AYÇA ÜVEZ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MANGİFERİN VE PAKLİTAKSEL KOMBİNASYONUNUN EHRLİCH ASCİTES CARCİNOMA ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO VE İN VİVO YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

AYÇA ÜVEZ

DANIŞMAN
PROF. DR. ELİF İLKAY ARMUTAK

II. DANIŞMAN
PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ayça ÜVEZ

(İmza)

İTHAF

09.07.2016 yılında kaybettiğimiz köpeğim Laila'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora tezim süresince bilgi ve desteğini esirgemeden her konuda beni cesaretlendiren ve çalışma imkânı sunan, en stresli dönemlerinde bile sorularımı cevapsız bırakmayan, en önemlisi de bana her zaman ailesinden bir üye gibi yaklaşan, beraber üzülüp beraber sevindiğim tüm yaşamım boyunca her daim desteğini hissedeceğim, değerli tez danışmanım Prof. Dr. Elif İlkay ARMUTAK'a

Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ab.D'da doktora çalışmalarım süresince hem bilimsel hem de laboratuvar imkanları açısından desteklerini esirgemeyen, tezime bir çok katkı sağlayan ikinci tez danışmanım İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dekanı ve Moleküler Kanser Araştırma Merkezi Müdürü Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Doktora sürecimin en zor aşamalarında manevi desteğini benden esirgemeyen hem bilimsel anlamda hem de hayata dair kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Dr. Dr. Öğr. Üyesi Altan ARMUTAK'a,

Doktora çalışmalarım süresince bilimsel açısından desteklerini esirgemeden her zorlu aşamayı atlatmamda yardımcı olan en büyük destekçilerimden değerli hocam Doç. Dr. Ebru GÜREL-GÜREVİN'e,

Doktora çalışmalarım sırasında deneyimlerini benimle paylaşan, deneylerim sürecince her konuda yardımcı olan ayrıca dostluğuyla hayatımda önemli rol sahibi olan güzel kalpli arkadaşım Dr. Şeyma AYDINLIK'a, gerek doktora deneylerim gerekse doktora tez sürecimce beni hiç yalnız bırakmayan ve desteğini esirgemeyen, varlığıyla beni şanslı hissettiren Dr. Öğr. Üyesi İsmet Burcu TÜRKYILMAZ, Araş. Gör. Dr. O. B. Burak ESENER'e ve Şima KILIÇ'a,

En zorlu dönemlerimde her koşulda manevi desteğini benden esirgemeyen ve her zaman yanımda hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Ceyda ÜVEZ'e,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen her zaman yanımda oldukları için kendimi çok şanslı hissettiğim, eğitim hayatı yolculuğumda başarılı olabilmem için elinden gelen her türlü imkanı bana sunan, bütün stresli dönemleri atlatmamda bana her zaman yardımcı olan, başarılarımın arkasındaki asıl kahramanlar Annem, Babam ve Abim'e çok teşekkür ederim.

Anjiyogenez çalışmamda kullandığım döllenmiş yumurtaların teminini sağladığım Mudurnu Piliç- Pak Tavuk Gıda San. Ve Tic. A. Ş.'den Arife hanım'a ve yöneticilerine çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-26107.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XVİ
ÖZET XX
ABSTRACT ..... XXİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Kanser 3
2.2. Deneysel Tümör Modelleri 5
2.2.1. Ehrlich Deneysel Tümör Modeli 5
2.3. Kemoterapi 6
2.3.1. Paklitaksel 7
2.4. Mangiferin 8
2.5. Apoptozis 10
2.5.1. Apoptozisin Mekanizması 12
2.5.1.1. Dışsal (Ekstrinsik) Yolak 13
2.5.1.2. İçsel (İntrinsik / Mitokondriyal) Yolak 14
2.5.1.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis 14
2.5.2. Kaspazların Apoptozisteki Rolü 15
2.5.2.1. Kaspazların sınıflandırılması: 16
2.5.3. Bcl-2 Ailesinin Apoptozisteki Rolü 17
2.5.3.1. Bid Proteini ile Aktive Olan Bak 17
2.5.3.2. Bad Proteini ile Aktive Olan Bax 18
2.6. Otofaji 18
2.6.1. Otofaji Tipleri 19
2.6.1.1. Makrootofaji 19

2.6.1.2. Mikrootofaji 20
2.6.1.3. Şaperon Aracılıklı Otofaji 20
2.6.2. Otofajinin Basamakları 20
2.6.2.1. Atg1-Atg13-Atg17 Kinaz Kompleksi (Otofajinin Tetiklenmesi) 21
2.6.2.2. Sınıf III PI3K Kompleksi (Vezikül Nükleasyonu) 21
2.6.2.3. ATG12 ve Atg8 Ubikitin Benzeri Sistem (Vezikül Uzama Fazı) 22
2.6.2.3.1. Atg12 Ubikitin Benzeri Sistem 22
2.6.2.3.2. Atg8 Ubikitin Benzeri Sistem (LC3-PE Konjugasyon Sistemi) 22
2.6.2.3.3. Atg9 ve Döngü Sistemi 22
2.6.2.4. Lizozomla Birleşme ve Yıkım Fazı 23
2.7. Hücre Sağkalım Yolağı 23
2.7.1. Fosfatidil İnositol 3 Kinaz (PI3K /Akt) Yolağı 23
2.7.2. MAPK (Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz) Yolağı 24
2.8. Anjiyogenez 24
3. GEREÇ VE YÖNTEM 27
3.1. Materyal 27
3.1.1. Kimyasal Malzemeler 27
3.1.2. Sarf Malzemeler 29
3.1.3. Cihazlar 29
3.1.4. Deney Hayvanları 30
3.2. Metot 31
3.2.1. İn vitro Çalışmalar 31
3.2.1.1.Hücre Kültürü 31
3.2.1.1.1. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması 31
3.2.1.1.2. Hücre soylarının Stoktan Çıkartılması 31
3.2.1.1.3. Hücre Soylarının Pasajlanması 31
3.2.1.1.4. Hücre Stoklanması 32
3.2.1.1.5. Hücrelerin Sayımı 32
3.2.1.2. ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu 33
3.2.1.3. Western Blot Metodu 34
3.2.1.3.1. Western Blot Analizleri için Protein İzolasyonu 35
3.2.1.3.2. Proteinlerin Biçinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi 35

3.2.1.3.3. SDS-PAGE ve Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması.....35
3.2.1.3.4. Membranların Bloklanması ve Antikor Eklenmesi 36
3.2.1.3.4.1. Bloklama 36
3.2.1.3.4.2. Birincil Antikor 36
3.2.1.3.4.3. İkincil Antikor:.....36
3.2.1.3.4.4. Görüntüleme.....36
3.2.1.3.4.5. Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması 37
3.2.1.4. HUVEC Tüp Formasyon Testi.....37
3.2.1.4.1. Hücre Kültürü Kaplarına Matrijelin Yerleştirilmesi 37
3.2.1.4.2. Besiyerleri, Hücreler ve Maddelerin Hazırlanması.....37
3.2.2. *In vivo* Çalışmalar 38
3.2.2.1. Ehrlich Asit Solid Tümör Oluşturma Modeli.....38
3.2.2.1.1. Histolojik İnceleme 40
3.2.2.1.2. İmmünohistokimyasal İnceleme 40
3.2.2.1.2.1. Streptavidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (StrepABC) Yöntemi 40
3.2.2.1.2.1.1. Deparafinizasyon ve Dehidrasyon Uygulaması.....40
3.2.2.1.2.1.2. Antijen İyileştirme Uygulaması 40
3.2.2.1.2.1.3. Hücre Permeambilizasyonunu Arttırma Uygulaması 41
3.2.2.1.2.1.4. Endojen Peroksit Blokaj uygulaması 41
3.2.2.1.2.1.5. Bloklayıcı Serum Uygulaması 41
3.2.2.1.2.1.6. Primer Antikor uygulaması ve inkübasyon.....41
3.2.2.1.2.1.7. Sekonder Antikor Uygulaması.....41
3.2.2.1.2.1.8. Kromojen Substrat ile Reaksiyonun Gözlenmesi 42
3.2.2.1.2.1.9. Zıt boyama ve Kesitlerin Su Bazlı Kapatıcıyla Kapatılması 42
3.2.2.1.3. DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi (TUNEL Yöntemi) 42
3.2.2.1.3.1. Deparafinizasyon ve Dehidrasyon 42
3.2.2.1.3.2. Antijen Retrieval Uygulaması.....43
3.2.2.1.3.3. Endojen Peroksit Blokaj Uygulaması 43
3.2.2.1.3.4. Dengeleme Tamponu ve TdT Enzimi Uygulaması ve Enzimin Durdurulması 43
3.2.2.1.3.5. Anti-digoksigenin Uygulaması 43
3.2.2.1.3.6. Kromojen Substrat ile Reaksiyonun Gözlenmesi 43
3.2.2.1.3.7. Zıt boyama ve Kesitlerin Entellan İle Kapatılması 43

3.2.2.1.4. H-Skor ve Apoptotik İndeksin Hesaplanması....44
3.2.2.1.4.1. İndeksin (%) Hesaplanması....44
3.2.2.1.4.2. Histolojik Skor (H-Skor)'un Hesaplanması....44
3.2.2.1.5. İstatistiksel Analiz....44
3.2.2.2. CAM (Civciv Koryoallantaoik Membran) Yöntemi....45
3.2.2.2.1. Uygulanan Madde Dozları ve Agar İçerisinde Hazırlanışı....46
3.2.2.2.2. Yumurtaların İnkübatöre Yerleştirilmesi....46
3.2.2.2.3. Yumurtalardan Albümin Çekilmesi ve Açılması....47
3.2.2.2.4. CAM Üzerine Numunelerin Uygulanması....47
3.2.2.2.5. Antianjiyogenik Etkinin Değerlendirilmesi ve Skorlama....48
3.2.2.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi....48
3.2.2.2.7. İstatistiksel Analiz....48
4. BULGULAR....50
4.1. *İn Vitro* Bulgular....50
4.1.1. ATP Canlılık Testi Bulguları....50
4.1.1.1. EAC Canlılık Testi Bulguları....50
4.1.1.2. HUVEC Canlılık Testi Bulguları....52
4.1.2. Western Blot Bulguları....54
4.1.2.1. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonunun Apoptozis Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Gösterilmesi....54
4.1.2.2. Paklitaksel, Mangiferin ve Kombinasyonunun Otofaji Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Gösterilmesi....56
4.1.2.3. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonunun Sağkalım Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Gösterilmesi....57
4.1.3. Tüp Formasyon Testi Bulguları....57
4.2. *İn Vivo* Bulgular....64
4.2.1. Deneysel EAC Modeli Bulguları....64
4.2.1.1. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyon Gruplarına Ait Canlı Ağırlık ve Tümör Ağırlığı Değişimleri....64
4.2.1.2. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Tümör Volümü Üzerine Etkisi....66
4.2.1.3. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarına ait tümör dokularına ait histolojik inceleme....67

4.2.1.4. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Hücre Proliferasyon, Apoptozis, Otofaji ve Sağkalım Üzerine Etkisi 68
4.2.1.4.1. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....68
4.2.1.4.1.1. PCNA İndeks (%) Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular.....68
4.2.1.4.2. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Apoptozis Üzerine Etkisi 71
4.2.1.4.2.1. Aktif Kaspaz 3'ün Apoptotik Indeks (%) Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular 71
4.2.1.4.2.2. Kırılmış PARP'a Ait Apoptotik İndeks (%) Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular 74
4.2.1.4.2.3. BAX'a Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular.....77
4.2.1.4.2.4. TUNEL Tekniği Kullanılarak Apoptotik Indeks (%) Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular 80
4.2.1.4.3. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Otofaji Üzerine Etkisi ..83
4.2.1.4.3.1. LC3A'ya ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular 83
4.2.1.4.3.2. LC3B'ye Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular.....86
4.2.1.4.3.3. Atg5'e Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular 89
4.2.1.4.3.4. p62'ye Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular 92
4.2.1.4.4. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Sağkalım Yolağı Üzerine Etkisi 95
4.2.1.4.4.1. p-AKT'e Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular.....95
4.2.1.4.4.2. PTEN'e Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular 98
4.2.2. Koryoallantoyik Membran (CAM) Testi Bulguları 101
5. TARTIŞMA 104
KAYNAKLAR 128
HAM VERİLER 148
FORMLAR 149
ETİK KURUL KARARI 150
PATENT HAKKI İZNİ 152
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....153
ÖZGEÇMİŞ 154

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Deney grupları ve her gruba ait birey sayısı. 39
Tablo 3-2: CAM deneyinde uygulanan tüm dozlar ve konsantrasyonları. 47
Tablo 3-3: CAM Üzerinde Anjiyogenik Etkinin Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Skor Değerleri..... 48
Tablo 4-1: EAC hücrelerinde Paklitaksel ve Mangiferin'in ATP canlılık testi sonuçlarına göre 48 saat tedavi süresindeki IC50 ortalama±standart sapma değerleri. 50
Tablo 4-2: HUVEC hücrelerinde Paklitaksel ve Mangiferin'in ATP canlılık testi sonuçlarına göre 48 saat tedavi süresindeki IC_{50} ortalama±standart sapma değerleri. 52
Tablo 4-3: Tüm gruplarda tümör ağırlığı (g) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri. 65
Tablo 4-4: Tüm gruplara ait tümör volümü değerleri..... 66
Tablo 4-5: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde PCNA indeks (%) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri..... 69
Tablo 4-6: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde aktif kaspaz-3 İndeks (%) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri. 72
Tablo 4-7: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde kırılmış PARP indeks (%) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri..... 75
Tablo 4-8: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde BAX (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri. 78
Tablo 4-9: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde TUNEL yöntemi ile apoptotik indeks (%) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri..... 81
Tablo 4-10: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde LC3A (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri. 84
Tablo 4-11: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde LC3B (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri. 87
Tablo 4-12: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde Atg5 (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri. 90
Tablo 4-13: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde p62 (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri. 93
Tablo 4-14: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde p-AKT (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri. 96
Tablo 4-15: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde PTEN (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri. 99

Tablo 4-16: CAM testinde Mangiferin, Paklitaksel ve kombinasyonlarının antianjiyogenik etkileri. 102

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kanser oluşumu (https://www.drozdogan.com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec/)..... 4
Şekil 2-2: Paklitaksel bileşiğinin yapısı (https://en.wikipedia.org/wiki/Paclitaxel). 7
Şekil 2-3: Mangiferin bileşiğinin yapısı. https://www.sigmaaldrich.com..... 9
Şekil 2-4: Mangiferinin genel özellikleri 10
Şekil 2-5: Nekroz ve apoptozis (Galluzzi ve ark., 2012)..... 11
Şekil 2-6:Dışsal (A) ve içsel (B) apoptozis yolakları. Her iki mekanizma da kaspaz aktivasyonuna yol açar (Li ve Sheng, 2012)..... 12
Şekil 2-7: Dışsal apoptozis yolağı (Ashkenazi, 2008)..... 13
Şekil 2-8: Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis. (Köse ve ark., 2017). 15
Şekil 2-9: Kaspaz aktivasyon yolağı (Taylor ve ark., 2008). 16
Şekil 2-10: Otofajinin farklı tipleri (Mizushima ve ark., 2008; Karadağ, 2016). 19
Şekil 2-11: Makrootofaji (Gump ve Thorburn, 2011). 19
Şekil 2-12: Otofajinin basamakları (Meléndez ve Levine, 2009) 21
Şekil 2-13: PI3K-PTEN-Akt yolağı (Molinari ve Frattini, 2013). 23
Şekil 2-14: Anjiyogenez sürecinde rol oynayan hücreler ve salgıladıkları moleküller (Aktaş ve Akbulut, 2014). 25
Şekil 3-1: Lusiferin/lusiferaz biyolüminesans tepkimesi (Anonim 2011'den değiştirilerek alınmıştır)..... 33
Şekil 3-2: Deney akışının günlere göre şematik görünümü. 39
Şekil 3-3: CAM (Civciv Koryoallantaoik Membran) testi protokolü..... 46
Şekil 4-1: EAC tümör hücrelerine ait Paklitaksel, Mangiferin ve kombinasyonlarının ATP sitotoksisite canlılık testi sonuçları. 51
Şekil 4-2: HUVEC hücre soyuna ait Paklitaksel, Mangiferin ve kombinasyonlarının ATP canlılık testi sonuçları. 54
Şekil 4-3: Paklitaksel (3,98 µM), Mangiferin (300µM) ve kombinasyonunun 48 saatlik tedavi sonrası EAC hücrelerinde DR4, FAS, BAX, Parp-1 ekspresyonları üzerine etkisinin western blot yöntemi ile belirlenmesi. 55
Şekil 4-4:Paklitaksel (3,98 µM), Mangiferin (300 µM) ve kombinasyonunun 48 saatlik tedavi sonrası EAC hücrelerindeki p-Beclin, Atg5, LC3A, LC3B ve p62 ekspresyonları üzerine etkisinin western blot yöntemi ile belirlenmesi..... 56
Şekil 4-5: Paklitaksel (3,98 µM), Mangiferin (300 µM) ve kombinasyonunun 48 saatlik tedavi sonrası EAC hücrelerindeki p-SRC, p-AKT, PTEN ve p-c-Jun ekspresyonları üzerine etkisinin western blot yöntemi ile belirlenmesi. 57

Şekil 4-6: 0.-2.-4.-8.-12.-16. saat dilimlerinde, negatif kontrol, talidomit 200 µM, Mangiferin (MNG) 12,5 µM, 25 µM ve 50 µM dozlarının HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yetenekleri üzerine etkisi. 60
Şekil 4-7: 0.-2.-4.-8.-12.-16. saat dilimlerinde, Paklitaksel'in (PTX) 1,99 µM, 3,98 µM, 7,96 µM ve 15, 93 µM konsantrasyonlarının HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yetenekleri üzerine etkisi. 61
Şekil 4-8: 0.-2.-4.-8.-12.-16. saat dilimlerinde, Paklitaksel (PTX) 0,5 µM, 1 µM, 1,99 µM ve 3,98 µM dozlarının, Mangiferin 12,5 µM dozuyla kombinasyonlarının HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yetenekleri üzerine etkisi. 62
Şekil 4-9: 0.-2.-4.-8.-12.-16. saat dilimlerinde, Paklitaksel (PTX) 7,96 µM ve 15,93 µM dozlarının, Mangiferin 12,5 µM dozuyla kombinasyonlarının HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yetenekleri üzerine etkisi..... 63
Şekil 4-10: Deney başlangıcında (0. gün), 7. gün ve deney sonunda (14. gün) tüm gruplara ait farelerden elde edilen ortalama ağırlık değerleri. 64
Şekil 4-11: Tüm gruplara ait tümör ağırlığı (g) değerleri. 65
Şekil 4-12: Tüm gruplara ait tümör volümü (mm^3) değerleri..... 67
Şekil 4-13: Hematoksilen & eosin ile boyanmış EAC tümör dokusu örneği 67
Şekil 4-14: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde PCNA indeks (%) değerleri.... 69
Şekil 4-15: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde, çoğalan hücrelerde nukleus PCNA reaksiyonu (→). 70
Şekil 4-16: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde aktif kaspaz-3 (%) indeks değerleri. 72
Şekil 4-17: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde hücre sitoplazmalarında aktif kaspaz-3 reaksiyonu (→) ile apoptotik hücreler. 73
Şekil 4-18: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde kırılmış PARP indeks (%) değerleri. 75
Şekil 4-19: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde hücrede nukleus kırılmış PARP reaksiyonu (→). 76
Şekil 4-20: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde BAX (H-Skor) değerleri..... 78
Şekil 4-21: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik BAX reaksiyonu.. 79
Şekil 4-22: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde Tunel tekniğine ait apoptotik indeks (%) değerleri..... 81
Şekil 4-23: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde apoptotik hücre nukleuslarında kahverengi TUNEL reaksiyonu (→). 82
Şekil 4-24: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde LC3A (H-Skor) değerleri..... 84
Şekil 4-25: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik LC3A reaksiyonu. 85

Şekil 4-26: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde LC3B (H-Skor) değerleri. 87
Şekil 4-27: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik LC3B reaksiyonu. 88
Şekil 4-28: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde Atg5 (H-Skor) değerleri. 90
Şekil 4-29: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik Atg5 reaksiyonu. . 91
Şekil 4-30: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde p62 (H-Skor) değerleri. 93
Şekil 4-31: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik p62 reaksiyonları. 94
Şekil 4-32: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde p-AKT (H-Skor) değerleri. 96
Şekil 4-33: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik p-AKT reaksiyonu. 97
Şekil 4-34: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde PTEN (H-Skor) değerleri..... 99
Şekil 4-35: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik PTEN reaksiyonu. 100
Şekil 4-36: Civciv koryoallantoik membran (CAM) testi ile farklı konsantrasyonlarda Mangiferin, Paklitaksel ve kombinasyonlarının antianjiyogenik etkilerinin stereomikroskop görüntüleri..... 103

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABC:	ATP bağlayıcı kaset
AIF:	Apoptozis indükleyici faktör
AKT:	Protein kinase B
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive eden faktör
APC:	Adenomatöz polipozis koli
APO-1:	Fotoğraf sisteminin birikimi 1
Atg:	Otofaji ile ilişkili gen (
ATP:	Adenozin trifosfat
AVs:	Otofojik vakuoller
BAD:	Bcl-2-ilişkili ölüm promotoru
BAK:	Bcl-2-ilişkili antagonist/killer
BAX:	Bcl-2-ilişkili X proteini
BCA:	Biçinkoninik asit
BCL-2:	B-Cell Leukemia/Lymphoma 2
Bcl-XL:	B-cell lymphoma-extra large (
BH:	Bcl-2 homoloji bölgeleri
BSA:	Sığır serum albümin
CAD:	Kaspaz aktive edici DNaz
CAM:	Civciv Koryoallantaoik Membran
CARD:	Kaspaz takviye domain
CIN:	Baskın kromozomal instabilite
DIABLO	Düşük PI ile bağlayan IAP-Bağlı protein
DISC:	Ölüm indükleyici sinyal kompleks
DMSO:	Dimetilsulfoksit
DNA:	Deoksi ribonükleik asit
DR-3:	Ölüm reseptörü-3
DR-4:	Ölüm reseptörü-4
DR-4:	Ölüm reseptörü-5
EDTA:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit

