük değerlere kıyasla yüksek değerler elde edilmiştir. Bu farklılıkların kateşinlerin uygulama süresi ve dozlarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca her kanser hücre tipinin farklı özelliklere sahip olmasından kaynaklı olarak, EC ve ECG uygulamasının çeşitli hücre hatlarını farklı seviyelerde etkileyebileceği muhtemeldir. Literatürü destekler şekilde bizim çalışmamızda da ECG'nin sitotoksik etkisinin EC'den daha fazla olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda HeLa hücrelerinde EC ve ECG'nin, literatürdeki diğer kanser hücre hatlarındaki 72 saatlik IC_{50} değerleriyle karşılaştırıldığında 168,5 μM ve 10,10 μM olarak iyi bir sitotoksisite gösterdiği saptanmıştır.

Kateşin uygulamasının kanser hücre hatlarındaki apoptotik etkileri birçok analiz ve yöntem ile belirlenebilmektedir. Bu tez çalışmasında apoptotik etki, apoptozun en önemli bileşenleri olan bcl-2, bax ve kaspaz-3 proteinlerinin ifadesinin belirlenmesi ile tayin edilmiştir. Bu proteinlerin ifadesinin tespiti için ELISA yöntemi seçilmiştir. Literatürde farklı kanser hücre hatlarında EC ve ECG'nin bcl-2, bax ve kaspaz-3 ifadesine olan etkileri farklı yöntemlerle belirlenmiştir.

Pereyra-Vergara vd. (2020) EC'nin prokaspaz-3 ve bax ekspresyonuna olan etkisini İnsan Apoptoz Antikor Dizi analizi ile belirlemişler ve MDA-MB-231 hücrelerinde prokaspaz-3'ün ve MCF-7 hücrelerinde de bax ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da HeLa hücrelerinde MCF-7 hücrelerinde olduğu gibi bax ifadesinde düşük doz EC uygulamasında artış meydana gelmiş ancak kaspaz-3 ifadesinde belirgin bir artış görülmemiştir. Bu farklılığın hücre hatlarının ve uygulanan dozların farklı olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Granado-Serrano vd. (2007) 1-100 μM 18 saatlik EC uygulamasının HepG2 hücrelerindeki kaspaz-3 ifadesini florometrik analiz ile bax ifadesini ise Western Blot Analizi ile tespit etmişlerdir. Çalışmada kaspaz-3 ifadesinde belirgin bir artış görülmemiş ve bax ifadesinde de herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da HeLa hücrelerine 72 saatlik 16.8 μM ve 1.6 μM EC uygulaması bu çalışmayla tutarlı şekilde kaspaz-3 ifadesinde belirgin bir artışa sebep olmazken bu çalışmadan farklı olarak bax ifadesinde 1.6 μM'lık dozunda az da olsa artış göstermiştir. Bax ifadesindeki farklılığın uygulama süresi ve kanser hücre hattı farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Babich vd. (2005) HSC-2 kanser hücre hattında 18 saat boyunca 150 μM ECG uygulaması HSC-2 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. Çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak kaspaz-3 ifadesinde belirgin bir artış olmaması uygulanan dozun çok daha düşük olmasından kaynaklanıyor olması muhtemeldir.

Ganguly vd. (2005) NCI-H460 hücrelerinde ECG'nin bcl-2 ifadesindeki etkisini Western Blot yöntemi ile belirlemişler ve 24 saatlik ECG tedavisinden sonra bcl-2 ifadesinde azalma olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda kontrole göre 72 saatlik ECG uygulaması sonrasında HeLa hücrelerinin bcl-2 seviyesinde artış görülmüştür. Bu artışın neden kaynaklandığı açıklanamamıştır.