EGF:	Epidermal büyüme faktörü
EGFR:	Epidermal büyüme faktör reseptörü
EMT:	Epidermal mezenkimal dönüşüm
EndoG:	Endonükleaz D
ER:	Endoplazmik retikulum
ERK:	Ekstraselüler sinyal düzenleyen kinaz
F-12K:	Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium
FADD:	Fas ilişkili ölüm alanı
FBS:	Fetal sığır serumu
FDA:	Food and Drug Administration
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü
G2/M:	Gap2/mitoz
Grb2:	Büyüme faktörü reseptör protein 2 adaptör protein
GST:	Glutatyon S-transferaz
GTP:	Guanozin trifosfat
HGF:	Hepatosit büyüme faktörü
HIF-1α:	Hipoksi ile uyarılabilir faktör-1α
HNPCC:	Kalıtsal nonpolifozit kolorektal kanser
HSP70:	Isı şok proteini 70
HUVEC:	İnsan umblikal ven endotel hücreleri
ICAD:	Inhibitor of caspase activated DNase
IGF:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-12:	İnterlökin-12
kDa:	KiloDalton
LAMP2A:	Lizozomla İlişkili Membran Proteini Tip 2A
LC3:	Mikrotübül ilişkili protein hafif zincir 3
MAPK:	Mitojen aktive protein kinaz
MEM:	Minimum Esansel Medyum
MMP:	Matriks metalloproteinazları
MMR:	DNA uyuşmazlığı onarım

MNG: Mangiferin

MOMP: Mitokondri dış membran permeabilizasyonu

mTOR: Rapamisin hedefi

NaCl: Sodium chloride

NEAA: Esansiyel olmayan aminoasit

PARP: Poli(ADP-riboz)polimeraz

PBS: Fosfat tuz tamponu

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PE: Fosfotidil etanolamin

PERK: Protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz

PF4: Platelet faktör-4

PGF: Plasental büyüme faktörü

PI: Propidyum iyodür

PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz

PIP2: Fosfatidilinositol (4, 5) bisfosfat

PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfat

PS: Fosfatidil serin

PTEN: Fosfataz ve tensin homolog proteini

PTEN: Prime Time Entertainment Network

PTX: Paklitaksel

Rab7: Ras-ilişkili protein

RNA: Ribo nükleik asit

ROCKI: Rho-associated coiled coil forming kinase I

ROS: Reaktif oksijen türleri

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Smac: İkinci mitokondri türevi kaspaz aktivatörü

TCA: Trikloroasetik asit

TGF: Transforme edici büyüme faktörü

TK:	Tirozin kinaz
TNF:	Tümör nekrozis faktör
TNFR-1:	İlişkili ölüm bölgesi (TRADD)
TRAIL:	TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand
TSP-1/2:	Trombospondin-1/2
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ÖZET

Üvez, Ayça. (2019). Mangiferin ve Paklitaksel Kombinasyonunun Ehrlich Ascites Carcinoma Üzerine Etkisinin *İn Vitro* ve *İn Vivo* Yöntemlerle İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Yüksek Lisans/Doktora Tezi. İstanbul.

Meme kanseri, tüm dünyada en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Son yıllarda kanser tedavisinde çeşitli bileşiklerin, kemoterapötik ajanlar ile kombine edilerek aktivelerinin arttırılması hedeflenmektedir. Bir polifenol olan Mangiferin'in, kanserde önemli bir role sahip olabileceği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) fare meme tümöründe, Mangiferin'in ve Paklitaksel'in tek başına ve kombinasyonlarının, hücre proliferasyonu, apoptozis, otofaji ve sağkalım üzerine etkisinin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, anjiyogenez üzerine etkisi de HUVEC tüp formasyon yöntemi ve *in vivo* CAM modelinde değerlendirilmiştir.

EAC ve HUVEC hücrelerinde Mangiferin (6,25-300 µM) ve Paklitaksel (0,25-15,9 µM) tek başına ve kombinasyonunun etkisi, 48. saat ATP sitotoksisite testi ile değerlendirildi. Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunda apoptozis, otofaji ve sağkalım belirteçleri western blot yöntemi ile belirlendi. HUVEC tüp formasyon testinde Mangiferin (12,5-50 µM), Paklitaksel (1, 99-15,93 µM) ve kombinasyonları uygulanarak 0-16 saat aralığında değerlendirildi. CAM yönteminde ise 12,5-5 mg/ml, Paklitaksel 0,3-0,0375 mg/ml ve kombinasyonları uygulandı. *In vivo* çalışmada 78 adet solid tümörlü dişi Balb/c fareye 25-50-100 mg/kg Mangiferin gavajla, 12,5 mg/kg Paklitaksel subkutan uygulandı ve 14. günde alınan dokularda proliferasyon, apoptozis, otofaji ve sağkalım belirteçleri immünohistokimyasal olarak incelendi, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

ATP testi sonuçlarında sitotoksik etkinin, kombinasyon grubunda doza ve hücre çeşidine bağlı olarak sinerjistik biçimde arttığı görüldü. Western blot sonuçları değerlendirildiğinde, EAC hücrelerinde LC3B'nin yükselmesi ve p62'nin azalması ile FAS ve kırılmış PARP'ın artması, dış yolak üzerinde apoptozisin otofaji varlığında gerçekleştiği ve sağkalım parametrelerinin de baskılandığı görülmüştür. *İn vivo* da *in vitro* sonuçlarına parallelik göstermiş ve tümör büyüklüğü, tümör ağırlığı, apoptozis, otofaji ve sağkalım üzerinde en etkili dozun tek başına Mangiferin 50 mg/kg ve kombinasyonu grubunda olduğu görülmüştür. Mangiferin ve kombinasyonlarının anjiyogenez üzerine etkisinin incelendiği *in vitro* tüp formasyon testinde, tek başına 50 µM dozunun etkili olduğu, CAM sonuçlarında ise kombinasyon yapılan gruplarda daha etkili antianjiyogenik etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, tüm bu bulguların doğrultusunda in vitro ve in vivoda Mangiferin'in doza bağlı olarak, Paklitaksel kombinasyonu ile EAC hücrelerini seçici bir biçimde, otofaji varlığında apoptozisi arttırdığı, proliferasyonu ve sağkalım parametrelerini azalttığı, güçlü bir antianjiyogenik etkiye de sahip olmasıyla tümör büyüklüğünü baskıladığı ilk defa bu tez çalışması ile gösterilmiştir. Mangiferin'in düşük dozları Paklitaksel ile kombine edildiğinde, tek başına olduğundan daha güçlü sinerjik etki göstermektedir. Mangiferin'in özellikle kanser tedavisinde gelecekteki yeni stratejilerin geliştirilmesi için umut vaad edici potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mangiferin, Meme Kanseri, Paklitaksel, Apoptozis, Otofaji.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-26107

ABSTRACT

Uvez, A. (2019). *In vivo* and *In vitro* Investigation of Mangiferin and Paclitaxel combination on Ehrlich Ascites Carcinoma. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Histology and Embryology Ab.D. Doktora Tezi. İstanbul.

Breast cancer is one of the most important causes of death all over the world. Recent years, various compounds to treat cancer is aimed to increase in combination with chemotherapeutic agents activate. Mangiferin is a polyphenol that has been reported may have an important role in cancer. The aim of this study is to investigate in vitro and in vivo effects of Mangiferin and Paclitaxel alone and in combinations of cell proliferation, apoptosis, autophagy and survival pathway on Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) mouse breast tumor. In addition, the effect on angiogenesis was also evaluated in the HUVEC tube formation method and *in vivo* CAM model.

The effect of Mangiferin (6.25-300 μM) and Paclitaxel (0.25-15.9 μM) alone and in combination on EAC and HUVEC cells were assessed at 48th hour by ATP cytotoxicity test. In combination with Mangiferin and Paclitaxel, apoptosis, autophagy, and survival markers were determined by western blot method. The effect of Mangiferin (12.5-50 μM) and Paclitaxel (1.99-15.9 μM) alone and in combination on HUVEC cells were evaluated at 0-16 h by tube formation test. Mangiferin (12.5-5 mg/ml) and Paclitaxel (0.3-0.0375 mg/ml μM) alone and in combination were treated in CAM assay. In an *in vivo* study, female Balb/c mice with 78 solid tumors were administered 12.5 mg/kg Paclitaxel by subcutaneously and 25-50-100 mg/kg Mangiferin by gavage, then proliferation, apoptosis, autophagy, and survival markers were examined immunohistochemically in the tumors taken on the 14th day and the results were evaluated statistically.

The ATP test results showed that the cytotoxic effect increased synergistically in the combination group due to the dose and cell type. According to evaluation of western blot results, the increase of LC3B with the decrease of p62 and the increase of FAS with cleaved PARP was shown that apoptosis occurred through the external pathway in the presence of autophagy. Furthermore, the survival parameters were suppressed. The *in vitro* results were parallel to *in vivo* and the most effective dose on tumor size, tumor weight, apoptosis, autophagy, and survival were determined as Mangiferin 50 mg/kg alone and combination. *In vitro* tube formation test, in which the effect of Mangiferin and its combinations on angiogenesis was examined, it was observed that 50 μM dose was effective alone and it was more effective antiangiogenic effect in combination groups on the CAM assay.

In conclusion, according to all these results, dose-dependent Mangiferin with Paclitaxel combination of EAC cells selectively increased apoptosis in the presence of autophagy, decreased proliferation and survival parameters, and suppressed tumor size with a strong antiangiogenic effect, were shown for the first time in this thesis. Low doses of Mangiferin combination with Paclitaxel shown a stronger synergistic effect than alone treatment. Mangiferin could be a promising potential for the development of new strategies in the treatment of cancer.

Key Words: Mangiferin, Breast Cancer, Paclitaxel, Apoptosis, Autophagy.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpasa. Project No. TDK-2017-26107.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, tüm dünyada en önemli ölüm nedenlerinden birisidir. Son yıllarda doğal yoldan elde edilen çeşitli bileşikler kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Doğal bitkisel kökenli bileşiklerin kemoterapötik ajanlar ile kombine edilerek aktivelerinin arttırılması ve yan etkilerinin azaltılması hedeflenmektedir (Newman ve Cragg, 2007; García-Rivera ve ark., 2011). Epidemiyolojik olarak yapılan araştırmalarda, polifenol içerikli diyet tüketiminde, bazı kanser türlerinin, kardiyovasküler hastalıkların ve nörodejeneratif hastalıkların daha az görüldüğü gözlenmiştir (Rajendran ve ark., 2015). Bir polifenol olan Mangiferin, başlıca mango ağacı (*Mangifera indica*) olmak üzere Anacardiaceae, Iridaceae ve Gentianaceae'nın da içinde bulunduğu 19 farklı familyada yer alan bitki türünden elde edilmektedir (Sanugul ve ark., 2005). İçerdiği fenol grupları haricinde, Mangiferin'in terapötik potansiyelinin oldukça yüksek olduğu bildirilmektedir ve bu doğal bileşiğin etki potansiyeliyle ilgili çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Jaiswal ve ark., 2015).

Mangiferin'in analjezik, antidiyabetik, antisklerotik, antimikrobiyal, antiviral, antialerjik etkilerinin yanı sıra, kalp ve karaciğer üzerine koruyucu etkilerinin varlığı da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Son zamanlarda Mangiferin'in kanser üzerine etkilerini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen sınırlı sayıda çalışmada, Mangiferin kullanımının kanserde önemli bir role sahip olabileceği bildirilmiştir (Gold-Smith ve ark., 2016). Gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların sonunda, Mangiferin'in çeşitli tümörlerde proliferasyonu baskılarken, apoptozis belirteci olan aktif kaspaz-3 miktarında artışa neden olduğu görülmüştür (Li ve ark., 2013).

Taksan grubu ilaçların ilk temsilcisi olan Paklitaksel, birçok kanser türünün tedavisinde olduğu gibi meme kanseri tedavisinde de yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (Chahinian ve ark., 1998). Bu grup ilaçlar, hücrede mikrotübüllerin toplanmasını arttırarak, depolimerizasyonunu önler ve stabil mikrotübül toplulukları oluşturur, ardından da hücreleri ölüme sürükler (Schiff ve ark., 1979). Paklitaksel ile yapılan çalışmalarda, farelerde ölümcül olmayan *in vivo* etkin dozu 12,5 mg/kg (subkutan) olarak bildirilmektedir (Armutak ve ark., 2015).

Ehrlich ascites tümörü (EAC), fareye özgü bir meme tümörüdür. Deri altı uygulaması ile solid meme tümör modeli çalışmaları yapılmaktadır. Kısa sürede sonuçlanması ve kolay ulaşılabilir olması ile sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla yapılan

literatür araştırmasında, Ehrlich ascites meme tümörü modelinde Mangiferin'in ve Paklitaksel kombinasyonunun proliferasyon, sağkalım, hücre ölümü ile ilişkisini inceleyen araştırmaya rastlanmamıştır. Ayrıca bu maddelerin tek başına ve kombinasyonlarının anjiyogenik etkilerinin ortaya konulduğu bir çalışma da şu ana kadar bulunamamıştır.

Bu tez çalışmasında EAC fare meme tümöründe, güçlü bir antioksidan olan Mangiferin'in (25-50-100 mg/kg) ve meme tümörü tedavisinde sıklıkla kullanlan Paklitaksel'in (12,5 mg/kg) tek başına ve kombinasyonlarının, hücre proliferasyonu, sağkalım, apoptozis, otofaji üzerine etkisinin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca anjiyogenez üzerine olan etkisinin, insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) hücrelerinde *in vitro* ve koryoallantoik membran (CAM) modelinde *in vivo* olarak incelenmesi de hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

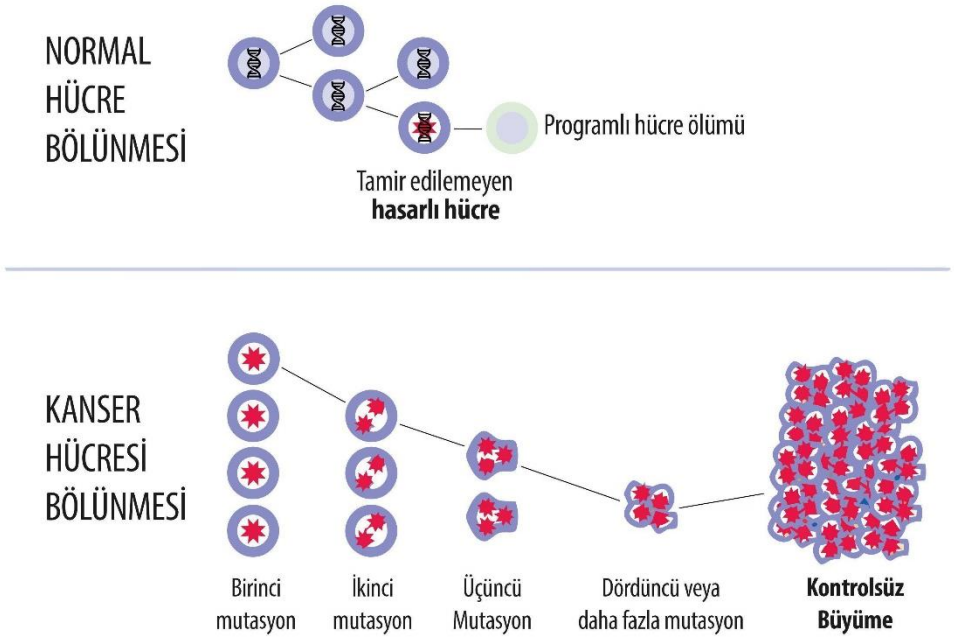
Kanserle ilgili ilk çalışmalar M.Ö. 2500'lü yıllara dayanmaktadır. Kanserle ilgili ilk yazılı kaynaklar M.Ö. 1600'lü yıllarda yazılmaya başlanan 7 adet papirüstür. Bu belgeler ancak 19. yüzyılda aydınlatılabilmiştir. M.Ö.400'lü yıllarda Hipokrat ve Gallen gibi hekimler, kanserin varlığı ve özelliklerinden bahsetmişlerdir. Hipokrat, bu dönemlerde tümörün merkez yapısının olduğundan ve bu yapılardan çıkan kolların diğer organlara uzandığından bahsetmiş ve bu özellikleri nedeniyle kansere Yunanca'da yengeç anlamına gelen "karkinoma" karsinoma ismini vermiştir. M.S. 1000'li yıllarda ise Türk ilim adamlarından İbn-i Sina'nın, kanunlarında kanserden bahsettiği bilinmektedir (Zeybek, 2003).

Kanser; normal hücrelerin apoptozisten kaçarak, proliferasyonu baskılayan sinyallere duyarsızlaşması ve dış uyaranlara gerek duymaksızın bölünerek kontrolsüz çoğalması sonucunda doku ve organları saran, ardından kan ve lenf sıvılarıyla vücuda yayılan patolojik bir sonuçtur. Kanserin birçok farklı tipi vardır. Kanser patolojisi tümörleri, benign ve malign olarak ikiye ayrılır. Benign tümörler, orijin aldığı bölgede sınırlı kalırken; malign tümörler, normal dokuları sararak dolaşım veya lenfatik sistem vasıtasıyla tüm vücuda yayılabilme yeteneğine sahiptir (Cooper, 2000) (Şekil 2-1).

Kanser hem çevresel hem de kalıtsal faktörler nedeniyle ortaya çıkan mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Kanser hücreleri hasarlı deoksiribonükleik asit (DNA) içeren, mutasyona uğramış normal hücrelerden köken almaktadır (Kutluk ve Kars, 1994). Normal hücreler kendi onarım mekanizmalarını kullanarak DNA'daki bu hasarı düzeltebilse de, kanser hücreleri meydana gelen mutasyonlardan dolayı yapılarındaki hasarı düzeltemez (Sudhakar, 2009).

Çevresel ve kalıtsal faktörlerin yanı sıra, dünya genelinde kanser ölümlerinin %18'inin enfeksiyöz hastalıklar kaynaklı olduğu bildirilmiştir. Kansere neden olan enfeksiyöz ajanların başında virüsler gelse de, bakteriler ve parazitler de kansere sebebiyet vermektedir (Sasco, ve ark., 2004; Samaras ve ark., 2010). Hepatit B veya C virüsünün gelişimi karaciğer kanserine, Epstein-Barr virüsünün non-Hodgkin lenfomaya ve nazofaringeal kansere, insan papilloma virüsünün serviks, vulva ve penis kanserine ve HIV (insan bağışıklık yetmezliği virüsü) virüsünün non-Hodgkin lenfomaya sebep olduğu bildirilmiştir (Villa, 2013). İnsanlarda sıklıkla gözlenen bir bakteri olan *Helicobacter*

pylori'nin mide kanserine neden olduğu bilinmektedir. *Schistosoma haematobium* (skuamöz hücreli mesane karsinomu), *Opisthorchis viverrini* ve *Clonorchis sinensis* (kolanjiokarsinoma) kanserle ilişkili olduğu bilinen parazitlerden bazılarıdır (Sasco ve ark., 2004; Samaras ve ark., 2010).



Şekil 2-1: Kanser oluşumu (https://www.drozdogan.com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec/)

Dünya çapında meydana gelen ölüm sebepleri arasında, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada kanser yer almaktadır. 2018 Eylül ayında elde edilen son verilere göre, 2018 yılında tahminen 18,1 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiş ve 9,6 milyon insan, kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. 2025 yılına kadar tüm dünyada gözlenen kanser vakası sayısının 25 milyonu aşacağı öngörülmektedir. Kanser oluşum süreci ve tedavisi, bilim adamları tarafından en çok araştırılan konular arasındadır. Kanserin mekanizması ve tedavisiyle ilgili yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Ayrıca, bu amansız hastalıkla ilgili etkili ve en az yan etkiye sahip tedavi yöntemi arayışı devam etmektedir. Dünyada en sık gözlenen kanser türleri arasında akciğer kanseri birinci sıradadır, meme kanseri ise ikinci sırada yer almaktadır (World Health Organization, http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer; Çevik ve ark., 2012).

Kadınlarda kanser ölümlerinde birinci sırada yer alan meme kanseri, nadiren de olsa erkeklerde de görülmektedir. 2018 yılında 2,1 milyon yeni meme kanseri vakası tespit edilmiştir (Bray ve ark. 2018). Amerikan Kanser Derneği 2018 yılında yaptıkları

araştırmalar sonunda, yaklaşık 270 bin kadında invazif tipte meme kanseri tespit edildiğini ve yaklaşık 41 bin meme kanseri hastasının hayatını kaybettiğini raporlamıştır (American Cancer Society. https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html). Bu nedenle, meme kanseri tedavisinde yeni ilaçların keşfi, doğal bileşiklerin etkilerinin araştırılması ve yeni tedavi metotlarının bulunması ile ilgili çalışmalar hızla devam etmektedir.