Kim vd. (2012) *Bulnesia sarmienti* bitkisinden elde ettikleri EC'nin SW480 insan kolon kanseri hücre hattındaki 48 saatlik 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlardaki tedavisinde bax ifadesini artırdığı ve bcl-2 ifadesini azalttığını Western Blot analizi ile

belirlemişlerdir. Bax/bcl-2 oranı artmış ve apoptoz indüklenmiştir. Bizim çalışmamızda da HeLa hücrelerine 72 saatlik EC tedavisinde bax miktarında belirgin bir artış görülmemiş ve bcl-2 miktarında artış meydana gelmiştir. Bax/bcl-2 oranında kontrole göre azalma olmasından dolayı apoptoz indüksiyonu görülmemiştir. Bax miktarındaki belirgin olmayan artış kullanılan dozlardan kaynaklıyor olabilirken bcl-2 miktarındaki artışın sebebi açıklanamamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Birçok kanser araştırmasında çok çeşitli fitokimyasallar kullanılmış ve antikanser özellikleri *in vitro* ve i*n vivo* olarak gösterilmiştir. Kanser hücreleri üzerinde seçici sitotoksisite gösterdikleri ve hücrelerde apoptoz indüksiyonu sağladıkları belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında da servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde birçok bitkide bulunan ve yeşil çayın ana antioksidan kaynağı olan kateşinlerden, Epikateşin ve Epikateşin gallat'ın sitotoksik ve apoptotik etkisi incelenmiştir. Yapılan literatür taramasında EC ve ECG'nin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin gösterildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında ECG'nin HeLa hücrelerinde bcl-2 ifadesini artırmasına rağmen bax ifadesini de artırması sebebiyle bax/bcl-2 oranının kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu oran kontrol grubunda 1,51 olarak hesaplanırken 72 saat 1 µM ve 0.1 µM ECG uygulamasından sonra sırasıyla 1,74 ve 1,71 olarak hesaplanmıştır. Aynı süre ve dozlarda ECG, kaspaz-3 ifadesini ise kontrole göre artırdığı ancak bu artışın belirgin olmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar ECG'nin uyguladığımız dozlarının HeLa hücrelerinde apoptozu az da olsa indüklediğini göstermiştir.

EC uygulamasında ise HeLa hücrelerinde 1.6 µM'lık düşük dozunda bax ifadesinde az miktarda artış ve 16.8 µM dozunda bax ifadesinde azalma saptanmıştır. Bcl-2 ifadesinde iki dozda da artış görülmüş ve bax'ın artışından daha fazla olmasından dolayı bax/bcl-2 oranı kontrol grubuna göre daha az olarak belirlenmiştir. Kaspaz-3 ifadesinde ise EC'nin 1.6 µM'lık düşük dozunda hafif bir artış görülürken 16.8 µM'lık daha yüksek dozunda azalma görülmüştür. Bu nedenle EC'nin uyguladığımız dozlarının HeLa hücrelerinde apoptozu indüklemediği sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışmasında EC ve ECG'nin HeLa hücrelerinin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonları olan 72 saatlik IC_{50} değerleri literatürdeki farklı kanser hücre hatlarına kıyasla daha düşük değerlerde tespit edilmiştir. Bu değerler sonucunda EC ve özellikle ECG'nin HeLa hücreleri üzerinde dikkate değer bir sitotoksisite gösterdiği belirlenmiştir.

EC ve ECG'nin HeLa servikal kanser hücreleri üzerindeki önemli sitotoksik etkileri ile gelecekte yapılabilecek çalışmaları teşvik eder nitelikte olduğunu düşünülmektedir. EC ve ECG'nin sitotoksik ve apoptotik etki mekanizması farklı apoptotik yolakların ve bileşenlerin araştırılmasıyla aydınlatılabilir. Servikal kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlarla kombine olarak EC ve/veya ECG tedavisinin HeLa hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Akşit, H., & Bildik, A. 2008. Apoptozis. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(1), 55-63.

Avcı, G.A., Bozdayı, G. 2013. Human Papillomavirus. Kafkas Journal of Medical Sciences. 3(3):136–144

Babich, H., Krupka, M.E., Nissim, H.A., Zuckerbraun, H.L. 2005. Differential *in vitro* cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. Toxicology In Vitro, 19 pp. 231-242

Baek, S. J., Kim, J. S., Jackson, F. R., Eling, T. E., McEntee, M. F., & Lee, S. H. 2004. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. Carcinogenesis, 25(12), 2425-2432.

Bakır, Ö. 2020. Sekonder metabolitler ve rolleri. Uluslararası Anadolu Ziraat Mühendisliği Bilimleri Dergisi, 2(4), 39-45.

Balasubramaniam, S. D., Balakrishnan, V., Oon, C. E., & Kaur, G. 2019. Key molecular events in cervical cancer development. Medicina, 55(7), 384.