2.2. Deneysel Tümör Modelleri

Kanser üzerine yapılan araştırmalar oldukça uzun bir geçmişe dayanmaktadır. Hücre kültürü veya moleküler biyoloji tekniklerine rağmen, uygulanan ajanlara karşı canlı metabolizmasının cevabının tam olarak tahmin edilememesi, deneysel hayvan modelleri kullanımını elzemleştirmiştir. Deneysel hayvan modelleri, ilacın metabolik özelliklerini veya doku ile hücrelerarası dağılımını gözlemede, doz şiddetini ve ilaç dozuna bağımlı toksisiteyi belirlemede ve tümörün gelişiminin izlenmesinde kolaylık sağlamaktadır (Zeybek, 2003). 19. yüzyılın ikinci yarısı itibariyle özellikle kimyasal karsinojenlerin uygulandığı deneysel tümör modelleri kullanılmaya başlanmıştır. Uygulanan tedavi yöntemlerinden onkolojik olarak anlamlı veriler elde edebilmek ve somut sonuçlara ulaşmak için, araştırmalar çeşitli deneysel kanser modelleri üzerine yoğunlaşmıştır (Manso ve ark., 1958; Sugiura, 1962).

İlk defa Edinburgh Üniversitesi'nde 1874-1878 yılları arasında tavşanlarda meme kanseri modeli ile ilgili araştırmalar yapılmış, 1910-1915 yıllarında ise; Jensen, Murray, Ehrlich, Little gibi bilim adamlarının geliştirdiği deneysel spontan veya indüklenmiş tümör modelleri kullanılmaya başlanmıştır (Zeybek, 2003).

Deneysel kanser modelleri; Kimyasal veya Fiziksel Karsinojenler ile Oluşturulan Modeller, Spontan veya Transplante Edilebilen Tümör Modelleri, Tümör Xenograft Modeli ve Transgenik, Knockout veya Kimerik modeller olmak üzere 4 ana başlıkta incelenmektedir (Zeybek, 2013).

2.2.1. Ehrlich Deneysel Tümör Modeli

Deneysel hayvan tümörlerinden biri olan Ehrlich Asit Carcinoma (EAC), ilk olarak dişi bir farede spontan meme adenokarsinoması olarak ortaya çıkmış, Ehrlich ve Apolant tarafından fare meme dokusundan alınan tümör fareden fareye deri altına transplante edilerek deneysel tümör haline getirilmiştir (Taşkın, 2002; Zeybek, 2013). Loewenthal ve Jahn (1932) yaptıkları çalışmalar sonunda, tümörün farelerin peritonunda sıvı halde

büyüyen formunu elde etmişler ve peritonda hücrelerin yanı sıra asit sıvısı da oluştuğu için tümör, Ehrlich Asit Tümörü adını almıştır (Loewenthal ve Jahn, 1932; Ozaslan ve ark., 2011). Sıvı formun bulunmasıyla beraber, sıvı formun serbest tümör hücrelerini içeren süspansiyon şeklinde olması ve istenilen sayıdaki hücrenin bir başka hayvana transplante edilebilmesi gibi avantajları nedeniyle çalışmalarda sıvı tümör kullanımı artmıştır. Böylece, hücre sayım yöntemiyle hem transplante edilen tümör hücre sayısı hem de oluşan tümör büyüklüğü kolayca tespit edilebilmektedir (Klein, 1951; Ozaslan ve ark., 2011).

Ehrlich Asit Tümörü, deney hayvanına intraperitonal olarak enjekte edildiğinde asit form, subkutan olarak verildiğinde ise solid formlu tümör oluşur (Zeybek, 2013). Elde edilen asit hücreleri gri-beyaz, bazen hafif kanlı görünümde koyu bir sıvıdır ve süspansiyon halde bulunur (Kaleoğlu ve İşli, 1977; Lazebnik ve ark., 1991). Solid formu ise, diferansiye olmamış yaygın olarak kullanılan bir tümör modelidir. Tümörün solid form oluşturma insidansı %100'e yakındır. Tümöre spesifik transplantasyon antijenleri yoktur, regresyon göstermez. Manlign özelliğe sahiptir, hızlı büyüme gösterir ve %100 ölümle sonuçlanır. Tümör hücreleri boyutları heterojenite gösterir, ortalama 20-30 mikron çapındadır (Ekinci, 2000; Zeybek, 2013). $1x10^6$ ml'lik hücre süspansiyonu subkutan inoküle edildiğinde, bir haftalık bir süre sonunda ölçülebilecek düzeyde solid tümör oluşumu görülmektedir (Zeybek, 2003).

2.3. Kemoterapi

Karmaşık bir hastalık olan kanserin tedavisinde çeşitli tedavi yöntemleri tek başına ya da birlikte kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde en sık başvurulan yöntemlerden biri kemoterapidir. Kemoterapinin amacı, kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlar kullanarak öldürmektir. Sitotoksik etkili anti-neoplastik ajanlar tercih edilmektedir. Genellikle cerrahi girişim öncesinde metastatik bağlantıların azaltılmasında ve cerrahi işlem sonrası adjuvan tedavi olarak kullanılmaktadır. Kemoteropatik ilaçların oral, intratekal, intrakaviter, intravenöz, intramusküler ve intraperitonal uygulamaları yapılmaktadır. Adjuvant tedavi olarak ilk meme tümöründe uygulanmış ve etkili olduğu tespit edilmiştir (https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/cancer-treatment-chemo.html.; Baykara, 2016).

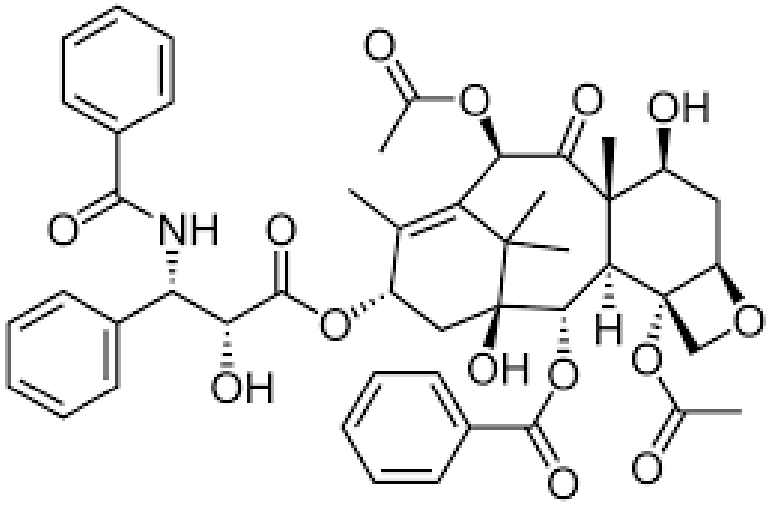
Kemoterapide kullanılan ilaçların etki mekanizmaları değişiklik göstermektedir. Siklofosfamid, Nitrozüre, Traizen gibi alkilleyici kemoteröpatik ilaçlar, DNA'nın transkripsiyonunu engelleyerek, protein üretimini baskılar (Ahlmann ve Hempel, 2016). 5-

Florourasil, Gemsitabin, Fludarabin, Metotreksat gibi antimetabolitler, metabolit adı verilen ve insan vücudunda sinyal iletimi, enzimlerin uyarılması veya baskılanmasından sorumlu küçük molekülleri baskılayarak etki eder (Longley ve ark., 2003). Hücre siklusuna müdahale ederek hücreyi sentez (S) fazında apoptozise sürükler. Dosetaksel, Paklitaksel, Vinblastin gibi birçok mikrotübül oluşumunu engelleyen antimitotik ilaçlar, mitoz fazına müdahale ederek hücrenin oluşumuna engel olur ve hücreye hasar verir (Fabbri ve ark., 2006).

Kemoterapinin, kansere karşı başarısına ve artan sağkalıma rağmen, klinik yan etkilerine karşı etkili sonuçlar alınamamıştır. Kemoteröpatiklerin yan etkilerini azaltmaya ya da ortadan kaldırmaya yönelik çeşitli çalışmalar vardır, ancak hala daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Nurgali ve ark., 2018).

2.3.1. Paklitaksel

Metastazla beraber seyreden solid tümörlerin sağaltımında kemoterapi sıklıkla tercih edilen bir stratejidir (Sharifi ve ark., 2014). Antimitotik kemoterapötik ajan olan taksan grubu (Şekil 2-2) kemateröpatikler ise, meme kanserinin birinci basamak tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Fabbri ve ark., 2006).



Şekil 2-2: Paklitaksel bileşiğinin yapısı (https://en.wikipedia.org/wiki/Paclitaxel).

Paklitaksel, *Taxus brevifolia* adlı pasifik porsuk ağacından elde edilen bitkisel bir alkaloittir. İlk olaralar 1971 yılında izole edilmiştir (Wani ve ark., 1971). 1983 yılında faz I, 1985 yılında ise faz II çalışmalarına alınmıştır. 1992 yılında ovaryum ve 1994 yılında meme kanserli hastalara kullanılmak üzere FDA (Food and Drug Administration)

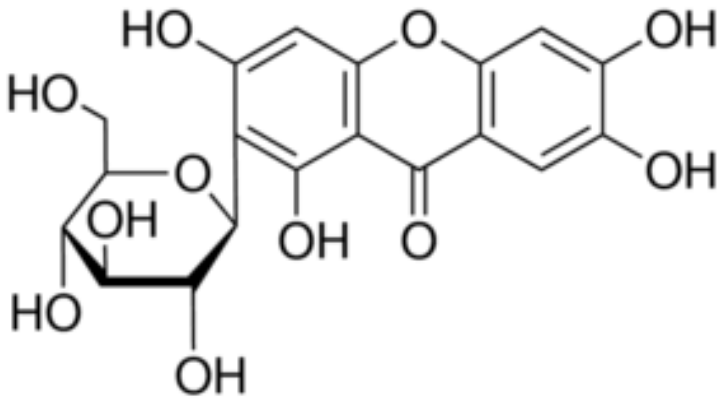
tarafından ruhsatlandırılmıştır. İlk olarak, 1991 yılında tek başına paklitaksel kullanılmasıyla metastatik meme kanserinde %56 oranında bir cevap elde edildiği gözlenmiştir (Arbuck ve Blaylock, 1995; Stiffness ve Wall, 1995). Paklitaksel günümüzde meme, yumurtalık, akciğer, baş ve boyun kanserlerinin tedavilerinde tercih edilmektedir (https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/paclitaxel).

Paklitaksel, mikrotübülleri stabilize ederek ve kromozomların segregasyonunu durdurarak etki etmektedir (Manfredi ve Horwitz, 1984). Mikrotübül oluşumunun stabilizasyonunu β-tübülin alt ünitelerine bağlanarak yapar. Hücreleri G2/M fazında durdurarak, mitotik evreye geçmesini engeller ve apoptozise yönlendirir (Jordan ve ark., 1996; Fabbri ve ark., 2006). Sitotoksik etkisi, sadece miktotübüllerin stabilizasyonu ile sağlanmamaktadır. Paklitaksel, ayrıca mikrotübüllere bağlanarak, BCL-2'yi fosforile eder ve mitokondri üzerinden apoptozisin başlamasını sağlar (Dong ve ark., 2012).

Yapılan klinik çalışmalar doğrultusunda paklitakselin gastrointestinal toksisite, hipersensitivite, nörotoksisite ve myelosupresif etki gibi yan etkileri olduğu tespit edilmiştir (Frederiks ve ark., 2015). Bazı vakalarda ise, hücrelerde paklitaksele karşı direncin meydana geldiği gözlenmiştir (Němcová-Fürstová ve ark., 2016). Bu olumsuz etkileri azaltmak ve paklitakselin etkinliğini arttırmak üzere, son dönemlerde gerçekleştirilen çalışmalar kemoterapötiklerin çeşitli doğal bileşiklerle kombinasyonel kullanımları üzerine yoğunlaşmıştır (Chavoshi ve ark., 2017; Chen ve ark., 2016; Jiang ve ark., 2017).

2.4. Mangiferin

Son zamanlarda doğal ürünlerden elde edilen maddeler, hayatı tehdit eden hastalıklara karşı sıklıkla tercih edilmektedir (Newman ve Cragg, 2007). Epidemiyolojik olarak yapılan araştırmalarda, polifenol içerikli diyet tüketiminde kardiyovasküler hastalıkların, bazı kanser türlerinin ve nörodejeneretif hastalıkların daha az görüldüğü gözlenmiştir (Rajendran ve ark., 2015). Dünya çapında, son 30 yıl içerisinde çeşitli tıbbi bitkiden, birçok farklı aktif doğal bileşik bulunmuştur (Saha ve ark., 2016). Bunlardan biri olan mangiferin, ksantonlara bağlı doğal bir grup olan polifenol türevidir (Şekil 2-3) (El-Seedi ve ark., 2010). Ksantonlar, genellikle mantar ve liken gibi yüksek bitki familyalarında sekonder metabolit olarak bulunmaktadır. Gösterdiği antioksidan, antiviral, antikanser, antidiyabetik, immünmodülatör, hepatoprotektif ve analjezik etkiler gibi farmakolojik özellikleriyle dikkat çekmektedir (Hostetmann ve Hostetmann, 1989).



Şekil 2-3: Mangiferin bileşiğinin yapısı. (https://www.sigmaaldrich.com)

Bir polifenol olan mangiferin, başlıca *Mangifera indica* olmak üzere, Anacardiacae, Gentianaceae ve Iridaceae ailelerini de içeren 16 farklı bitkinin meyvelerinden, kabuklarından, yapraklarından ve köklerinden elde edilmektedir (Sanugul ve ark., 2005). İçerdiği fenol grupları haricinde mangiferinin, yapısında ihtiva ettiği C-glikozid ve polihidroksil gibi çeşitli fonksiyona sahip yapıları sebebiyle, terapötik potansiyeli oldukça yüksektir. Bu özellikleri sebebiyle bu doğal bileşiğin etkisini ortaya koyan çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Jaiswal ve ark., 2015). Bu çalışmalarda, mangiferinin analjezik, antidiyabetik, antisklerotik, antimikrobiyal, antiviral, antialerjik etkilerinin yanı sıra, kalp, karaciğer ve sinir sitemini koruyucu özelliklerinin olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda mangiferinin kanser üzerine etkilerini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen sınırlı sayıda çalışmada, mangiferin kullanımının kanserde önemli role sahip olabileceği bildirilmiştir (Gold-Smith ve ark., 2016) (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: Mangiferinin genel özellikleri

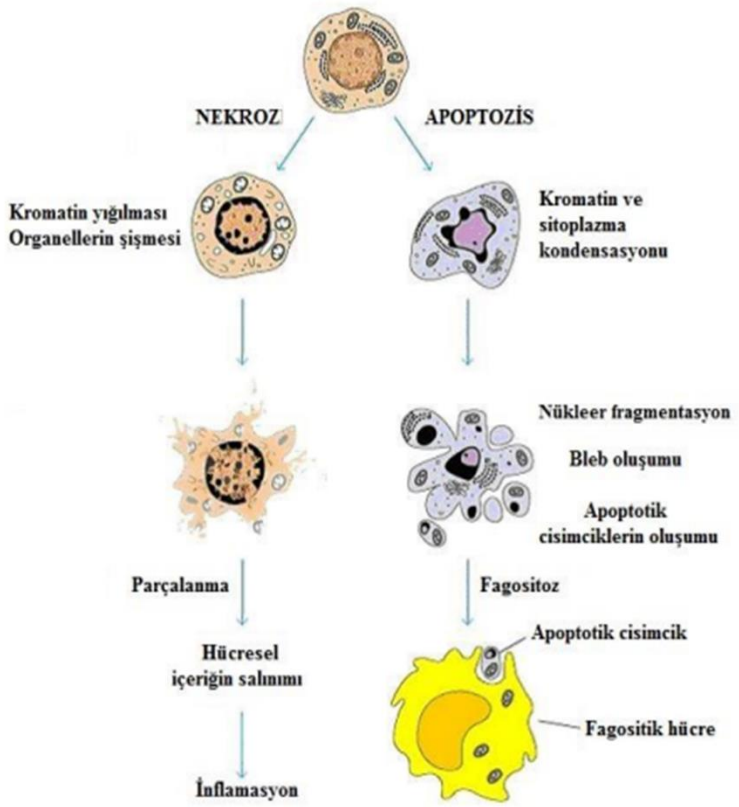
2.5. Apoptozis

Ökaryotlarda, yeni hücrelerin oluşumu ve hücre ölümü arasında, organizmanın gelişimi ve doku homeostazisinin sağlanması için bir denge bulunur. Dengenin bozulması, bazı patolojik durumları tetikleyebilir (Danial ve Korsmeyer, 2004). Bu sebeple, gelişmiş organizmadaki hücreler, programlanmış hücre ölümü olan apoptozis ve patolojik hücre ölümü nekroz gibi hücre ölüm tipleriyle yok olmaktadır. Nekroz, dış etkenlerin etkisiyle koruyucu mekanizmaların devreye girmesine fırsat vermeden, hücrenin tamamının şişerek parçalandığı pasif ve patolojik bir olayken, apoptozis hücrelerarası sinyallerin ve genlerin kontrolünde meydana gelen, hatalı hücrelerin çevreye zarar vermeden programlı ölümü olarak tanımlanmaktadır (Vinay ve ark., 2004).

Apoptozis, ilk defa 1842 yılında Vogt tarafından, hücrelerde normal gelişim esnasında meydana gelen ölüm olarak tanımlanmıştır. Yunanca'da apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinden oluşan bu terimi ise ilk defa 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adlı Avusturyalı patologlar kullanmışlardır (Kerr ve ark., 1972). Horvitz, programlanmış

hücre ölümü mekanizmasını çözebilmek için *Caenorhabditis elegans* cinsi nematod üzerinde araştırmalar yapmıştır (Horvitz, 1999). Cohen'in timüs üzerinde yaptığı çalışmalar sonunda, apoptozisin genlerle kontrol edildiğini tespit etmişlerdir (Cohen, 1993).

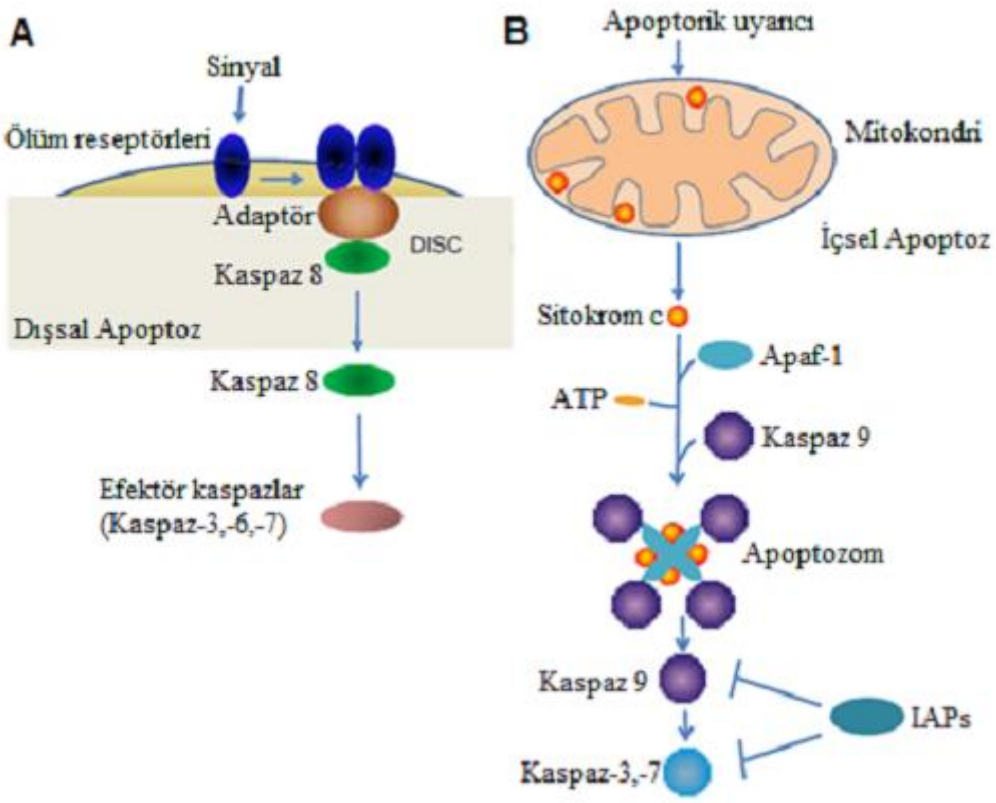
Apoptozis, genler tarafından kontrol edilen ve aktif işlevli bir ölüm modelidir. Nekrozun aksine, apoptozis esnasında mitokondriler sağlam kalır, nukleusta kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanmaları meydana gelir, bu kırık DNA parçaları hücre zarı ile kaplanarak (apoptotik cisimcik oluşur) hücreden uzaklaşır, hücre giderek büzüşür ve 1 saatten kısa bir sürede %30'unu kaybeder (Searle ve ark., 1982). Hücreler arasındaki apoptotik cisimcikler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilir, intraselüler içerik, hücrelerarasına yayılmadığı için de apoptozis bölgesinde nekrozdaki gibi immün yanıt şekillenmez (Nathan ve Ding, 2011) (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Nekroz ve apoptozis (Buja ve ark, 1993).

2.5.1. Apoptozisin Mekanizması

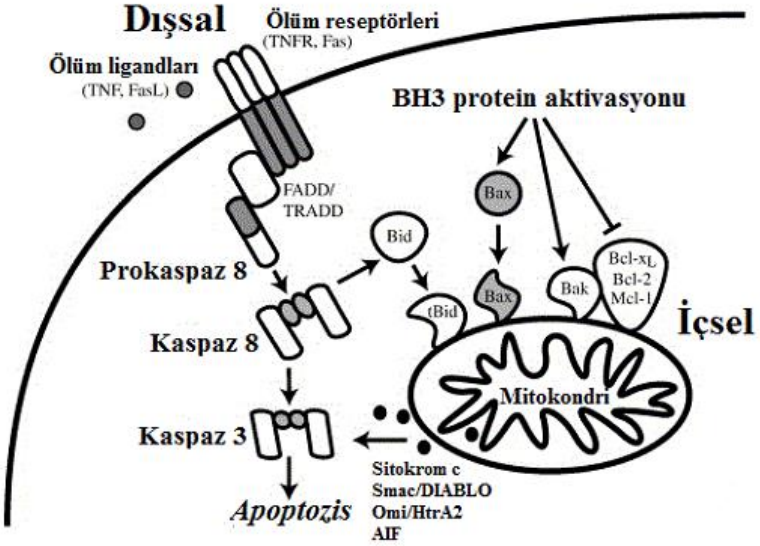
Apoptozisin, enerji bağımlı, kademeli moleküler olaylar içeren oldukça kompleks bir mekanizması vardır. Yapılan çalışmalar sonunda, birbirine bağımlı ve ortak moleküller içeren 3 ana apoptotik sinyal yolağın olduğu gösterilmiştir; ekstrinsik (dışsal) ya da ölüm reseptörü yolağı, intrinsik (içsel) ya da mitokondriyal yolak ve endoplazmik retikulum aracılı apoptozis (Şekil 2-6). Bu yollarda kaspaz proteinleri aktif rol oynar. Apoptozis, ayrıca kaspaz bağımsız yollardan da meydana gelebilmektedir. Kaspaz bağımsız yolda "Apoptozis indükleyici faktör (AIF)" etkinliği söz konusudur. AIF, mitokondriden salınarak, nukleusa geçip nükleazları aktifleştirerek, DNA hasarı meydana getirmektedir. Steroidler, granzim B ve endonukleaz G de AIF'lere benzer şekilde, kaspazlardan bağımsız olarak hücreyi apoptozise götürmektedir (Igney ve Krammer, 2002; Ulukaya, 2003; Dash, 2007).



Şekil 2-6:Dışsal (A) ve içsel (B) apoptozis yolakları. Her iki mekanizma da kaspaz aktivasyonuna yol açar (Li ve Sheng, 2012).

2.5.1.1. Dışsal (Ekstrinsik) Yolak

Tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) süper ailesine ait olan hücre yüzey ölüm reseptörlerinin, ligandlarıyla bağlanmasıyla aktive edilir. TNFR süper ailesi üyelerinin her biri, kendilerine özgü ligandları tarafından tek tek tanınmasını sağlayan sistein bakımından zengin ekstrasellüler subdomainler içeren, tip I transmembran proteinleridir. Ayrıca ölüm reseptörleri, apoptozisin devam etmesi için intraselüler ölüm domaini ve tekli transmembran domaini de içerir. TNFR-1, Fas/CD95/APO-1 ve TNF-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand (TRAIL) reseptörleri olan DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2) başlıca önemli ölüm reseptörleridir. Kendileriyle ilgili ligandlara bağlanarak aktive olurlar ve apoptozis sürecinin başlamasına neden olurlar. Ölüm reseptörlerine bağlanan FasL, TNF-α ve TRAIL, TNFR süperailesine ait ligantlardır. Ölüm reseptörü ligantları, proteolitik olarak kırılabilir ve serbest kalabilirler, bu sebeple tip II transmembran proteinleri gibi ifade edilirler. Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu proteinlerden meydana gelen, "Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC)" oluşmasını sağlar. DISC, prokaspaz-8'i aktifleştiren adaptör protein Fas ilişkili ölüm bölgesi (FADD) ve TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi (TRADD) proteinlerini içerir. Aktif hale gelen kaspaz-8 doğrudan kaspaz-3'ü veya diğer ilerletici kaspazları kırarak aktive eder. Aktif kaspaz-8 ayrıca, Bcl-2 homoloji-3 (BH3) proteinlerinden Bid'in aktive olmasına neden olabilir. Kırılmış Bid (tBid) mitokondriye geçerek, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktifleştiren sitokrom c'nin salınımını uyarır (Ulukaya, 2003; Elmore, 2007; Ashkenazi, 2008) (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: Dışsal apoptozis yolağı (Ashkenazi, 2008).

2.5.1.2. İçsel (İntrinsik / Mitokondriyal) Yolak

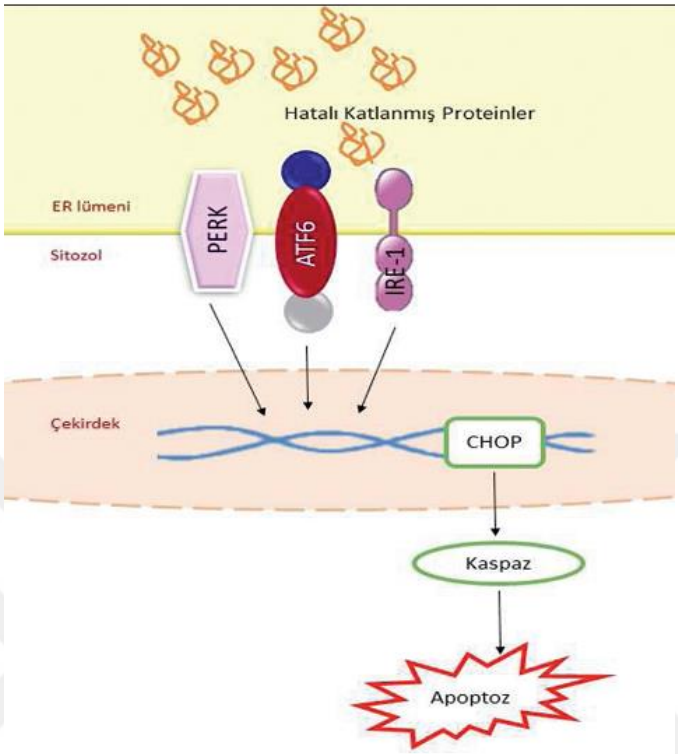
Mitokondrinin dış membran permeabilizasyonu (MOMP) anahtar rol üstlendiği bu yolda, apoptozis hücre içi sinyallerle meydana gelir. DNA hasarı, büyüme faktörlerinin ve hormonların yokluğu, radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, serbest radikaller ve viral enfeksiyonlar, içsel yolağın apoptotik tetikleyicileridir ve bu tetikleyiciler reseptör aracılı değildir. İçsel yol, proapoptotik ve anti-apoptotik proteinler tarafından düzenlenir. Anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL, Mcl-1 proteinleri kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da apoptozis faktörlerin mitokondriden salınımını engelleyerek, hücrenin yaşamasını teşvik ederken; proapoptotik Bax, Bak, Bad, Bim, Bid, Noxa, Puma proteinleri, hücreyi apoptozise gitmesi için teşvik eder. Bax ve Bak'ın aktivitesi Bcl-2 tarafından kontrol edilir. Apoptozis esnasında Bcl-2 inaktif hale geçerek, Bax ve Bak'ın aktivasyonuna sebep olur, böylece mitokondri dış membranında porlar meydana gelerek, zar potansiyelinde değişim meydana gelir. Bu olay sonucunda sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF ve endonükleaz D (EndoG) gibi mitokondri membran proteinleri sitoplazmaya geçer. Sitoplazmaya geçen sitokrom c, orada apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanarak, aktive olmasını sağlar ve ortamda bulunan dATP/ATP ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi oligomerize olarak heptamerik bir yapıya sahip apoptozomu oluşturur. Bu yapı, prokaspaz-9'u aktifleştirerek kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi diğer kaspazları aktive ederek kaspaz kaskadının oluşmasını sağlar (Adams ve Cory, 2001; Wang, 2001; Ulukaya, 2003; Riedl ve Salvesen, 2007) (Şekil 2-6).

Aktif kaspaz-3, hücrelerin apoptotik morfolojisini, kaspazla aktive edilmiş DNaz inhibitörü (ICAD; inhibitor of caspase activated DNase), poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP, DNA tamir enzimi), Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz I (ROCKI; Rho-associated coiled coil forming kinase I), aktin, fodrin ve lamin gibi hücresel substratları kırarak meydana getirmektedir (Susin ve ark., 1999; Fan ve ark., 2005).

2.5.1.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis

Son yapılan çalışmalarda, amiloid β nörotoksisitesinde gözlenen kaspaz-12 aktivasyonu ile endoplazmik retikulum aracılı apoptozis mekanizmasından bahsedilmektedir. Kaspaz-12, endoplazmik retikulum membranında lokalize halde bulunan bir proteindir. Kalsiyum seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin etkisiyle

prokaspaz-12 aktive olarak kaspaz-9'u etkinleştirir ve sitoplazmadaki kaspaz kaskadının oluşmasını sağlar (Rao ve ark., 2001) (Şekil 2.8).



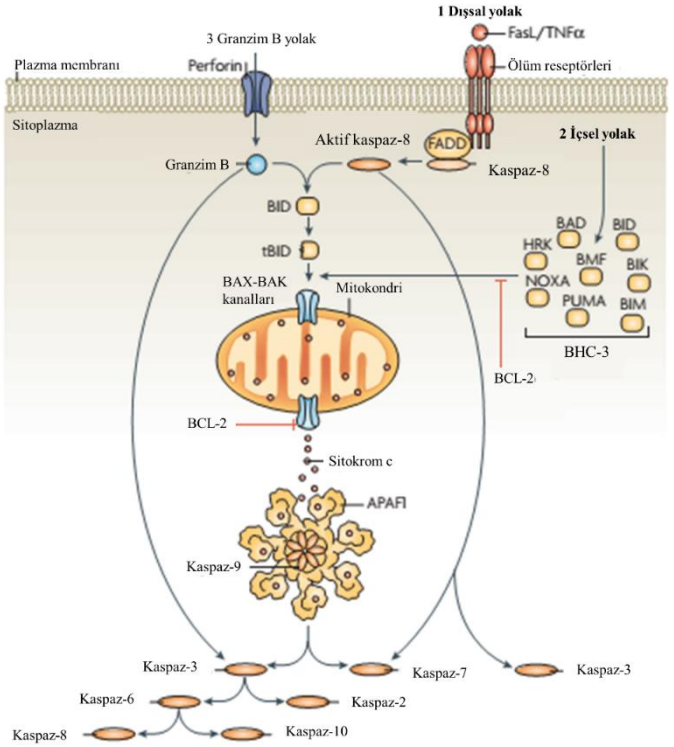
Şekil 2-8: Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis. (Köse ve ark., 2017).
ER: Endoplazmik retikulum; PERK: Protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz; CHOP: CCAAT-artırıcı bağlayıcı protein homolog proteini.

2.5.2. Kaspazların Apoptozisteki Rolü

Kaspazlar, apoptozun başından sonuna kadar her aşamasında rol oynayan, aktif bölgesinde sistein bulunan proteazlardır. Hücre içinde sentezlenen ve proteolitik kırılmayla aktifleşen inaktif prokürsörlerdir (prokaspazlardır). Bu prokürsörler, proteinleri bir ya da iki aspartik asit eklentilerinden kırarak, aktifleşir ve diğer kaspazları katalize eder. Böylece proteolitik bir kaspaz kaskadı meydana getirirler. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 14 farklı kaspaz tanımlanmıştır, ancak bunlardan sadece 7 tanesi apoptoziste rol oynamaktadır. Apoptoziste rol oynayan kaspazlar başlatıcı (Kaspaz-2, 8, 9, 10) ve sonlandırıcı kaspazlar (Kaspaz-3, 6, 7) olmak üzere ikiye ayrılır. Kaspaz-1, 4 ve 5 ise inflamasyonda rol oynamaktadır (Alberts ve ark., 2002) (Şekil 2.9).

Kaspazlar aktifleştiğinde, nukleus DNA'sının parçalanmasından sorumlu olan bir DNaz inhibitörü olarak görev almaktadır. Ayrıca, nukleus parçalanmasına yol açan nükleer laminleri, hücre iskeletinin bozulmasına, plazma membranın tomurcuklanmasına ve

hücre parçalanmasına neden olan hücre iskeleti proteinlerini, golgi aygıtının parçalanmasına neden olacak golgi matriks proteinlerini ve plazma mebranının iç yüzünden dış yüzüne fosfatidilserini çeviren skramblazı keserek, aktive olmasını sağlar (Ulukaya, 2003; Zhang ve ark., 2003; Fan ve ark., 2005).



Şekil 2-9: Kaspaz aktivasyon yolağı (Taylor ve ark., 2008).

2.5.2.1. Kaspazların sınıflandırılması:

- ✓ Kaspaz-1 (ICE)
- ✓ Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)
- ✓ Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama)
- ✓ Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICEreıı)
- ✓ Kaspaz-5 (ICErelııı, TY)
- ✓ Kaspaz-6 (Mch2)
- ✓ Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)
- ✓ Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)
- ✓ Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)
- ✓ Kaspaz-10 (Mch4)
- ✓ Kaspaz-11 (ICH-3)
- ✓ Kaspaz-12

- ✓ Kaspaz-13 (ERICE)
- ✓ Kaspaz-14 (MICE)

2.5.3. Bcl-2 Ailesinin Apoptozisteki Rolü

Apoptozis kontrolünde önemli rol üstlenen Bcl-2 ailesi üyeleri, programlanmış ölüm sürecine mitokondri üzerinden etki eder. Bcl-2 ailesi üyeleri, apoptozis üzerine etkileri ile ilgili kendi arasında antiapoptotik ve pro-apoptotik proteinler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL, Mcl-1 hücreyi yaşamaya teşvik ederken; pro-apoptotik Bax, Bak, Bad, Bim, Bid, Bcl-Xs proteinler, hücreyi apoptozise gitmesi için teşvik eder. Proapoptotik aile üyeleri de kendi arasında içerdiği Bcl-2 homoloji (BH) bölgesine göre ikiye ayrılmaktadır. Antiapoptotik proteinlerden Bcl-2, Bcl-XL ve proapoptotik efektör protein olarak adlandırılan Bax ve Bak proteinlerinde dört adet Bcl-2 homoloji (BH1, BH2, BH3, BH4) bölgesi içerirken, proapoptotik diğer proteinler (Bid, Bad, Noxa, Puma, Bim) sadece BH3 bölgesi içermektedir (Cooper ve Hausman, 2016) (Şekil 2-9).

Bcl-2 proteinlerinin pro-apoptotik üyeleri, sağlıklı hücrelerde sitoplazmada bulunur. Hücresel stres, serbest radikal hasarı veya büyüme faktörü yoksunluğu gibi apoptozis sinyalleri sonucunda anti-apoptotik proteinlerin bulunduğu mitokondri dış membranına giderek, anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri inaktive ederler ve mitokondri membranında porların oluşmasına neden olurlar. Sonuç olarak da, sitokrom c gibi pro-apoptotik moleküller, zarlar arası bölgeden açığa çıkarak sitoplazmaya geçer. Bu da apoptozom oluşumu ve kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açar. Sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesi, apoptotik sürecin irreversibl aşamada olduğunu gösterir (Susin ve ark., 1999; Suh, 2002; Zhang ve ark., 2003).

2.5.3.1. Bid Proteini ile Aktive Olan Bak

Yapılan araştırmalar Bid'in, hücre yüzey ölüm reseptörlerinden gelen apoptotik sinyali mitokondriye ileterek, yüzey ölüm reseptörleri ile mitokondrinin bağlantısını sağladığını göstermektedir. Yüzey ölüm reseptörleri aracılığıyla aktifleşen kaspaz-8, sitosolde bulunan Bid'i kırarak aktif hale geçirir. Aktif Bid, mitokondri zarına tutunarak, inaktif Bak'a bağlanır ve Bak'ı aktive eder. Aktif Bak oligomerize olur ve mitokondri zarında porlar oluşturur. Böylece, oluşan porlardan sitokrom c sitoplazmaya salınır (Ulukaya, 2003; Fulda ve Debatin, 2006).

2.5.3.2. Bad Proteini ile Aktive Olan Bax

Büyüme faktörü gibi yaşam faktörlerinin eksikliğinde, hücre ölümü bu yolla gerçekleşir. Bad'ın diğer Bcl-2 ailesi üyeleriyle kompleks yapma yeteneği fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir. Normal koşullarda Bad, serin-treonin kinaz Akt/PKB yolu aracılığıyla fosforile formda sitoplazmada bulunur. Yaşam faktörlerinin eksikliğinde bu yapı defosforile olarak Bad serbest kalır. Serbest kalan Bad, mitokondrinin dış zarında bulunan antiapoptotik proteinlerden Bcl-2 ve Bcl-XL'ye bağlanarak onları inaktive eder. Bunun sonunda aktifleşen Bax, mitokondri zarları arasında bulunan sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasına neden olur (Ulukaya, 2003; Spierings ve ark., 2005).

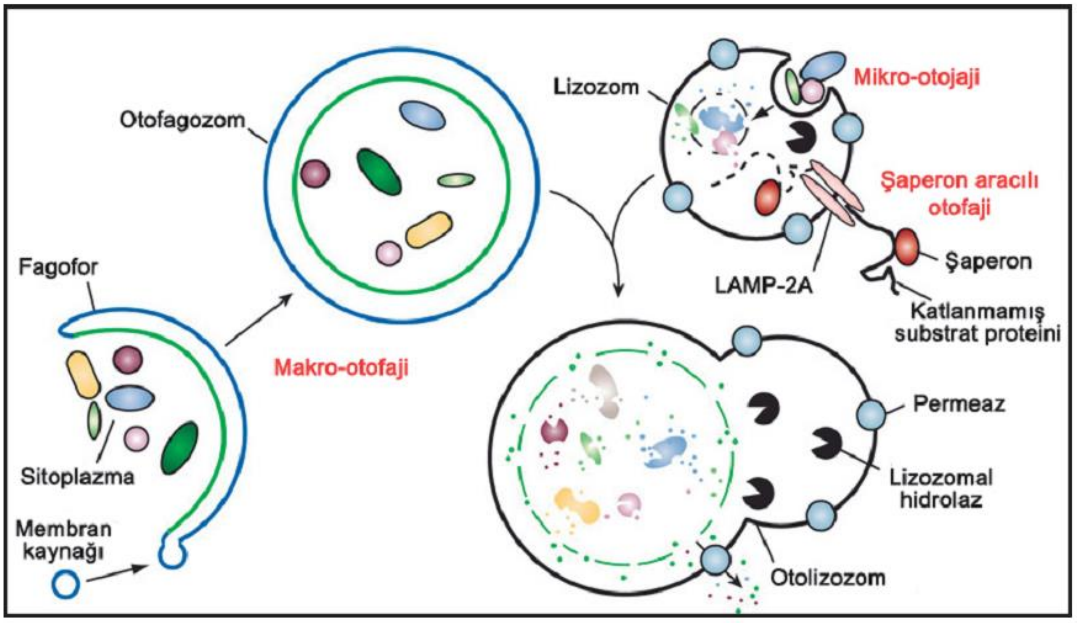
2.6. Otofaji

Otofaji, kelime anlamı olarak hücrenin kendi kendisini yemesi anlamına gelmektedir. Hücre içinde bulunan makromoleküllerin ve organellerin, bir kesecik içerisinde lizozomlar tarafından parçalanması işlemidir, fizyolojik bir olaydır. Otofaji ile ilgili başlangıçta yapılan araştırmalarda, besin yetersizliğinde hücrenin stresten korunması, hücre içi dengenin sağlanması ve hücre içi makromoleküllerden yararlanımı sağlayan, özetle; hücrenin sağkalımı ile ilgili bir savunma mekanizması olduğu düşünülmüştür (Ohsumi, 2001; Shintani ve Klionsky, 2004). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda, otofajinin hücre metabolizmasının düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve hücre içi patojenlerin ortadan kaldırılmasında da etkin rolü olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, otofaji mekanizmasında meydana gelen bozuklukların kanser, enfeksiyon ve nörodejeneretif hastalıklara sebebiyet verdiği ortaya konulmuştur (Mizushima ve ark., 2008; Arslan ve ark., 2011).

Otofaji esnasında parçalanacak moleküller ya da organeller sitoplazma içerisinde endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi arasında, ilk olarak preotofagozom denilen bir membranla sarılır. Bu membran, tamamen kapandığında kesecik şeklini alır ve oluşan bu yapı otofagozom olarak adlandırılır (Shintani ve Klionsky; 2004; Mizushima ve ark., 2008). Bu izolasyon membranının kaynağı tam belli olmasa da, yeni sentez edildiği ya da endoplazmik retikulum, mitokondri dış membranı ve plazma membranından köken aldığı düşünülmektedir (Kroemer ve ark., 2010). Otofagozomlar, lizozomla birleştikten sonra içeriğin lizozomal enzimlerle parçalanması başlar ve makromoleküllerin geri dönüşümü ile sonuçlanır. Parçalanan ürünler, hücre içi enerji kaynağı olarak ya da yeni proteinlerin sentezinde kullanılır (Shintani ve Klionsky 2004; Mizushima ve ark., 2008).

2.6.1. Otofaji Tipleri

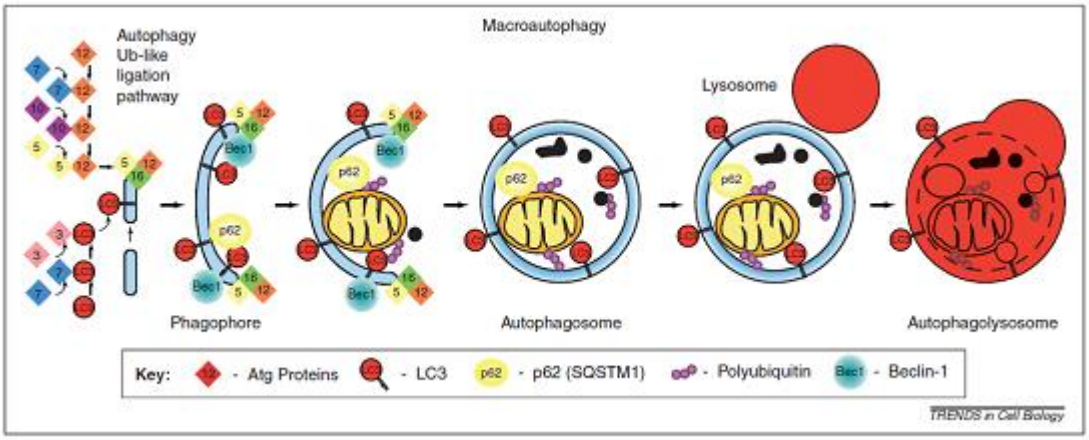
Otofaji, 3 farklı tipte karşımıza çıkmaktadır; makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılıklı otofaji (Xie ve Klionsky, 2007; Levine ve Kroemer, 2008) (Şekil 2-10).