Batra, P., & Sharma, A. K. 2013. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. 3 Biotech, 3(6), 439-459.

Benchimol, S. 2001. p53-dependent pathways of apoptosis. Cell death and differentiation, 8(11), 1049-1051.

Birman, H. 2012. Bitkisel Flavonoid Bileşiklerinin Biyoaktiviteleri Ve Muhtemel Etki Mekanizmaları-Bıoactıvıtıes Of Plant Flavonoıds And The Possıble Actıon Mechanısms. Journal of Istanbul Faculty of Medicine, 75(3), 46-49.

Bogenrieder, T., Herlyn, M. 2003. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. Oncogene 22, 6524–6536.

Braicu, C., Pilecki, V., Balacescu, O., Irimie, A., & Berindan Neagoe, I. 2011. The relationships between biological activities and structure of flavan-3-ols. International Journal of Molecular Sciences, 12(12), 9342-9353.

Brunelle, J. K., & Letai, A. 2009. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. Journal of Cell Science, 122(4), 437-441.

Cancer Education and Research Institute, 2013. Web Sitesi. https://www.canceredinstitute.org/serviks-kanseri.html. Erişim Tarihi: 20.10.2022

Chumduri, C., Gurumurthy, R. K., Berger, H., Dietrich, O., Kumar, N., Koster, S., ... & Meyer, T. F. 2021. Opposing Wnt signals regulate cervical squamocolumnar homeostasis and emergence of metaplasia. Nature Cell Biology, 23(2), 184-197.

Chung, L. Y., Cheung, T. C., Kong, S. K., Fung, K. P., Choy, Y. M., Chan, Z. Y., & Kwok, T. T. 2001. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. Life Sciences, 68(10), 1207-1214.

Cooper, D. B., & McCathran, C. E. 2021. Cervical Dysplasia. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

Coşkun, G., & Özgür, H. 2011. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 20(3), 145-158.

Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. Molecular Aspects of Medicine, 31(6), 446-467.

Çelik, S. A., & Ayran, İ. 2020. Antioksidan Kaynağı Olarak Bazı Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 13(2), 115-125.

Demirezer, L.Ö. 2010. Bitkilerin Tıpta Kullanılması Konusundaki Sorumluluklarımız. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu 5-6 Haziran 2010 Zeytinburnu/İstanbul Bildiri Kitabı, s: 87-88.

Dinçel, G. Ç., & Kul, O. 2016. Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri. Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(1), 86-108.

Elmas, C., & Gezer, C. 2019. Çay Bitkisinin (Camellia sinensis) Bileşimi ve Sağlık Etkileri. Akademik Gıda, 17(3), 417-428.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic Pathology, 35(4), 495-516.

Eröz, R. , Karataş, A. , Alkoç, O. A. , Baltacı, D. , Oktay, M., Çolakoğlu, S. & Eröz, R. 2012. Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması). Duzce Medical Journal, 14 (2), 87-101 .

Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., & Casati, P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Frontiers in Plant Science, 3, 222.

Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H., Salhab, H.A., Fares, Y. 2020. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. Signal Transduction and Targeted Therapy 5, 28.

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., & De Laurenzi, V. 2012. Role of apoptosis in disease. Aging (Albany NY), 4(5), 330.

Fouad, Y. A., & Aanei, C. 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. American Journal of Cancer Research, 7(5), 1016.

Ganguly C, Saha P, Panda CK, Das S. 2005. Inhibition of growth, induction of apoptosis and alteration of gene expression by tea polyphenols in the highly metastatic human lung cancer cell line NCI-H460. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. Jul-Sep;6(3):326-31.

GLOBOCAN, 2020. Web Sitesi. https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf. Erişim Tarihi: 09.11.2022

Gökhan, A., Kılıç, K. D., Gülle, K., Uyanıkgil, Y., & Çavuşoğlu, T. 2020. Apoptotik Yolaklar Ve Hedefe Yönelik Tedaviler. Medical Journal of Suleyman Demirel University, 27(4).

Granado-Serrano, A. B., Angeles Martín, M., Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., Bravo, L., & Ramos, S. 2007. Molecular mechanisms of (−)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(5), 2020-2027.

Gupta, S. C., Kunnumakkara, A. B., Aggarwal, S., & Aggarwal, B. B. 2018. Inflammation, a double-edge sword for cancer and other age-related diseases. Frontiers in Immunology, 2160.