Şekil 2-10: Otofajinin farklı tipleri (Mizushima ve ark., 2008; Karadağ, 2016).

2.6.1.1. Makrootofaji

Büyük proteinlerin ya da organellerin sindirildiği otofaji türüdür. Bu tipte oluşan otofagozom yapısı, lizozomla birleşip otolizozomu oluşturarak füzyonu gerçekleşir. Pek çok hücrede bazal düzeyde oluşur, protein parçalarının ve hasar görmüş organellerin parçalanmasında en önemli rolü üstlenir (Feng ve ark., 2014) (Şekil 2-10, Şekil 2-11).



Şekil 2-11: Makrootofaji (Gump ve Thorburn, 2011).

2.6.1.2. Mikrootofaji

Lizozom membranının içe çökmesi ile sitoplazmanın lizozom tarafından doğrudan yenilmesi ve içeriğinin lizozom içinde parçalanmasıdır. Bu mekanizmada keseciklerin yapısına direkt lizozom enzimleri katılır ve bu kesecikler lizozom görevi görürler; yani makrootofajideki gibi lizozomun yapısına katılmazlar (Marzella ve ark., 1981) (Şekil 2-10).

2.6.1.3. Şaperon Aracılıklı Otofaji

KFERQ motifli (amino asit dizisi Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) hedef proteinlerin, şaperonlar tarafından tanınarak meydana gelen otofaji tipidir. Şaperon-protein kompleksi, "ısı şok proteini 70" (hsp70) aracılığı ile lizozoma yıkım için yönlendirilir. Bunlar, "Lizozomla İlişkili Membran Proteini Tip 2A" (LAMP2A) tarafından tanınır ve bağlanarak lizozomal enzimler tarafından yıkım gerçekleştirilir (Chiang ve ark., 1989; Massey ve ark., 2006).

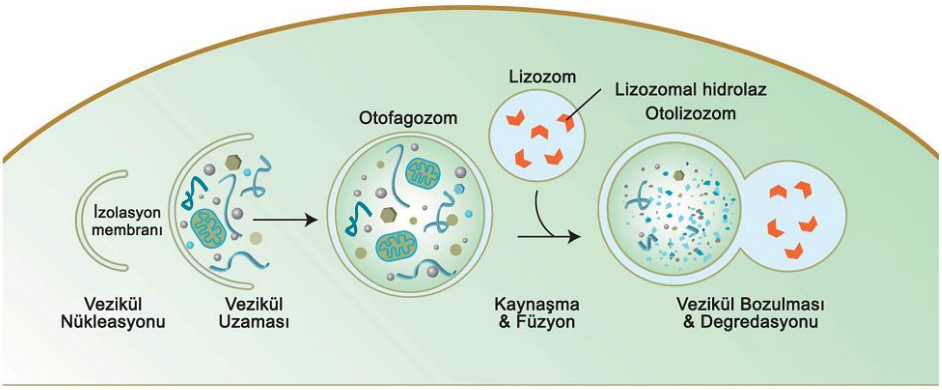
Son zamanlarda yapılan çalışmalar otofajiyi fonksiyonlarına göre; ksenofaji, mitofaji, lipofaji ve agrefaji olarak 4'e ayırmıştır. Ksenofaji, hücre içindeki bakteri ve virüslerin yıkımını sağlayarak immün sistemi destekler. Mitofaji, kanser patogenezinde önemli rol oynayan hasarlı mitokondrilerin sindirilmesinde rol oynar. Lipofaji, trigliserit ve kolestrolün parçalanmasını sağlayarak, hücre içi lipit miktarını dengeler. Agrefaji, nörodejeneratif hastalıklar ve karaciğer hastalıklarının önlenmesinde önemli role sahip olan hatalı katlanan ve kümelenme görünen proteinlerin temizlenmesinde rol oynar (Deretic ve Levine, 2009; Hönscheid ve ark., 2014) (Şekil 2-10).

Otofaji araştırmaları ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae* mayalarda yapılmıştır ve bu çalışmalar sonunda otofaji mekanizmasında rol oynayan yaklaşık olarak 35 adet otofaji ile ilişkili gen (Atg) tanımlanmıştır (Kroemer ve ark., 2010.). Bunlardan yaklaşık 12 tanesinin (ATG1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ve 16), memelilerde de bulunduğu tespit edilmiştir, ancak bazen literatürde farklı adlandırılmalar kullanılabilmektedir; memelilerde Atg1-ULK, Atg 6-Beclin 1, Atg 8-LC3 olarak isimlendirilmektedir (Mizushima ve ark., 2011).

2.6.2. Otofajinin Basamakları

Otofaji mekanizması 4 basamakta gerçekleşmektedir. Atg1-Atg13-Atg17 kinaz kompleksi (otofajinin Tetiklenmesi), sınıf III fosfoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz (Vezikül Nükleasyonu), Vps34'ün aktivitesini düzenleyen Atg6 protein (memelilerde Beclin-1)

kompleksi (Vezikül Uzama Fazı); iki ubikitin benzeri sistem, Atg9 ve döngü sistemi (Yang ve ark., 2005; Meléndez ve Levine, 2009; Mehrpour ve ark., 2010) (Şekil 2-12).



Şekil 2-12: Otofajinin basamakları (Meléndez ve Levine, 2009)

2.6.2.1. Atg1-Atg13-Atg17 Kinaz Kompleksi (Otofajinin Tetiklenmesi)

Atg1, Atg13 ve Atg17 genleri, otofogozom başlaması için gereklidir. Mayadaki adı Atg1 olan genin, memelilerdeki karşılığı ULK1-2'dir. mTOR "Mammalian Target of Rapamycin" (memelilerde mTORC1 ya da mayalarda TORC1), hücre büyümesini ve çoğalmasını, anabolik süreci tetikleyen otofajide önemli rol olan bir serin-treonin kinaz üyesidir. Normal şartlarda besin varlığında mTORC1 aktif olarak bulunur ve hücrenin otofajiye gidişini engeller. mTOR proteini, otofaji proteinlerinden biri olan Atg13'ü fosforile ederek, hücrenin otofajiye gitmesine engel olur. Ancak, hücre içi besin yetersizliğinde mTOR proteininin Atg13 üzerindeki etkisi ortadan kalkar ve Atg13 defosforile olarak otofaji ile bağlantılı mayalarda Atg1, memelilerde ULK olarak adlandırılan serin treonin kinaza bağlanarak aktive olur. Ardından ULK, FIP200'ü fosforile ederek ULK-Atg 13-ATG17 (FIP200) kompleksi oluşturur ve otofajiyi tetikler (Hara ve ark., 2008; Kim J. ve ark., 2011).

2.6.2.2. Sınıf III PI3K Kompleksi (Vezikül Nükleasyonu)

Memeli hücrelerinde 3 çeşit fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) vardır. Sınıf I PI3K; otofajiyi inhibe ederken, sınıf II PI3K'nın otofaji ile bir bağlantısı yoktur, sınıf III PI3K ise, otofajinin aktive olmasını sağlar ve otofagozom membranının fosfolipit kaynağıdır. mTORC'in inaktive olmasının ardından aktive olan ULK, PI3KC3 bileşenlerinin aktivasyonunu sağlayarak, otofagozomun oluşmasına destek olur. PI3KC3 kompleksi, Beclin-1(ATG6), Vps34 (PI3KC3), p150 (Vps15, PI3KR4), Uvrag, Atg14L, Ambra1, Bif-1 otofaji genlerinden oluşmaktadır. Otofagozomların oluşumu, Atg14L-Atg6 (Beclin 1)-

PI3KC3 kompleksinin oluşumu ile başlar (Gozuacik ve Kimchi, 2004, Juhasz ve ark., 2008).

2.6.2.3. ATG12 ve Atg8 Ubikitin Benzeri Sistem (Vezikül Uzama Fazı)

Otofajinin bu basamağında, iki birbiriyle ilişkili sistem rol alır. Birinci ubikitinasyon sistemi, Atg12 proteininin Atg5'e bağlanmasını, ikinci ubikitin benzeri sistem ise, fosfotidil etanolamin (PE) adlı yağ molekülünün LC3 proteinine kovalent bağlanmasını sağlar (Ohsumi, 2001).

2.6.2.3.1. Atg12 Ubikitin Benzeri Sistem

Atg12, ubikitin aktive edici enzim E1 olarak işlev gören Atg7 tarafından aktive edilir. Daha sonra Atg12, ubikitin konjuge edici enzim E2 olarak işlev gören Atg10'a bağlanarak, Atg7'yi serbest bırakır. Son olarak da Atg12'nin C ucundaki glisin amino asidi, Atg5'in lizin amino asidi ile bağlanarak kovalent bağ yapar ve Atg10'un serbest kalmasına neden olur. Ardından Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile de birleşerek, otofagozom membranının dış yüzeyine bağlanır (Hanada ve ark., 2007; Romanov ve ark., 2012).

2.6.2.3.2. Atg8 Ubikitin Benzeri Sistem (LC3-PE Konjugasyon Sistemi)

Mikrotübül ilişkili protein hafif zincir 3 (LC3), mayalarda Atg8 proteini olarak adlandırılır. LC3'ün C-ucunda bulunan beş amino asitin, Atg4 (sistein proteazı) proteazı tarafından kesilerek 6. aminoasit olan glisinin ortaya çıkarılmasıyla, LC3-I tipi oluşturulur. Fosfotidil etanolamin (PE) bu ikinci ubikitin sistemi ile LC3-I'e kovalent bağ ile bağlanır ve LC3-II formunu oluşturur. Bu süreç E1 (benzeri Atg7) ve E2 (benzeri Atg3) konjugasyon sistemleri tarafından geri dönüşümsüz olarak gerçekleştirilir. LC3-II, otofagozomun membranında dış yüzeyinde konumlanmıştır ve otofaji belirteci olarak kullanılır. Ayrıca Atg4, kesecik oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3'ten PE gruplarını ayırarak, yeniden kullanılmalarını sağlar (Ohsumi, 2001; Shpilka ve ark., 2011).

2.6.2.3.3. Atg9 ve Döngü Sistemi

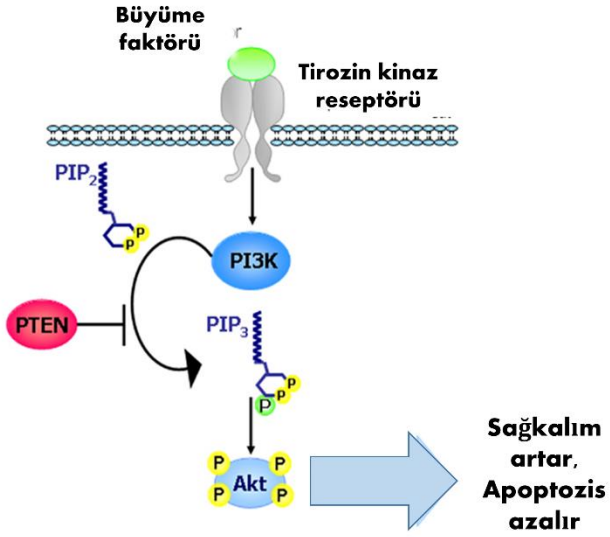
İntegral membran proteini ve birçok transmembran domaini içeren Atg9, otofagozom zarının uzamasında önemli rol oynar. Normal koşullarda Atg9, LC3-II ve Rab7 (Ras-ilişkili protein) ile birlikte bulunur. Görevi, lipit taşımaktır (Mehrpour ve ark., 2010).

2.6.2.4. Lizozomla Birleşme ve Yıkım Fazı

Lizozomlar ile tamamlanmış otofagozomların birleşmesi, LAMP2 ve Rab7 gibi diğer vezikül yolaklarında da yer alan proteinler kontrolünde gerçekleşmektedir. GTPaz (Rab22, Rab24), SNARE, NSF gibi proteinler, otofagozomun lizozom ile birleşmeden önce olgunlaşmasında rol alır (Jäger ve ark., 2004; Yang ve ark., 2005; Saftig ve ark., 2008). Otofagozomun dış zarı, lizozomla birleşerek otolizozomu oluşturur. Bu süreçte, lizozomal transmembran proteinlerinden LAMP2 gibi proteinler rol oynar (Ravikumar ve ark., 2010.)

2.7. Hücre Sağkalım Yolağı

Ökaryotik hücreler, apoptozisin baskılanabilmesi için birtakım baskılayıcı faktör olarak rol oynayan proteinlere veya hücre-hücre temasından gelen sağkalım sinyallerine bağımlıdır. Hücreler dışarıdan gelen sağkalım sinyalleri ile aktif olarak engellenmezse, ölüme apoptozis yolu ile gitmektedir. Hücrelerin sağkalımından sorumlu başlıca iki yolak vardır: Fosfatidil inositol 3 kinaz (PI3K /Akt) ve MAPK (mitojenle aktifleştirilen protein kinaz) (Perego ve ark., 2010; Pazarbaşı ve ark., 2011) (Şekil 2-13).



Şekil 2-13: PI3K-PTEN-Akt yolağı (Molinari ve Frattini, 2013).

2.7.1. Fosfatidil İnositol 3 Kinaz (PI3K /Akt) Yolağı

Fosfatidil inositol 3 kinazlar (PI3K); hücre büyümesi, metabolizma, proliferasyon, glukoz dengesi ve vezikül oluşumuyla ilişkili protein aileleridir. Protein sentezinde ve apoptozisin önlenmesinde önemli rolü vardır. Fosfatidil inositol 3 kinaz enzimi,

membranda bulunan fosfatidil inositol (PI), PI(4)P ve PI(4,5)P'yi (fosfatidil inositol mono ve difosfat), fosfolipitlerini fosforile ederek sırasıyla PI3P, PI(3,4)P'ye PI(3,4,5)P'ye dönüştürür.

PI3-kinaz/Akt yolağı, hücre sağkalımını uyarmaktan sorumlu ana sinyal iletimi yolağıdır. Sitokinler ve büyüme faktörleri, reseptör protein-tirozin kinazları aktive ederek PI3 kinaz aktivasyonunu sağlar. Aktive olan PI3 kinaz da Akt'yi fosforile ederek, hücre zarına yerleşmesini sağlar. Böylece hücre zarına yerleşen Akt, apoptozis baskılayıcıları fosforilleyerek hücre sağkalımına katkıda bulunur. Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN ise, PIP3 oluşumunu inhibe ederek, negatif düzenleyici rol oynar (Chang ve ark., 2003; Perego ve ark., 2010; Pazarbaşı ve ark., 2011) (Şekil 2-11).

2.7.2. MAPK (Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz) Yolağı

MAPK'lar, eksternal sağkalım sinyallerinin (örn., büyüme faktörleri), hücre nukleusuna iletilmesinde rol alan kilit aktörlerdir. MAPK'lar, hücre dışı uyaranlarla metabolizma, sağkalım ve apoptozis gibi süreçlere ait efektör genlerin transkripsiyonu sağlar. MAPK, diğer protein kinazların, fosfolipazların, hücre iskeleti elemanlarının ve transkripsiyon faktörlerin downstream efektörüdür. MAPK sinyal yolu, normal hücrelerde olduğu gibi kanser hücrelerinde de proliferasyon için gerekli olan RAF, MEK ve ERK proteinlerinden meydana gelmektedir. Geniş bir aralıkta yer alan çok çeşitli diğer ekstra ve intraselüler uyaranlarca da aktive edilebilir. Hücre proliferasyonu esnasında PI3K yolağı, MAPK yolağının tamamlayıcısı olarak gereklidir. Hücre proliferasyonunun büyüme faktörleri tarafından uygun bir şekilde uyarılması, bu iki yolağın koordineli bir şekilde aktivasyonu ile olur (Brozovic ve Osmak, 2007; Perego ve ark., 2010; Pazarbaşı ve ark., 2011).

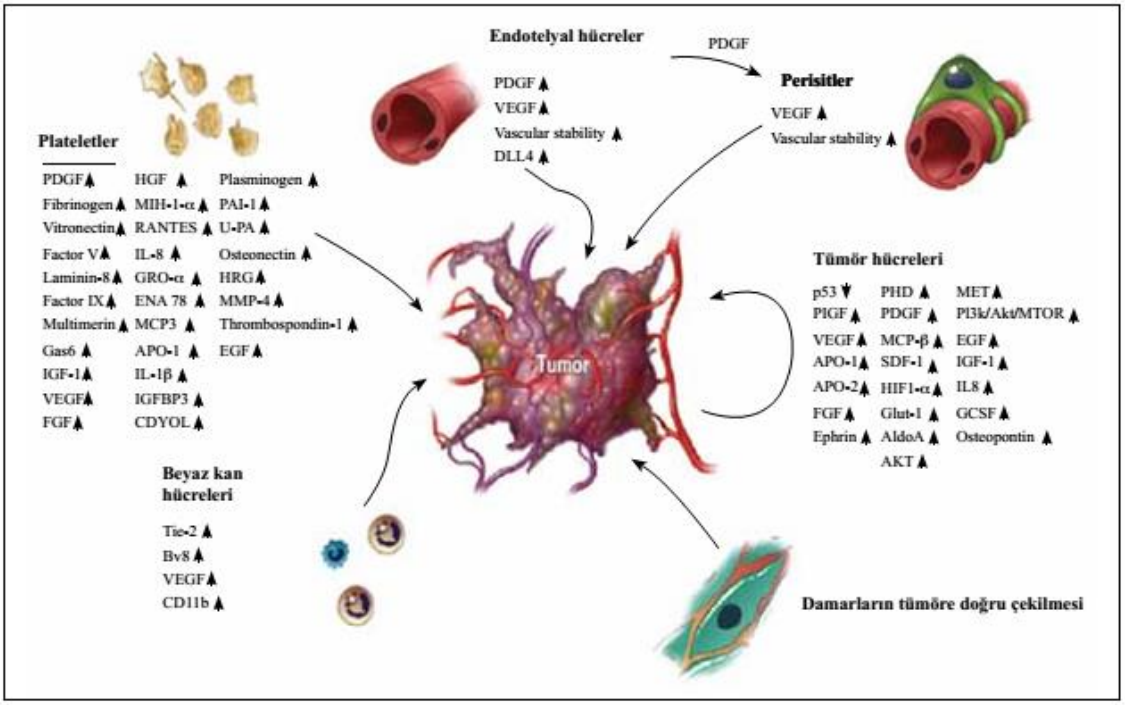
2.8. Anjiyogenez

Anjiyogenez, var olan damar sisteminden yeni kan damarlarının şekillendiği, sıkı bir şekilde düzenlenen bir mekanizmadır (Brower, 1999). Bu süreç, gelişme ve yara iyileşmesi için fizyolojik açıdan önemlidir ve aynı zamanda romatoid artrit, ateroskleroz ve kanser gibi hastalıkların da prognozunda önemli bir yer kaplar (Battegay, 1995; Paper, 1998). Bu gibi durumlarda mücadele etmek ve tedavi stratejileri geliştirebilmek için normal ve anormal anjiyogenezin mekanizmasını anlamak gerekir. Fizyolojik ve patolojik olarak gözlenen anjiyogenez, benzer hücresel süreçlerini ve moleküler sinyal yolaklarını

kullanır. Sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından stimüle edilir (Friedlander ve ark., 1995).

Anjiyogenez, endoteliyal hücre proliferasyonu, hücre dışı matriks bariyeri boyunca kemotaktik endotel hücre migrasyonu ve kapiller tüplerin oluşumu aşamalarını içerir. Bu aşamalar, anjiyogenik faktörler tarafından yönetilmektedir (Yoo ve Kwon, 2013).

Anjiyogenik faktörler, koşullara göre farklılık gösterir. Yara iyileşmesi sırasında von Willebrand faktör, fibronektin ve fibrin gibi maddeler, damar bazal membranında eksprese olurken, düz kas hücrelerinde ve endoteliyal hücrelerde adezyon reseptörleri olan integrin ailesi eksprese olmaktadır. Tümör anjiyogenezinde ise, damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF-α), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), tümör nekroz faktör-α (TNF-α), epidermal büyüme faktörü (EGF), plasental büyüme faktörü (PGF), granülosit koloni sitimüle edici faktör (GCSF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), interlökin-8, angiostatin ve angiogenin gibi tümörden salgılanan faktörlerü endoteliyal hücreler üzerinde özel reseptörler gibi davranır ve tümör gelişimini provoke ederek, tümör prognozunda oldukça önemli olan metastazlara sebep olur (Nishida ve ark., 2006; Chen ve Tseng, 2007) (Şekil 2-14).



Şekil 2-14: Anjiyogenez sürecinde rol oynayan hücreler ve salgıladıkları moleküller (Aktaş ve Akbulut, 2014).

Anjiyogenik faktörlerin upregüle olması, tümör anjiyogenezi için yeterli değildir. Bunun için anjiyogenez mekanizması üzerinde etkili olan negatif regülatörlerin veya damar

büyümesini önleyicilerin etkilerinin de baskılanması gerekir (Dameron, ve ark., 1994). Yapılan çalışmalar sonunda, trombospondin-1/2 (TSP-1/2), angiostatin, endostatin, vasostatin, tumstatin, platelet faktör-4 (PF4), antianjiyogenik antitrombin III, prolaktin 16-kD fragment, 2-metoksiöstradiol, metalloproteinaz inhibitörleri (TIMPs), interferon-alfa/beta/gamma (IFN $\alpha/\beta/\gamma$), interlökin-12 (IL-12), IP-10, Ang-2 gibi bir grup proteinin, endotel hücresinin büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Anjiyogenez inhibitörleri, epiteliyal hücrelerin proliferasyonunu ve migrasyonunu engeller ve hücreyi apoptozise yönlendirir (Yoo ve Kwon, 2013). Bu nedenle, anjiyogenezin istenmediği durumlarda, anjiyogenez inhibitörleri aktive edilerek, hastalığın prognozunun değiştirilmesi hedeflenir (Ferrara ve Kerbel, 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium Mix with L-glutamine, Gibco, New York, ABD

- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Ham's F-12 50/50 Mix with L-glutamine, Gibco, New York, ABD

- F-12K Medium (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium), ATCC Manassas, Virginia, ABD

- Fötal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco, New York, ABD

- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100X), Gibco, New York, ABD

- Esansiyel olmayan aminoasit (100X) Gibco, New York, ABD

- Endoteliyal hücre büyüme tamamlayıcısı, Sigma Aldrich, St. Louis, ABD

- Heparin sodyum tuzu Sigma Aldrich, St. Louis, ABD

- Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS), Sigma, St. Louis, ABD

- % 0,25 Tripsin-Etilendiamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD

- Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries, İsrail

- 0.2 µM filtre, PES, steril, Corning New York, ABD

- Dimetil sülfoksit (DMSO), AMRESCO, Solon, ABD

- TRIS (Base), Ultra Pure BioShop, Kanada

- Sodium chloride (NaCl), Millipore, Bedford, MA, ABD

- M3547-1G Mangiferin, Sigma Aldrich, St. Louis, ABD

- Taxol 30 mg/5 ml, Bristol Myers Squibb

- iBlot 2 Transfer Stacks, nitrocellulose, regular size, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD

- Nonfat Dry milk, Cell Signalling Technology, The Netherlands

- Nupage %4-12 Bis tris gel, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD

- WesternBright ECL HRP substrate, Advansta Menlo Park, ABD

- Biçinkoninik Asit Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD

- Antioksidan, Invitrogen, CA, ABD

- Tween-20, AMRESCO, Solon, ABD

- SDS Molecular Biology grade, BioChemica Applicham, Almanya

- RIPA lysis buffer (1X), Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, ABD

- SDS running buffer, Nu-PAGE, 20X, Invitrogen, CA, ABD

- Tris-base, Scharlau, Barcelona, İspanya

- ß-merkaptoetanol, Merck, Schuchard, Almanya

- Agarose, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD

- Racemic (±)-thalidomide; Sigma-Aldrich, Chemie Gmbh Munich, Almanya

- ATP Bioluminescent Somatic Cell Assay Kit, Sigma, Steinheim, Almanya

- Matrijel, Corning Costar, New York, ABD

- İnsan umblikal ven endotel hücreleri (HUVEC- CRL-1730) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC), Manassas, Virginia, ABD

- Ehrlich Asit hücreleri (EAC), İ. Ü. Aziz Sancar Deney Hayvanları Üretim Merkezi, Türkiye

- Su bazlı kapatıcı, Thermo Scientific,

- UltraVision Large Volume Detection System: Anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use), Lab Vision/Thermo Scientific, TP-125-HL,

- Detection System Large Volume AEC Substrate System, Lab Vision/Thermo Scientific, TA-125-HA.

- Antikor sulandırıcı, Lab Vision/Thermo Scientific, TA-125-UD

- ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit, Millipore, S7101, S7101, Chemicon International; Darmstadt, Germany

- PCNA, Sc-56, Santa Cruz

- Aktif kaspaz-3, NB100-56113, Novus B.

- Kırılmış PARP, ab32064, Abcam

- AKT, NBP1-69923, Novus B.

- PTEN, NB100-92219, Novus B.

- LC3-A, 4599S, Cell Signaling Tech., MA, ABD

- LC3-B, 3868S, Cell Signaling Tech., MA, ABD

- ATG5, 12994S, Cell Signaling Tech., MA, ABD

- p62, ab91526, Abcam

3.1.2. Sarf Malzemeler

- 25 cm^2, 75 cm^2 ve 150 cm^2'lik flasklar, Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belçika

- 6, 24 ve 96 kuyucuklu hücre kültürü kabı, Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belçika

- 2,5ml, 5ml ve 10ml'lik enjektörler, Becton Dickinson, New Jersey, ABD

-10µl'lik pipet uçları, SSIBIO, California, ABD

-100µl'lik pipet uçları, SSIBIO, California, ABD

-1000µl'lik pipet uçları, SSIBIO, California, ABD.

-15 ml'lik ve 50 ml'lik falkon, ISOLAB, Wertheim, Almanya

-0,5 ve 1.5 ml'lik santrifüj tüpleri, SSIBIO, California, ABD

-10 ve 25 ml'lik serolojik pipet, Sarstedt Nümbrecht, Almanya

- 2 ml'lik cam pastör pipetler, Marienfeld Lauda-Königshofen, Almanya

- Thoma lamı, Bright-Line, Hausser Scientific Horsham, PA, ABD

- 96-well Microplate Luminometer, Bio-Tek, Winooski, VT, ABD

3.1.3. Cihazlar

-Spektrofotometre, FLASHScan S12, Analytic Jena, Almanya

-Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D

-Luminometre, FL×800 Mikroplate Floresans Okuyucu

-I-Blot I jel transfer cihazı, Invitrogen, CA, ABD

-CO_2 inkübatörü, Sanyo, Japonya

-Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya

-Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye

-Steril kabin, ESCO, Singapur

-Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya

-Inverted mikroskop, Olympus CKX41 Japonya

-Aspiratör, Rocker 300, Tayvan

-Santrifüj, Rotina 35R, Almanya

-10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belçika

-0,5-5ml pipet, Brand,

-10 ml pipet, Eppendorf, Hamburg, Almanya

- Seri pipetör, Repeater M4, Eppendorf, Hamburg, Almanya

-5-5µl Transferpipet, Thermo Scientific,

-Stereo-mikroskop, Leica, Wetzlar, Almanya

-Görüntüleme sistemi, Leica Application Suite, Las V4.7, Leica, Wetzlar, Almanya

- Işık mikroskobu, Olympus BX53F, Tokyo, Japonya

- Görüntüleme sistemi, Olympus DP21

- Histokinet, Leica TP 1020 ve Leica EG 1160; Leica, Wetzlar, Almanya

- Mikrotom, Leica RM2155; Leica, Wetzlar, Almanya

- Etüv, FN 500, Nüve

- Sıcak su banyosu, BM 15, Nüve

3.1.4. Deney Hayvanları

-7-8 haftalık, ortalama ağırlıkları 24±2 gram arasında değişen, 78 adet Balb/c dişi fare (İ. Ü. Aziz Sancar Deney Hayvanları Üretim Merkezi).

- Periton içerisinde Ehrlich Ascites Carsinoma (EAC) olan 1 adet Balb/c dişi fare (İ. Ü. Aziz Sancar Deney Hayvanları Üretim Merkezi).

3.2. Metot

3.2.1. İn vitro Çalışmalar

3.2.1.1.Hücre Kültürü

Ehrlich Ascites Carsinoma (EAC) hücreleri sitotoksisite ve western blot yöntemlerinde kullanılmak üzere İ. Ü. Aziz Sancar Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edildi. İnsan umblikal ven endotel hücreleri (HUVEC- CRL1730) sitotoksisite ve tüp formasyon testlerinde kullanılmak üzere, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den (Manassas, Virginia, ABD) temin edildi.

3.2.1.1.1. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

EAC hücreleri, Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) besiyeri (Gibco, ABD) içine %10 fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, ABD), %1 Penisilin-Streptomisin (P/S) solüsyonu (Gibco, ABD) ve %1 Minimum Essential Medium Non-Essential Aminoasit (MEM-NEAA) (Gibco, ABD) eklenerek hazırlanan besiyeri içinde kültüre edildi. HUVEC hücreleri ise, F-12K (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium) (ATCC, ABD) besiyeri içerisine %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin (P/S) solüsyonu 0,1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde, heparin sodyum tuzu (Sigma Aldrich, ABD), 0,03 mg/ml endoteliyal hücre büyüme tamamlayıcısı (ECGS) (Sigma Aldrich, ABD) eklenerek hazırlanan besiyeri içerisinde kültüre edildi.

3.2.1.1.2. Hücre soylarının Stoktan Çıkartılması

Donmuş HUVEC stok hücrelerini çoğaltmak için, kriyo tüpler içerisinde bulunan hücre stokları, -86 ^{o}C'deki buzdolabından alınarak, hızlı bir şekilde sıcak su banyosunda çözüldü. Çözülen hücre süspansiyonu; 5 ml olacak şekilde %10 FBS ve %1 P/S içeren RPMI besiyeri bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Santrifüj tüpü 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve hücrelerden süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre peleti, 1 ml besiyeri ile sulandırılarak hücrelerin süspansiyon haline gelmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu, içerisinde 5 ml besiyeri bulunan 25 cm^2'lik hücre kültürü kapları (flask) (Thermo Scientific, USA) içerisine alınarak, 37 ^{o}C'ye ayarlı, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi.

3.2.1.1.3. Hücre Soylarının Pasajlanması

Hücre pasajlama işlemi, hücreler ortalama %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında gerçekleştirildi. Öncelikle, flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından, hücre

artıkları ve besiyeri içeriğinde bulunan serumun uzaklaştırılması amacıyla 25 cm^2'lik flaskın içerisine 1XPBS'ten 2 ml ilave edildi (75 cm^2'lik flask için 4 ml) ve flask yüzeyi PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS, flask içerisinden uzaklaştırıldı. Ardından hücreleri yapıştıkları yüzeyden kaldırmak amacıyla, %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonundan 0,5 ml flask içerisine eklendi (75 cm^2'lik için 1 ml) ve hücreler yaklaşık 5 dakika inkübatör içerisinde bekletildi. Flask yüzeyinden ayrıldıkları inverted mikroskop ile belirlenen hücreler, tripsinin hücre membranına zarar vermesini engellemek amacıyla, uygulanan tripsinin yaklaşık on katı miktarla yıkanarak 15 ml'lik falkonlara aktarıldı ve 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı uzaklaştırılarak hücre peleti, hücre yoğunluğuna ve hücrelerin büyüme hızına göre uygun miktarda besiyeri ile sulandırıldı ve yeni bir 75 cm^2'lik flask içerisine aktarıldı. Hücreler istenilen yoğunluğa (sayıya) ulaşıncaya kadar 37 ^oC'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

3.2.1.1.4. Hücre Stoklanması

Hücre soylarının pasajlanması işleminde olduğu gibi, istenilen yoğunluğa ulaşan hücreler flask yüzeyinden %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla kaldırıldıktan sonra santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücrelerin üzerindeki süpernatant kısmı uzaklaştırılarak, pelet üzerine hücre yoğunluğuna göre hücre dondurma besiyeri (5 ml DMSO + 5 ml FBS + 40 ml DMEM) eklendi ve pipetaj yapılarak hücrelerin tek tek dağılması sağlandı. Işığa hassas olan hücre dondurma besiyeri ile süspanse edilen hücreler, her bir kriyovial başına 1-1,5 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve kriyovialler -86 °C'ye kaldırıldı.

3.2.1.1.5. Hücrelerin Sayımı

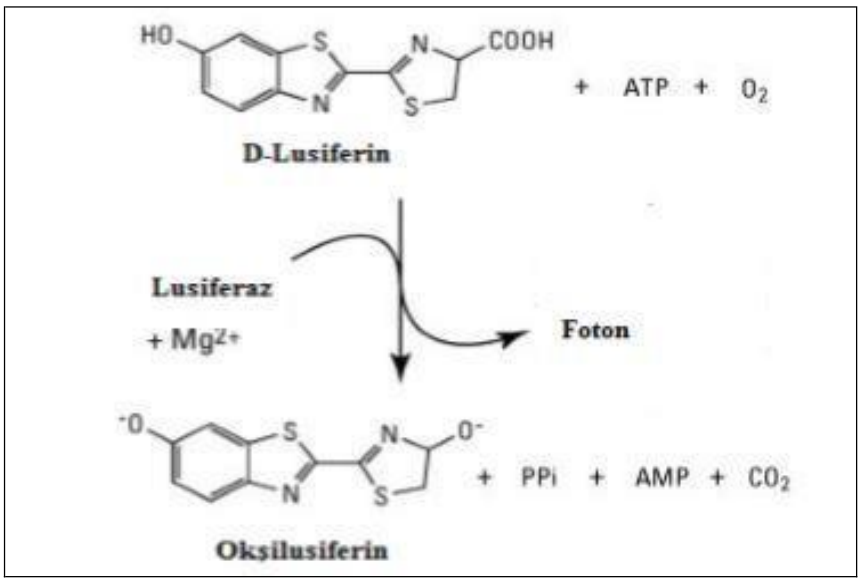
Tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla flask yüzeyinden ayrılan hücreler, 15 ml'lik falkon içerisinde 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre peletinin yoğunluğuna göre besiyeri ile pelet sulandırıldı. Bu oluşan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ve 96 kuyucuklu bir hücre kültürü kabının boş bir kuyusuna eklendi. Üzerine 10 µl tripan mavisi (Biological Industries, İsrail) eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karışmaları sağlandı. Ardından bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına çift taraflı olarak aktarıldı ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı, sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

3.2.1.2. ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu

ATP yöntemi, lüminesans bazlı metodolojiye bağlı olarak teknolojik açıdan diğer sitotoksisite testlerine göre daha gelişmiştir ve *in vitro* sitotoksisite ölçümlerini diğer yöntemlere göre çok daha hassas ve güvenilir yapabilmektedir. ATP, hücre içerisindeki en önemli enerji deposudur ve biyolojik sentez, sinyal iletimi, taşıma, hareket gibi süreçler için kullanılmaktadır. Hücresel ATP, hücre canlılığını ölçmede en hassas parametrelerden biridir. Bu yöntemin prensibi, hücre kültüründe büyütülen kanser veya normal hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İntrasellüler ATP içeriğinin seviyesi, yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde tercih edilen bir göstergedir (Maehara ve ark., 1987; Andreotti ve ark., 1995; Ulukaya ve ark., 2008;).

Kemoterapötik ajanlar veya mitokondriyal toksinler ile hücre içinde öldürücü hasarlar oluştuğunda, ATP seviyesi önemli ölçüde azalmaktadır. Bu amaçla, Mangiferin (6,25-300 μM) ve Paklitaksel'in (0,25-15,9 μM) tek başına ve kombinasyonları ile muamele edilmiş hücrelerdeki intraselüler ATP içeriği belirlenerek total hücre sayısı tespit edilmeye çalışıldı.

ATP yöntemi; lusiferinin, Mg^{+2} ve ATP varlığında lusiferaz enzimi ile oksilusiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmasına dayanmaktadır (Şekil 3-1). Lüminesans sinyal (ATP konsantrasyonu) ile hücre sayısı arasındaki ilişki doğrusaldır (Andreotti ve ark., 1995; Mueller ve ark., 2004).



Şekil 3-1: Lusiferin/lusiferaz biyolüminesans tepkimesi (Anonim 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

ATP testi için, Paklitaksel (0,25-15,9 µM) ve Mangiferin'in (6,25-300 µM) konsantrasyonları tek başına ve kombinasyon şeklinde, 3 tekrarlı ve 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına uygulandı. Ehrlich Asit ve HUVEC hücreleri sayılarak, 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ilave edildi. Ardından hücreler, 48 saat 37 °C, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu yöntem Ehrlich Asit ve HUVEC hücrelerinde 2 defa tekrar edildi.

Negatif kontrol (maksimum canlılık, muamele uygulanmamış hücre kontrolü) için, 200 µl besiyeri içerisine 5×10^3 hücre ekildi. Hücreler 37 °C'de %5'lik CO_2'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her kuyucuktan 150 µl atılarak, ATP kitinin (Sigma FLASC1KT Adenosine 5' triphosphate bioluminescent + somatic cell assay kit, St. Louis, MO) içinde yer alan hücre lizis tamponundan (2X) 50 µl eklendi ve hücre içerisindeki ATP'nin hücre dışına çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresini takiben, 50 µl hücre süspansiyonu, beyaz renkli 96 kuyucuklu ekim kaplarına aktarıldı ve ardından 50 µl/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi. Reaksiyon sonunda oluşan ATP miktarı (lusiferin-lusiferaz biyoluminesans reaksiyonu yardımıyla), ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, Winooski, USA) kullanılarak ölçüldü. Böylece Paklitaksel (0,25-15,9 µM), Mangiferin (6,25-300 µM) ve kombinasyonlarıyla muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin RLU değerlerine göre, bileşiklerin sitotoksik/sitostatik etkileri hakkında bilgi edinildi. % canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Denklem 1: % canlılık formülü

%Canlılık=[100×(Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması-kör ortalama)/(Kontrol hücre absorbansı ortalaması-kör ortalama)]

3.2.1.3. Western Blot Metodu

Bu yöntemle, Mangiferin ve Paklitakselin bireysel dozu ile kombinasyonuna maruz bırakılan hücrelerde değişen protein profili araştırıldı. Western blot analizleri için Ehrlich ascites hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına $7,5\times10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37 ºC, %5 CO_2'li ortamda inkübasyon sonunda Paklitaksel 3,98 µM ve Mangiferin 300 µM dozları ve kombinasyonları 100 µl içerinde olacak şekilde 48 saat süre ile uygulandı.

3.2.1.3.1. Western Blot Analizleri için Protein İzolasyonu

İlaç uygulamaları sonrasında hücrelerde, hücre ölümü (apoptozis, nekroptozis, otofaji) ile ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerini incelemek amacıyla, öncelikle EAC hücrelerinden total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Protein izolasyonu için Paklitaksel 3,98 µM ve Mangiferin 300 µM dozları ile kombinasyonları, 6 kuyucuklu platelere ekilen hücrelere uygulandı. 48 saat sonunda lizis işlemi, RIPA lizis tamponu ile yapıldı. Kuyucuklardaki hücreler kürete edildi, içerik falkonlara toplandı ve kuyucuklara 2 ml soğuk PBS eklenerek içerik tekrar ilgili falkonlara toplandı. Toplanan hücre lizatlarına +4 °C, 1000*xg*, 5 dakika santrifüj yapıldı. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 50 µl ($9x10^5$ hücre için) lizis tamponu eklendi [1 ml lizis tamponu (RIPA lysis buffer, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) için 10 µl 200 mM PMSF (Santa Cruz, CA, USA), 10 µl 100 mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz, CA, USA), 15 µl proteaz inhibitör kokteyli (Santa Cruz, CA, USA) eklendi. Solüsyon, karanlıkta hazırlandı]. Falkonlar 45 dakika +4 °C'de karanlıkta bekletildi ve bu süre içerisinde 2 defa (15 ve 30. dakikalarda) 10 saniye sonikasyon işlemi yapıldı. Süre bitiminde, lizat çözeltisi tamamen bir ependorf tüpüne aktarılarak +4 °C, 10.000*xg*, 30 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant, etiketlenmiş tüplere aktarıldı ve pelet uzaklaştırıldı. Hemen kullanılmayacak örnekler -20 °C'de saklandı.

3.2.1.3.2. Proteinlerin Biçinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Bikinkoninik asit (BCA) yöntemi. ile protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albümin (BSA) proteininin farklı konsantrasyonları (2, 1,6, 1,2, 0,8, 0,4 ve 0 mg) RIPA lizis tamponu ile hazırlanarak, bir standart eğri grafiği çizildi. Ölçüm için Pierce Biçinkoninik Asit Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) ve 96 kuyucuklu plate kullanıldı. Her bir kuyucuğa 10 µl hazırlanan standartlar ve konsantrasyonu bilinmeyen örnekler pipetlendi. Kuyucukların üzerine 190 µl çalışma çözeltisi (kit içeriğinde yer alan Reagent A ve Reagent B, 1:50 olacak şekilde hazırlandı) pipetlendi ve plate 30 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Ardından oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570 nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

3.2.1.3.3. SDS-PAGE ve Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması

Örnekler, istenen hacimlerde toplam protein miktarı hücre ölümü ile ilişkili proteinlerin analizleri için 20 µg olacak şekilde 0,5 ml'lik tüplere pipetlendi. Sample buffer (4X, Invitrogen, CA, USA) ve reducing agent (10X, Invitrogen, CA, USA) 1X olacak

şekilde 0,5 ml'lik tüplere eklendi. Protein denatürasyonu için çözeltiler ısı banyosunda 95 °C'de 7 dakika bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra SDS running buffer (Nu-PAGE, 20X, Invitrogen, CA, USA), doluluk sınırına kadar eklendi. Hazır jelde bulunan koruma sıvısı pipet yardımıyla al-ver yapılarak uzaklaştırıldıktan sonra, 500 µl antioksidan (Invitrogen, CA, USA) eklendi. Daha sonra, protein ladder (10 µl) ve örnekler kuyucuklara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonunda 45 dakika 150 V yürütme yapıldı. Elektroforez sonunda transfer işlemi için I-Blot I jel transfer cihazına (Invitrogen, CA, USA) sırasıyla anot bakır (+), jel, filtre kağıdı (ultra saf H_2O ile ıslatılır), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 7 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.2.1.3.4. Membranların Bloklanması ve Antikor Eklenmesi

3.2.1.3.4.1. Bloklama

%5'lik süt (Santa Cruz, CA, USA) çözeltisi 1X TBS (Tris buffer saline) içerisinde hazırlandı ve membran 60 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika 1X TBSile yıkama yapıldı.

3.2.1.3.4.2. Birincil Antikor

Uygun birincil antikor 1:1000 olacak şekilde %5'lik BSA veya %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4 °C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

3.2.1.3.4.3. İkincil Antikor:

Anti-Rabbit (Cell Signaling Tech., MA, ABD) 1:2000, anti-mouse (Cell Signaling Tech., MA, ABD) 1:2000 olacak şekilde, %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

3.2.1.3.4.4. Görüntüleme

Görüntüleme için; WesternBright ECL HRP Substrate (Advansta Menlo Park ABD) kullanıldı. Membranlar, hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkübe edildikten sonra, açığa çıkan kemiluminesans sinyal, Fusion FX-7 (Vilber Lourmat, Torcy, France) cihazı kullanılarak görüntülendi. Bu şekilde nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikorlar görüntülendi.