Gübür, S. 2015. Basit Karbonhidrat İçeriği Yüksek Diyetle Beslenen Sıçanlarda Yeşil Çayın Antioksidan Etkisinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Başkent Üniversitesi.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. Cell, 100(1), 57-70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144(5), 646-674.

Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., & Haupt, Y. 2003. Apoptosis-the p53 network. Journal of Cell Science, 116(20), 4077-4085.

Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., & de Pascual-Teresa, S. 2010. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. Food Chemistry, 121(3), 691-696.

Hoppe-Seyler, K., Bossler, F., Braun, J. A., Herrmann, A. L., & Hoppe-Seyler, F. 2018. The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets. Trends in Microbiology, 26(2), 158-168.

Hosseinimehr, SJ., Rostamnejad, M., Ghaffari-rad, V. 2013. Epicatechin enhances anti-proliferative effect of bleomycin in ovarian cancer cell. Research in Molecular Medicine. 1:24–27

Human Papilloma Virus Official TR Website, 2013. Web Sitesi. https://hpv.com.tr. Erişim Tarihi: 22.10.2022

Human Papilloma Virus Official TR Website, 2013. Web Sitesi. https://hpv.com.tr/rahim-agzi-kanseri-serviks-kanseri-nin-hucresel-tipleri-nelerdir-aralarinda-ne-fark-vardir. Erişim Tarihi: 22.10.2022

Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. 2019. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. Herbal Medicine, 1, 13.

IARC, 2020. Web Sitesi. https://gco.iarc.fr. Erişim Tarihi: 17.10.2022

Isemura, M. 2019. Catechin in human health and disease. Molecules, 24(3), 528.

Jiang, M., Qi, L., Li, L., & Li, Y. 2020. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. Cell Death Discovery, 6(1), 1-11.

Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. 2014. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2(7), 377-392.

Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. 2016. Serbest radikaller. Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute, 4(1).

Karabulut, G., & Yemiş, O. 2019. Fenolik Bileşiklerin Bağlı Formları ve Biyoyararlılığı. Akademik Gıda, 17(4), 526-537.

Kim, D., Mollah, M. L., & Kim, K. 2012. Induction of apoptosis of SW480 human colon cancer cells by (−)-epicatechin isolated from *Bulnesia sarmienti*. Anticancer Research, 32(12), 5353-5361.

Kim, J. M., & Heo, H. J. 2022. The roles of catechins in regulation of systemic inflammation. Food Science and Biotechnology, 1-14.

Koca, N., & Karadeniz, F. 2003. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. Gıda Mühendisliği Dergisi, 16, 32-37.

Koçyiğit, A., & Selek, S. 2016. Eksojen Antioksidanlar İki Yönü Keskin Kılıçlardır. Bezmialem Science, 4(2), 70-75.

Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. 2020. Flavonoids as anticancer agents. Nutrients, 12(2), 457.

Kumar, S., & Pandey, A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. The Scientific World Journal, 2013.

Kurbitz C, Heise D, Redmer T, Goumas F, Arlt A, Lemke J, Rimbach G, Kalthoff H, Trauzold A. 2011. Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. Cancer Science, 102:728–34.

Labi, V., & Erlacher, M. 2015. How cell death shapes cancer. Cell Death & Disease, 6(3), e1675-e1675.

Li, Z., Feng, C., Dong, H., Jin, W., Zhang, W., Zhan, J., & Wang, S. 2022. Health promoting activities and corresponding mechanism of (–)-epicatechin-3-gallate. Food Science and Human Wellness, 11(3), 568-578.

Lim, Y. C., Lee, S. H., Song, M. H., Yamaguchi, K., Yoon, J. H., Choi, E. C., & Baek, S. J. 2006. Growth inhibition and apoptosis by (−)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. European Journal of Cancer, 42(18), 3260-3266.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews, 4(8), 118.

Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S., ... & Sansalone, S. 2014. The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. BioMed Research International, 2014.

Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A., & Hutchins, G. M. 2009. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 133(9), 1463-1467.

Malik, S., Suchal, K., Bhatia, J., Gamad, N., Dinda, A. K., Gupta, Y. K., & Arya, D. S. 2016. Molecular mechanisms underlying attenuation of cisplatin-induced acute kidney injury by epicatechin gallate. Laboratory Investigation, 96(8), 853-861.