3.2.1.3.4.5. Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için, üretici firmanın (Cell Signaling Tech., MA, ABD) Western blot yeniden işaretleme (reprobing) protokolü kullanıldı. Stripping solüsyonu hazırlamak için; 100 ml ultra saf su içerisine 0,76 g Tris-base (Scharlau, Barcelona, İspanya), 2 g SDS (BioChemica Applicham, Almanya) ve 700 µl ß-merkaptoetanol (Merck, Schuchard, Almanya) eklendi (1X, pH:6,8). Membran, 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra, stripping solüsyonu eklenerek 150-300 rpm, 37 °C'de 45 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 4 kez 5 dakika 1X TBS-T ile yıkama yapılarak, bloklama aşamasına geçildi.

3.2.1.4. HUVEC Tüp Formasyon Testi

Tüp oluşum testi, anjiyogenezde rol oynayan genleri veya yolakları belirlemek için kullanılan hızlı ve nicel bir yöntemdir. İlk olarak 1988 yılında gerçekleştirilen bu test, endotel hücrelerinin, anjiyogenik sinyallere cevap olarak hızla bölünme ve göç etme yeteneğini koruduğu tespit edilmiştir. Daha sonraları, endoteliyal hücrelerin membran ekstrakt matriksi üzerinde farklılaşma ve tüp yapıları oluşturmaları için uyarılabildikleri saptanmıştır. Bu tüpler, birleşmiş kompleksler vasıtasıyla birbirine bağlanmış endotel hücreleri ile çevrelenmiş bir lümen içerir. Tüp oluşumu, anjiyogenik uyarıların miktarına ve türüne bağlı olarak 2-6 saat içinde hızlı bir şekilde oluşur. Çeşitli endotel hücreleri (3B-11, SVEC4-10 ya da primer endotel insan hücresi HUVEC) tüp formasyon testinde kullanılabilir. Kullanılan hücre tipine ve endotel hücrelerin transforme veya nontransforme özelliklerine göre, tüp oluşum testi için uygun zaman ve koşullar optimize edilir. Bu doktora çalışmasında tüp oluşumu testi için insan endotel hücresi HUVEC (CRL-1730) kullanıldı. Tüp oluşumunun değerlendirilmesinde tüm uygulamalar 3 kez tekrarlandı.

3.2.1.4.1. Hücre Kültürü Kaplarına Matrijelin Yerleştirilmesi

Bu amaçla, 96 kuyucuklu hücre kültürü kabı 50 µl/kuyucuk olacak şekilde matrijel ile kaplanarak 37 ºC'de 30 dakika bekletildi.

3.2.1.4.2. Besiyerleri, Hücreler ve Maddelerin Hazırlanması

Yaklaşık 4 saat %1 serum (FBS) içeren F-12K (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium) besiyeri içinde serum açlığına maruz bırakılan HUVEC hücreleri $1,5x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde %1 oranında serum içeren besiyeri içinde hazırlandı. Mangiferin (12,5- 50 µM), Paklitaksel (1,99- 15.93µM) ve kombinasyonları yine %1 FBS

içeren besiyeri içerisinde hazırlandı ve kuyucuklara uygulandı. Hücre süspansiyonu ve bileşikler eş zamanlı olarak matrijel ile kaplanmış olan kuyucuklar içerisine ekildi. Negatif kontrol olarak sadece besiyeri, pozitif kontrol olarak ise 200 μM Talidomid kullanıldı.

3.2.1.4.4. Tüp Oluşumunun Değerlendirilmesi

Uygulanan maddelerin etkilerine göre HUVEC'lerin tüp oluşturma yetenekleri 0.,2., 4., 8., 12. ve 16. saatlerde kantitatif olarak inverted mikroskopta incelendi ve fotoğraflandı.

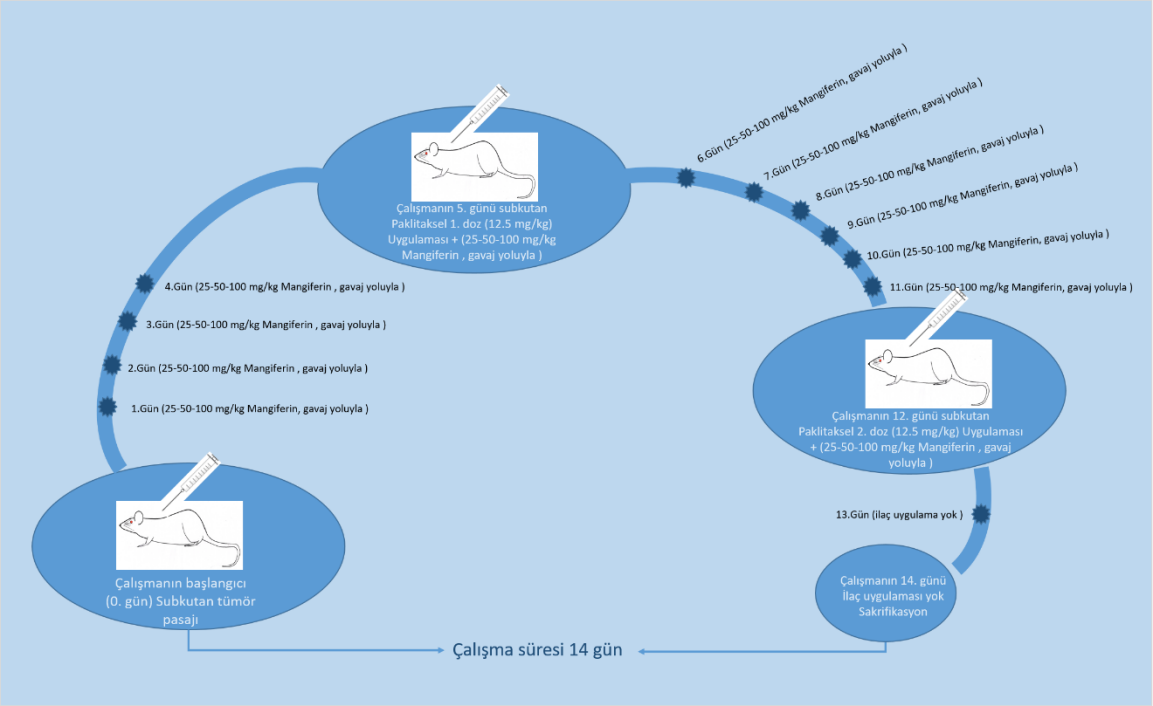
3.2.2. *In vivo* Çalışmalar

3.2.2.1. Ehrlich Asit Solid Tümör Oluşturma Modeli

-8 haftalık, ortalama ağırlıkları 24±2 gram arasında değişen, 78 adet Balb/c dişi fare (İ. Ü. Aziz Sancar Deney Hayvanları Üretim Merkezi).

- Periton içerisinde Ehrlich Ascites Carsinoma (EAC) olan 1 adet Balb/c dişi fare (İ. Ü. Aziz Sancar Deney Hayvanları Üretim Merkezi).

Bu tez çalışmasında hayvanlar üzerinde yapılacak olan tüm işlemler için gerekli izinler 12/04/2017 tarih ve 141199 sayılı etik kurul kararı ile İÜ HADYEK'ten alınmıştır. Çalışmada, ortalama 25 gram ağırlığında 78 adet dişi Balb/c ve 1 adet Ehrlich ascites tümörü (EAC) pasajlanmış olan fare İ. Ü. Aziz Sancar Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edilmiştir. Öncelikle, pasajlı hayvanın peritonundan hücreler enjektörle alınarak, Thoma lamında eritrosit formüle göre sayımı yapıldı ve serum fizyolojikle sulandırılıp solid tümör oluşturmak amacıyla farelerin ense bölgesine deri altı olarak inokülasyon yapıldı. Çalışmamızda, toplam 78 adet genç-erişkin dişi Balb-c fare kullanıldı ve 2,5 x10^6 EAC (Ehrlich Ascites Carcinoma) tümör hücresi tüm hayvanların ense bölgesine deri altı olarak inoküle edildi. Tüm gruplara tümör pasajı subkutan olarak aynı günde yapıldı ve bu gün 0. gün olarak kabul edildi. İnokülasyondan sonraki 5. ve 12. günlerde sırasıyla kontrol grubuna distile su, Paklitaksel gruplarına 12,5 mg/kg Paklitaksel (Bristol Myers Squibb) (Armutak ve ark., 2015) subkutan enjeksiyonla uygulandı. 25-50-100 mg/kg dozlarındaki Mangiferin, her gün deney gruplarına gavaj olarak verilirken, kontrol gruplarına ise distile su gavaj olarak verildi (Şekil 3-2). Mangiferin'in suda çözünmesinin bir problem yaratmaması nedeniyle, distile su içerisinde çözülerek hayvanlara verildi (Kammalla ve ark., 2015). Deney süresinin sonu olan 14. günde hayvanlar servikal dislokasyon yoluyla sakrifiye edildi.



Şekil 3-2: Deney akışının günlere göre şematik görünümü.

Tüm gruplara tümör pasajı subkutan olarak 0. günde yapıldı. 25-50-100 mg/kg dozlarındaki Mangiferin her gün deney gruplarına gavaj olarak verilirken, kontrol gruplarına ise distile su gavaj olarak verildi. İnokülasyondan sonraki 5. ve 12. günlerde, sırasıyla kontrol grubuna distile su, Paklitaksel gruplarına 12,5 mg/kg Paklitaksel (Bristol Myers Squibb) subkutan enjeksiyonla uygulandı.

Elde edilen tümörler kumpasla ölçüldü ve sonuçlar "$[(\text{Kısa çap})^2 \times (\text{Uzun çap})] / 2$" formülüne yerleştirilerek, tümör volümleri hesaplandı (Armutak ve ark., 2015). Deney grupları ve her gruba ait birey sayısı Tablo 3-1'de verilmiştir.

Tablo 3-1: Deney grupları ve her gruba ait birey sayısı.

Gruplar	Hayvan Sayısı
Kontrol	8
Paklitaksel 12,5 mg/kg, S.C.	10
Mangiferin 25 mg/kg, gavaj	10
Mangiferin 50 mg/kg, gavaj	10
Mangiferin 100 mg/kg, gavaj	10
Paklitaksel 12,5 mg/kg, S.C.+ Mangiferin 25 mg/kg, gavaj	10
Paklitaksel 12,5 mg/kg, S.C. + Mangiferin 50 mg/kg, gavaj	10
Paklitaksel 12,5 mg/kg, S.C.+ Mangiferin 100 mg/kg, gavaj	10

3.2.2.1.1. Histolojik İnceleme

Tümör dokusu örnekleri, %10'luk tamponlu formalinde 16 saat fikse edildi. Fiksasyonun ardından, doku örnekleri tam otomatik doku takip cihazında (Histokinet) (Leica TP 1020 ve Leica EG 1160; Leica, Wetzlar, Germany) alkol (70^o, 80^o, 90^o, 96^o ve 100^o) ve kloroform serilerinde işlem gördükten sonra (42-44 °C) yumuşak parafine alındı ve ardından 56- 58 °C'lik parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2155; Leica, Wetzlar, Germany) ile alınan 4-µm kalınlığındaki kesitler, histolojik inceleme için Hematoksilen & Eosin ile boyandı.

3.2.2.1.2. İmmünohistokimyasal İnceleme

İmmünohistokimyasal çalışmalar için dokulardan alınan kesitler pozitif yüklü lamlara yapıştırıldı. Alınan kesitlerde PCNA, aktif kaspaz-3, kırılmış PARP, BAX, AKT, PTEN, LC3-A, LC3-B, ATG5 ve p62'nin immünoreaktiviteleri, Streptavidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (StrepABC) yöntemi ile immünohistokimyasal olarak gösterildi.

3.2.2.1.2.1. Streptavidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (StrepABC) Yöntemi

3.2.2.1.2.1.1. Deparafinizasyon ve Dehidrasyon Uygulaması

Parafin bloklardan alınan 4-µm kalınlığındaki kesitler bir gece 37 °C'de tutuldu. Parafin kesitler ksilolde 3 defa 15'er dakika tutularak deparafinize edildi, ardından azalan alkol serilerinden (100^o, 96^o, 90^o, 80^o ve 70^o) geçirilerek dokulara dehidrasyon işlemi yapıldı ve kesitler saf su ile yıkandı.

3.2.2.1.2.1.2. Antijen İyileştirme Uygulaması

Antijen iyileştirme, formalinde fikse edilen dokuların, immün boyama öncesi, distile su, metal tuzları ya da diğer kimyasallardan hazırlanmış bir solüsyonda yüksek sıcaklıkta ısıtılması işlemidir. Formalin fiksasyonu sırasında oluşan çapraz bağların neden olduğu epitop maskelenmesini ortadan kaldırmak amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir. Bu işlem için lamlar mikrodalgada 10 dakika (2x5 dakika) boyunca sitrat tamponu (pH 6.0) içerisinde 700 Watt'ta kaynatıldı ve ardından 25 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Sitrat tamponunun ardından saf suda yıkanan lamlar 9-10 dakika (3x3 dakika) boyunca tuzlu fosfat tamponunda (PBS; 0.01 M; pH 7.4) bekletildi.

3.2.2.1.2.1.3. Hücre Permeambilizasyonunu Arttırma Uygulaması

İntrasellüler protein tespiti için oldukça önemlidir. Bu amaçla, Tween 20, Triton X-100 gibi deterjanlar kullanılır. Kesitler 10 dakika boyunca % 0,2'lik Triton X-100'de inkübe edildi ve ardından PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı.

3.2.2.1.2.1.4. Endojen Peroksit Blokaj uygulaması

Non-spesifik antijenik bölgeleri bloke etmek için kullanılır. Kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda, metanolde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2)'de (Merck, 1.08597) endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 15 dakika karanlık ortamda tutulduktan sonra, 3 defa 5'er dakika PBS'le yıkandı. Ardından kesitlere 10 dakika %5'lik süt tozu-distile su karışımı uygulandı ve takiben dokular 20 dakika boyunca PBS ile yıkandı.

3.2.2.1.2.1.5. Bloklayıcı Serum Uygulaması

PapPen ile daire içine alınan kesitler, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bloklayıcı serum (Thermo Scientific, TA-125-UB; Deutsch, Germany) ile muamele edildi.

3.2.2.1.2.1.6. Primer Antikor uygulaması ve inkübasyon

Primer antikor uygulamadan önce, bloklayıcı serum doku üzerinden uzaklaştırıldı ve havuzların bütünlüğü kontrol edildikten sonra kesitlere primer antikor uygulaması yapıldı. Kesitler, PCNA (1:100 dilüsyonla, + 4° bir gece), aktif kaspaz-3 (1:1500 dilüsyonla, oda ısısında), kırılmış PARP (1:100 dilüsyonla, + 4° bir gece), AKT (1:150 dilüsyonla, + 4° bir gece,), PTEN (1:100 dilüsyonla, + 4° bir gece), LC3-A (1:750 dilüsyonla, oda ısısında), LC3-B (1:750 dilüsyonla, oda ısısında), ATG5 (1:300 dilüsyonla, + 4° bir gece) ve p62 (1:300 dilüsyonla, + 4° bir gece), antikor sulandırıcı ile sulandırılarak inkübe edildi. Antikor uygulamasının ardından kesitler, PBS'de 10 dakika yıkandı.

3.2.2.1.2.1.7. Sekonder Antikor Uygulaması

Primer antikor uzaklaştırıldıktan sonra, kesitler oda sıcaklığında 30 dakika boyunca keçiden elde edilmiş biyotinlenmiş anti-tavşan sekonder antikoru ile inkübe edildi. Ardından kesitler, PBS ile 10 dakika yıkandıktan sonra, peroksidaz ile işaretli streptavidin'de oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve tekrar PBS ile 10 dakika yıkandı.

3.2.2.1.2.1.8. Kromojen Substrat ile Reaksiyonun Gözlenmesi

Mikroskopta reaksiyonun izlenmesi temel alınarak, renkli reaksiyonun gözlenmesi için kesitler, yaklaşık 10-12 dakika boyunca 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) ile karanlık ortamda inkübe edildi ve ardından reaksiyonun durdurulması amacıyla distile su ile 5 dakika yıkandı.

3.2.2.1.2.1.9. Zıt boyama ve Kesitlerin Su Bazlı Kapatıcıyla Kapatılması

Zıt boyama aşaması için kesitler 1 dakika boyunca Mayer hematoksilen ile boyandı. Kesitler, 5 dakika boyunca musluk suyunda yıkandıktan sonra su bazlı kapatıcı ile kapatıldı. Negatif kontrol kesitlerine, primer antikor yerine antikor sulandırıcı uygulaması yapıldı. Kesitler, Olympus BX53F Tokyo-Japon mikroskobu ile incelendi ve Olympus DP21 kamera görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğrafları çekildi.

3.2.2.1.3. DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi (TUNEL Yöntemi)

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick endlabeling) yönteminde görülen tepkimede yalnızca apoptozise uğramış hücre nukleusları ve apoptotik badiler boyanır. Yöntem, TdT'nin polideoksinükleotid polimerinin sentezlerinin ardından DNA'nın 3-OH uçlarına özgün olarak bağlanması esasına dayanır. TUNEL yöntemi, DNA kırıklarının *in situ* olarak tespit edilmesini sağlar (Dinçel ve Kul, 2016).

Formalin ile fikse edilmiş tümör dokusu örnekleri, 58 °C'lik parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile alınan 4-µm kalınlığındaki kesitler, pozitif yüklü lamlara yapıştırıldı. Kesitlerdeki apoptotik hücreler, ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Kit (S7101, Chemicon International; Darmstadt, Germany) kullanılarak, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) yöntemi ile gösterildi (Taşkin ve ark., 2009).

3.2.2.1.3.1. Deparafinizasyon ve Dehidrasyon

Parafin bloklardan alınan 4-µm kalınlığındaki kesitler bir gece 37 °C'de tutuldu. Parafin kesitler, ksilolde 3 defa 15'er dakika tutularak deparafinize edildi, ardından azalan alkol serilerinden (100^o, 96^o, 90^o, 80^o ve 70^o) geçirilerek dokulara dehidrasyon işlemi yapıldı ve kesitler saf su ve devamında PBS ile yıkandı.

3.2.2.1.3.2. Antijen Retrieval Uygulaması

Kesitler, 20 µg/ml konsantrasyonlu proteinaz K stok solüsyonunun 1'e 1000 oranında sulandırılması ile 37 ºC etüvde 15 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kesitler distile su ile 5 dakika, ardından PBS ile 10 dakika boyunca yıkandı.

3.2.2.1.3.3. Endojen Peroksit Blokaj Uygulaması

Kesitlerdeki endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için, kesitlere karanlık ortamda 5 dakika boyunca PBS'de hazırlanmış %3'lük H_2O_2 (Merck, 1.08597) uygulandı. Uygulamadan sonra kesitler, 10 dakika PBS ile yıkandı.

3.2.2.1.3.4. Dengeleme Tamponu ve TdT Enzimi Uygulaması ve Enzimin Durdurulması

37 ºC etüvde dengeleme tamponunda 10 dakika tutulan kesitlere, 1,5 saat süresince TdT enzimi uygulaması yapıldı. TdT enziminin reaksiyonunu durdurmak için, kitin içerisinde bulunan durdurma/yıkama tamponu oda sıcaklığında 10 dakika uygulandıktan sonra, kesitler PBS ile 3 dakika (3x1 dakika) boyunca yıkandı. Negatif kontrol preparatında TdT enzim yerine distile su kullanıldı

3.2.2.1.3.5. Anti-digoksigenin Uygulaması

Anti-digoksigenin peroksidaz enzimi 45 dakika boyunca 37 °C etüvde uygulandı. Ardından PBS'de 8 (4x2) dakika yıkandı.

3.2.2.1.3.6. Kromojen Substrat ile Reaksiyonun Gözlenmesi

Kesitlere kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substratı uygulandı. 30-45 dakikalık uygulamanın ardından, kahverengi olarak gözlenen reaksiyon, distile su ile durduruldu.

3.2.2.1.3.7. Zıt boyama ve Kesitlerin Entellan İle Kapatılması

Kesitler, bu aşamadan sonra zıt boya olarak kullanılan metil yeşili ile boyandıktan sonra, distile su ile çalkalandı ve hızlı bir şekilde bütanolden geçirildi. Toplam 15 dakikalık (3x5 dakika) ksilol uygulaması ile saydamlaştırılan lamlar, entallan ile kapatıldı. Preparatlar, Olympus BX53F Tokyo-Japon mikroskobu ile incelendi ve Olympus DP21 kamera görüntüleme sistemi kullanılarak kesitlerin fotoğrafları çekildi.

3.2.2.1.4. H-Skor ve Apoptotik İndeksin Hesaplanması

3.2.2.1.4.1. İndeksin (%) Hesaplanması

PCNA, aktif kaspaz-3 ve kırılmış PARP indeksi (%), iki kör gözlemci tarafından bağımsız olarak, grupların tüm bireylerinde, 40x büyütmede, ortalama 800-1000 hücre içeren rastgele seçilmiş 8-10 farklı alanda sayım yapılarak belirlendi. Hücre sayımının ardından indeks (%): 100 x (pozitif hücre nukleus sayısı / toplam hücre nukleus sayısı) formülü kullanılarak hesaplandı.

Apoptotik indeks yüzdesi, iki kör gözlemci tarafından bağımsız olarak, grupların tüm bireylerinde, 40x büyütmede, ortalama 800-1000 hücre içeren rastgele seçilmiş 8-10 farklı alanda sayım yapılarak belirlendi. Hücre sayımının ardından apoptotik indeks = 100 x (TUNEL pozitif hücre nukleus sayısı / toplam hücre nukleus sayısı) formülü kullanılarak hesaplandı (Taşkin ve ark., 2009).