Mandel, S., & Youdim, M. B. 2004. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. Free Radical Biology and Medicine, 37(3), 304-317.

Miquel, C., Borrini, F., Grandjouan, S., Aupérin, A., Viguier, J., Velasco, V., ... & Sabourin, J. C. 2005. Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. American Journal of Clinical Pathology, 123(4), 562-570.

Molinari, M. 2000. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. Cell Proliferation, 33(5), 261-274.

Motoyama, S., Ladines-Llave, C. A., Luis Villanueva, S., & Maruo, T. 2004. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. Kobe Journal of Medical Sciences, 50(1-2), 9-19.

Muhsiroğlu, Ö. 2017. Flavonoller, Kardiyovasküler/Serebrovasküler Hastalıklar ve Kanser. Beslenme ve Diyet Dergisi, 45(2), 178-184.

Mutha, R. E., Tatiya, A. U., & Surana, S. J. 2021. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 7(1), 1-13.

National Cancer Institute, Web Sitesi. https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer. Erişim Tarihi: 10.10.2022

Nishiumi, S., Miyamoto, S., Kawabata, K., Ohnishi, K., Mukai, R., Murakami, A., ... & Terao, J. 2011. Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. Frontiers Bioscience, 3(3), 1332-1362.

O'Brien, M. A., & Kirby, R. 2008. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, 18(6), 572-585.

Ognjanovic, S., Hainaut, P. 2010. 14.19 - Inflammation in Carcinogenesis, Editor(s): Charlene A. McQueen, Comprehensive Toxicology (Second Edition), Elsevier, Pages 401-415.

Olusola, P., Banerjee, H.N., Philley, J.V., Dasgupta, S. 2019. Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer and Health Disparities. Cells, 8(6);622.

Papież, M. A., Baran, J., Bukowska-Straková, K., & Wiczkowski, W. 2010. Antileukemic action of (−)-epicatechin in the spleen of rats with acute myeloid leukemia. Food and Chemical Toxicology, 48(12), 3391-3397.

Pereyra-Vergara, F.; Olivares-Corichi, I.M.; Perez-Ruiz, A.G.; Luna-Arias, J.P.; García-Sánchez, J.R. 2020.Apoptosis Induced by (−)-Epicatechin in Human Breast Cancer Cells is Mediated by Reactive Oxygen Species. Molecules, 25, 1020.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. International Journal of Biomedical Science: IJBS, 4(2), 89.

Pistritto G, Trisciuoglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. Aging (Albany NY). 2016 Apr;8(4):603-19.

Pu, X., Storr, S. J., Zhang, Y., Rakha, E. A., Green, A. R., Ellis, I. O., & Martin, S. G. 2017. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. Apoptosis, 22(3), 357-368.

Rahman, N., Khan, H., Zia, A., Khan, A., Fakhri, S., Aschner, M., ... & Saso, L. 2021. Bcl-2 Modulation in p53 Signaling Pathway by Flavonoids: A Potential Strategy towards the Treatment of Cancer. International Journal of Molecular Sciences, 22(21), 11315.

Ramos, S., Alía, M., Bravo, L., & Goya, L. 2005. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(4), 1271-1280.

Ravindranath MH, Saravanan TS, Monteclaro CC, Presser N, Ye X, Selvan SR and Brosman S. 2006. Epicatechins purified from green tea (*Camellia sinensis*) differentially suppress growth of gender-dependent human cancer cell lines. Evid Based Complement Alternat Med 3, 237-247.

Ravindranath, M. H., Ramasamy, V., Moon, S., Ruiz, C., & Muthugounder, S. 2009. Differential growth suppression of human melanoma cells by tea (*Camellia sinensis*) epicatechins (ECG, EGC and EGCG). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 6(4), 523-530.

Sabuncuoğlu, S. & Özgüneş, H. 2011. Kemoterapi, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy, (2) , 137-150.

Sawyers, C. L., Abate-Shen, C., Anderson, K. C., Barker, A., Baselga, J., Berger, N. A., ... & Weiner, G. J. 2013. AACR cancer progress report 2013. Clinical Cancer Research, 19(20_Supplement), S1-S98.

Seoud, M., Tjalma, W. A., & Ronsse, V. 2011. Cervical adenocarcinoma: moving towards better prevention. Vaccine, 29(49), 9148-9158.

Shin, H. A., Shin, Y. S., Kang, S. U., Kim, J. H., Oh, Y. T., Park, K. H., ... & Kim, C. H. 2014. Radioprotective effect of epicatechin in cultured human fibroblasts and zebrafish. Journal of Radiation Research, 55(1), 32-40.

Shirakami, Y., & Shimizu, M. 2018. Possible mechanisms of green tea and its constituents against cancer. Molecules, 23(9), 2284.

Singh, B. N., Shankar, S., & Srivastava, R. K. 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. Biochemical Pharmacology, 82(12), 1807-1821.

Speidel, D. 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. Trends in Cell Biology, 20(1), 14-24.

Suganuma, M., Okabe, S., Kai, Y., Sueoka, N., Sueoka, E., & Fujiki, H. 1999. Synergistic effects of (−)-epigallocatechin gallate with (−)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancercell line PC-9. Cancer Research, 59(1), 44-47.

Suganuma, M, Takahashi, A, Watanabe, T, Iida, K, Matsuzaki, T, Yoshikawa, HY, Fujiki, H. 2016. Biophysical Approach to Mechanisms of Cancer Prevention and Treatment with Green Tea Catechins. Molecules. 21(11):1566.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(3), 209-249.

Tokur, O., & Aksoy, A. 2017. *In vitro* sitotoksisite testleri. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 6(1), 112-118.

Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. Medicines, 5(3), 93.

Ulukaya, E. 2001. Akciğer Kanserleri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar: Hücre Siklusu ve Apoptozis. Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul.

Unno, K., Pervin, M., Nakagawa, A., Iguchi, K., Hara, A., Takagaki, A., ... & Nakamura, Y. 2017. Blood–Brain Barrier Permeability of Green Tea Catechin Metabolites and

their Neuritogenic Activity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. Molecular Nutrition & Food Research, 61(12), 1700294.

Ursano, RJ. 2014. Science Calls Her HeLa. Psychiatry, 75/2: 101–102

Ünsal, Ç. Z., & Büken, N. Ö. 2018. Henrietta Lacks' in Ölümsüzlüğü: Tıp Tarihinin Gılgamış Destanı. Turkish Journal of Life Sciences, 3(2), 248-254.

Valastyan, S., Weinberg, R. A. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. Cell 147, 275–292.

Velu, G., Palanichamy, V., & Rajan, A. P. 2018. Phytochemical and pharmacological importance of plant secondary metabolites in modern medicine. In Bioorganic phase in natural food: an overview (pp. 135-156). Springer, Cham.

Volkova, L. V., Pashov, A. I. & Omelchuk, N. N. 2021. Cervical carcinoma: Oncobiology and biomarkers. International Journal of Molecular Sciences, 22(22), 12571.

Waggoner, S.E., 2003. Cervical cancer. Lancet, 361(9376);2217-2225

Wong, R. S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 30(1), 1-14.

Xu, J., Xu, Z. & Zheng, W. 2017. A review of the antiviral role of green tea catechins. Molecules, 22(8), 1337.

Yıldırım, D., Gökaslan, H. 2015. Serviks kanseri taramasında HPV DNA testinin yeri. Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi, 1;1–6.

Yipel, M., İlhan, A., Tekeli, İ. O., Kırgız, F. C., Türk, E., Emiroğlu, S. B. 2020. İlaçlarla Etkileşim Potansiyeline Sahip Hayvan Sağlığında da Kullanılan Tıbbi Bitkiler. Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 11 (1), 13-26.

Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü. 2012. Kanser biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, (1), 7-18.

Zaveri, N. T. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. Life Sciences, 78(18), 2073-2080.

Web Sitesi. https://www.drozdogan.com. Erişim Tarihi: 17.10.2022

Web Sitesi. https://www.drozdogan.com/rahim-agzi-kanseri-belirtileri-ve-tedavisi/. Erişim Tarihi: 23.10.2022

Web Sitesi. https://nursekey.com/24-cervical-screening-test. Erişim Tarihi: 13.10.2022

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Hilal Gökçe NALBANTOĞLU

Eğitim

Yüksek Lisans:	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-2023
Lisans :	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014-2018
Ön Lisans :	Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü	2018-2020