3.2.2.1.4.2. Histolojik Skor (H-Skor)'un Hesaplanması

Tüm değerlendirmeler, iki kör gözlemci tarafından bağımsız olarak yapıldı. Yapılan immünohistokimyasal boyama sonrasında tümör dokusundan alınan doku kesitlerindeki reaksiyonlar, grupların tüm bireylerinde, 40x büyütmede ve rastgele seçilmiş 8-10 farklı alanda değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak BAX, AKT, PTEN, LC3-A, LC3-B, ATG5, ve p62 reaksiyonunu analiz etmek için, kesitlerdeki immün pozitif hücreler histolojik skor (H-Skor) kullanılarak değerlendirildi. Pozitif boyanan hücreler sayılarak, boyanma yoğunluğuna bağlı olarak derecelendirildi: 0, negatif; 1, hafif; 2, orta; 3, yoğun olarak kabul edildi. Her bir dokuda H-Skor değeri, H-Skor = Pi (i+1) formülüyle belirlendi. Formülde, "i" yoğunluk skoru (derecesi), "Pi" ise boyanma gösteren hücrelere ait yüzde değeridir (Senturk ve ark., 1999; Taskin ve ark., 2008).

3.2.2.1.5. İstatistiksel Analiz

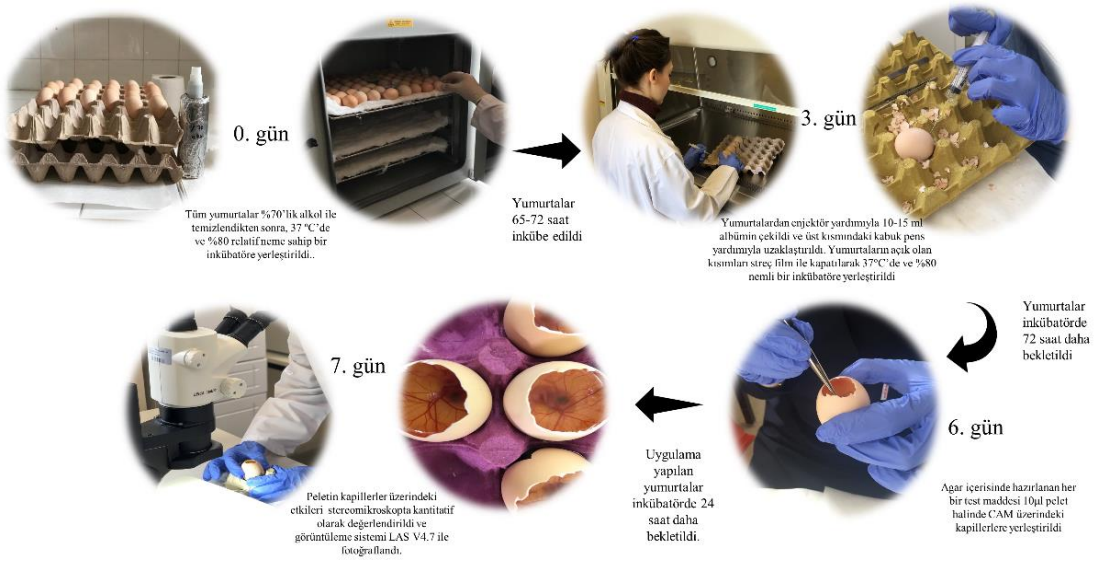
Çalışma sonunda elde edilen bulgular, ortalama±standart hata (S.E.M.) olarak hesaplandı. Grupların dağılımının normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben, istatistiksel değerlendirme GraphPad Prism (GraphPad Prism Version 6 Software Program, San Diego, CA) Programı kullanılarak, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrasında Tukey çoklu karşılaştırmalar testi ile yapıldı. $P<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.2.2. CAM (Civciv Koryoallantaoik Membran) Yöntemi

CAM (Civciv Koryoallantaoik Membran), ekstraembriyonik bir membran olup, hem anjiyogenez hem de antianjiyogenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. CAM'ın civciv için fizyolojik önemi, gaz alış-verişinde esas solunum organı olması ve atık ürünler için mesane görevi görmesidir (Melkonian ve ark., 2002). CAM yöntemi, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar arasındaki boşluğu doldurabilecek bir ara model olarak kabul edilir; *in vitro* modellerde olduğu gibi benzer hücresel toksisite modellerini göstermek dışında, CAM ayrıca memeli modellerindekine benzer doku tepkileri vermektedir. CAM çalışması bu özelliğiyle 3R kuramının birinci ilkesi olan "replacement" ilkesine uyumludur (Valdes ve ark., 2002; Lokman ve ark., 2012). CAM yöntemi, 1956'dan bu yana metastaz ve kanser araştırmalarında kullanılmaktadır (Ribatti ve ark., 2001). CAM yöntemi, biyomateryallerin ve çeşitli etken maddelerin etkilerinin incelenmesinde, özellikle anjiyogenez çalışmalarında sıklıkla kullanılan kolay bir *in vivo* modeldir (Leng ve ark., 2004). Aynı zamanda CAM testi, yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir, ucuz ve kullanımı kolaydır. New England Tıp Merkezinin Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi (IACUC) ve Ulusal Sağlık Enstitüleri Birliği 14. güne ulaşmamış bir civciv embriyosunun acı hissetmeyeceğini raporlamış ve 14 günü aşmayan CAM çalışmalarının etik kısıtlama olmaksızın, protokol onayı almadan gerçekleştirilmesine izin vermiştir. CAM metodu, 3R kuramının hayvanların acı çekmesini en aza indirmek ve hayvan refahını artırmak anlamına gelen "refinement" ilkesi ile ayrıca, hayvan kullanımını en aza indirmek anlamına gelen "reduction" ilkesiyle de uyumludur (Kue ve ark., 2015).

Bu çalışmada 1967'de D'arcy ve Howard, 2002'de Bürgermeister ve arkadaşları tarafından rapor edilen deney protokolü kullanıldı (D'Arcy ve Howard, 1967; Bürgermeister ve ark., 2002), (Şekil 3-3).

CİVCİV KORYOALLANTAOİK MEMBRAN (CAM) TESTİ PROTOKOLÜ



Şekil 3-3: CAM (Civciv Koryoallantaoik Membran) testi protokolü

3.2.2.2.1. Uygulanan Madde Dozları ve Agar İçerisinde Hazırlanışı

Mangiferin 5 mg/ml, 2,5 mg/ml ve 1,25 mg/ml, Paklitaksel 0,3 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,075 mg/ml ve 0,0375 mg/ml dozları HUVEC sitotoksisite testi sonuçları referans alınarak belirlendi. Standart kontrol maddeleri için ise, (±)-talidomit (5 mg/ml) kullanıldı. Agar %2,5 (a/h) olacak şekilde hazırlandı. Uygulanan tüm dozlar Tablo 3-3'de verilmiştir. Sıvı agar katılaşmadan, uygulanan maddeler içerisinde süspansiyon haline getirildi ve uygulama yapılmak üzere sıcak su banyosuna kaldırıldı. Standart kontrol maddeleri için 10, her test maddesi için 15 adet yumurta kullanıldı. CAM deneyinde standart pozitif kontrol madde olarak (±)-talidomit, negatif kontrol kör olarak agar kullanıldı. Tüm deneyler 3 kez tekrarlandı.

3.2.2.2.2. Yumurtaların İnkübatöre Yerleştirilmesi

Deneyde, Mudurnu Piliç-Pak Tavuk Gıda San. ve Tic. A. Ş.'den temin edilen döllenmiş yumurtalar kullanıldı. Tüm yumurtalar %70'lik alkol ile ıslatılmış pamukla dikkatlice temizlendikten sonra, 37 ºC'de ve %80 relatif neme sahip bir inkübatöre yerleştirildi. Yatay pozisyonda yumurtalar 65-72 saat inkübe edildi. Embriyoların çepere yapışmasına engel olmak üzere, bu süre içerisinde yumurtalar belirli periyotlarla dikkatlice çevrildi.

Tablo 3-2: CAM deneyinde uygulanan tüm dozlar ve konsantrasyonları.

	Konsantrasyon (µg/pelet)
(±)-Thalidomide (Pozitif kontrol) 5 mg/ml	50
Agar (kör)	%2,5, w/v
Mangiferin 5 mg/ml	50
Mangiferin 2,5 mg/ml	25
Mangiferin 1,25 mg/ml	12,5
Paklitaksel 0,3 mg/ml	3
Paklitaksel 0,15 mg/ml	1,5
Paklitaksel 0,075 mg/ml	0,75
Paklitaksel 0,0375 mg/ml	0,375
Mangiferin 5 mg/ml + Paklitaksel 0,0375 mg/ml	50 + 0,375
Mangiferin 2,5 + Paklitaksel 0,0375	25 + 0,375
Mangiferin 1,25 mg/ml + Paklitaksel 0,0375 mg/ml	12,5 + 0,375

3.2.2.2.3. Yumurtalardan Albümin Çekilmesi ve Açılması

65-72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda yumurtalar dikkatlice etüvden çıkarıldı. Önce enjektör yardımıyla, yumurtanın alt kısmından 10-15 ml albümin (yumurta akı) çekildi. Daha sonra yumurtaların üst kısmındaki (daha dik ve sivri olan kısım) kabuk ve zar, ince bir pens yardımıyla uzaklaştırıldı. Yumurtaların açık olan kısımları streç film ile kapatılarak koruma altına alındı. Tüm yumurtalar 37°C'de ve %80 nemli bir inkübatöre yerleştirildi ve 72 saat daha bekletildi.

3.2.2.2.4. CAM Üzerine Numunelerin Uygulanması

72 saat sonra, taze olarak hazırlanmış her bir maddeden 10-15 adet pelet eşit sayıda yumurtadaki CAM üzerindeki kapillerlere yerleştirildi. Daha sonra üzeri streç film ile kapatılarak, belirtilen koşullarda 24 saat daha inkübe edilmek üzere etüve konuldu.

3.2.2.2.5. Antianjiyogenik Etkinin Değerlendirilmesi ve Skorlama

Bu süre sonunda madde içeren peletin kapillerler üzerindeki etkileri stereomikroskop yardımıyla kantitatif olarak ve vasküler yoğunluk analiz programı ile değerlendirildi.

3.2.2.2.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Embriyolu yumurtalar stereomikroskopta kantitatif olarak değerlendirildi ve görüntüleme sistemi LAS V4.7 ile fotoğraflandı. Bileşiklerin CAM üzerindeki anjiyogenik etkileri Tablo 3-4 (Bürgermeister ve ark., 2002)'deki skor sistemine göre değerlendirildi. Anjiyogenik etki için ortalama skor değerleri formüle göre hesaplandı (Bürgermeister ve ark., 2002; Krenn ve Paper, 2009).

Tablo 3-3: CAM Üzerinde Anjiyogenik Etkinin Değerlendirilmesi İçin Kullanılan Skor Değerleri

Skor	Etki	İzlenim/Açıklama
< 0.5	Yok	Normal embriyo oluşumu.
0.5-0.75	Zayıf	Kapiller damarsız alan yok. Kapillerlerin yoğunluğu azalmış, ancak peletten çok daha geniş değil.
> 0.75-1	Kuvvetli	Kapillersiz alan az veya kapiller yoğunluk belirli bir alanda azalmış. Etki, pelet alanının iki katından fazla değil.
> 1	Çok kuvvetli	Peletin etrafında, en az iki kat mesafe olacak şekilde kapillersiz alan mevcut. Antianjiyogenik etki.

Denklem 2: Değerlendirme İçin Kullanılan Formül

$$\textbf{Ortalama Skor} = \frac{[\textbf{Yumurta sayısı (skor}>1)\textbf{x2}]+[\textbf{Yumurta sayısı (Skor}>0{,}75-1)x1]}{\textbf{Skorlanan yumurta sayısı}}$$

3.2.2.2.7. İstatistiksel Analiz

Üç tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları, ortalama±standart hata (S.E.M.) olarak verildi. İstatistiksel değerlendirmeler, GraphPad Prism (GraphPad Prism Version 6

Software Program, San Diego, CA) Programı kullanılarak, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrasında Tukey çoklu karşılaştırmalar testi ile yapıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grafiklerin çizimleri için, GraphPad Prism (GraphPad Prism Version 6 Software Program) Programı'ndan yararlanıldı.

4. BULGULAR

4.1. *İn Vitro* Bulgular

4.1.1. ATP Canlılık Testi Bulguları

4.1.1.1. EAC Canlılık Testi Bulguları

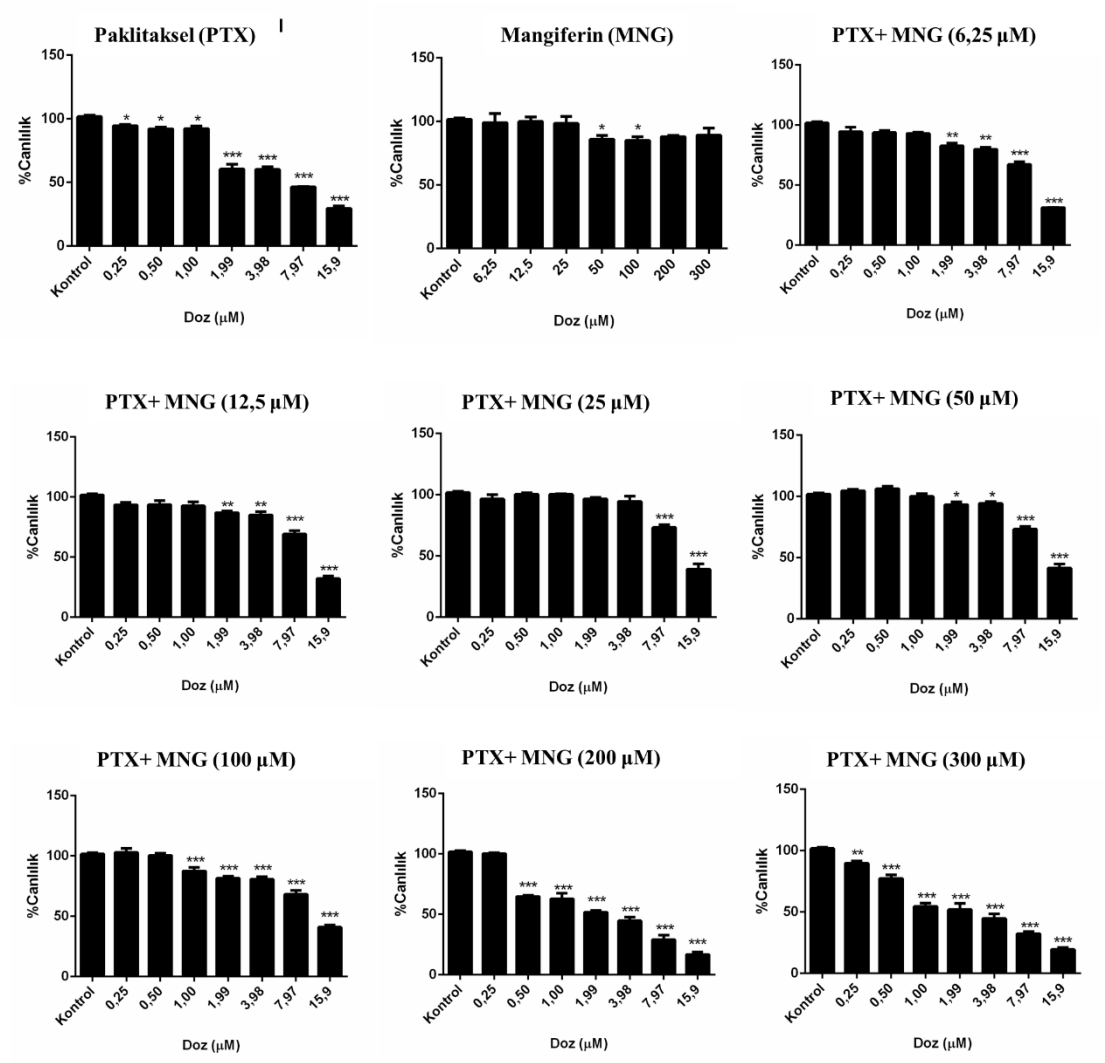
EAC fare meme tümör hücrelerinde Mangiferin (6,25 µM-300 µM), Paklitaksel (0,25 µM-15,9 µM) ve kombinasyonlarının etkisini incelemek üzere, ATP sitotoksisite canlılık testi yapıldı. ATP testinden 48 saat sonra elde edilen tüm sonuçlar kontrol grubuna göre karşılaştırılarak değerlendirildi. EAC hücreleri üzerine Mangiferin'in tek başına uygulandığı tüm dozlarda 48 saat sonra % canlılık değerlerinde bir değişim görülmedi. Sadece Mangiferin uygulamasında 50 µM ve 100 µM dozlarda kontrole göre anlamlı bir azalma görüldü (sırasıyla % canlılık; 78,95 - 76,02 ve $P<0,05$). Paklitaksel'in tek başına uygulandığı 0,25 µM - 0,50 ve 1 µM konsantrasyonlarda (sırasıyla % canlılık; 89,28 - 85,36 - 88,98 ve $P<0,05$), 1,99 µM - 3,98 µM - 7,97 µM ve 15,9 µM konsantrasyonlarda ise % canlılık değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görüldü (sırasıyla % canlılık; 60,45 - 60,21 - 46,45 - 29,54 ve $P<0,001$). ATP verilerine göre; EAC hücrelerinde Paklitaksel ve Mangiferin'in sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC50 (kontrol hücrelerine kıyasla Paklitaksel ya da Mangiferin ile muamele sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri Tablo 4-1'de verilmiştir.

Tablo 4-1: EAC hücrelerinde Paklitaksel ve Mangiferin'in ATP canlılık testi sonuçlarına göre 48 saat tedavi süresindeki IC50 ortalama±standart sapma değerleri.

IC50 (µM)	Paklitaksel	Mangiferin
EAC	6,9±0,1	>300

Paklitaksel'in yükselen dozları ile Mangiferin 6,25 µM ve 12,5 µM konsantrasyon dozları kombine edildiğinde, kontrol grubuna göre % canlılık değerlerinin 1,99 µM - 3,98 µM ($P<0,01$) ve 7,97 µM - 15,9 µM konsantrasyonda anlamlı olduğu görüldü ($P<0,001$). Mangiferin 6,25 µM ve 12,5 µM ile Paklitaksel 15,9 µM konsantrasyonları kombine edildiğinde % canlılık değerlerinin azaldığı görüldü. Mangiferin 25 µM ile Paklitaksel 7,97 µM ve 15,9 µM konsantrasyonda kombine edildiğinde, % canlılık değerlerinde anlamlı düşme görüldü (sırasıyla; 72,96 - 39,12 ve $P<0,001$). Mangiferin'in 50 µM ve Paklitaksel 1,99 µM - 3,98 µM ile yapılan kombinasyonlarında kontrole göre anlamlı azalma görüldü ($P<0,05$). Mangiferin 50 µM ile 7,97 µM ve 15,9 µM Paklitaksel kombinasyonunun

kontrol grubuna göre % canlılık değerlerinde anlamlı azalmaya neden olduğu görüldü (sırasıyla; 73,13 - 41,47 ve P<0,001). Mangiferin'in 100 µM ve Paklitaksel'in 1 µM - 1,99 µM - 3, 98 µM konsantrasyonlarının kombinasyonunun kontrol grubuna göre % canlılık değerlerini benzer şekilde anlamlı olarak azalttığı görüldü (sırasıyla % canlılık; 87,52 - 81,55 - 80,69 ve P<0,001). Mangiferin'in 6,25-100 µM aralığındaki dozları Paklitaksel'in 1,99-7,97 µM aralığındaki konsantrasyonları ile kombine edildiğinde, bu kombinasyondaki % canlılık oranlarının, tek başına Paklitaksel uygulanan dozlara göre yükseldiği görüldü (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: EAC tümör hücrelerine ait Paklitaksel, Mangiferin ve kombinasyonlarının ATP sitotoksisite canlılık testi sonuçları.

*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

Uygulanan Mangiferin 200 µM ve 300 µM konsantrasyonları ile Paklitaksel'in yükselen dozları kombine edildi ve tüm kombinasyonların % canlılık değerleri belirlendi. Kontrol

grubu ile karşılaştırıldığında, Mangiferin 200 µM dozunun Paklitaksel 0,50 µM ile kombinasyondan itibaren % canlılık değerlerinin tüm Paklitaksel kombinasyonlarında anlamlı olarak azaldığı görüldü (P<0,001). Mangiferin 300 µM dozunda ise, Paklitaksel'in 0,25 µM dozundan itibaren yükselen dozların hepsinde % canlılıkta kontrol grubuna göre azalma görüldü (P<0,01; P<0,001). Yüksek olan Mangiferin 200 µM ve 300 µM dozlarında Paklitaksel'in 3,98 µM konsantrasyonunda canlılık değerlerinin benzer şekilde %50'nin altına düştüğü belirlendi (sırasıyla % canlılık; 44,68 - 44,70 ve (P<0,001).

4.1.1.2. HUVEC Canlılık Testi Bulguları

HUVEC hücre soyu üzerinde Mangiferin, Paklitaksel ve kombinasyonlarının etkisini belirlemek üzere ATP sitotoksisite canlılık testi yapıldı. Mangiferin 6,25 µM-300 µM, Paklitaksel 0,25 µM-15,9 µM ve kombinasyonları HUVEC hücrelerinde uygulandı. Buna göre 48 saatlik uygulama sonunda Mangiferin'in tek başına uygulandığı dozların hepsinde % canlılık oranının azalmadığı ve tüm gruplarda bu sonucun benzer olduğu görüldü (Şekil 4-2). Paklitaksel'in tek başına uygulandığı 1 - 7,97 µM dozlarında, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma ile birlikte, canlılığın %65 ve üzerinde olduğu belirlendi. Paklitaksel'in yalnızca en yüksek dozu olan 15,9 µM konsantrasyonda % canlılığın azaldığı ve 2,94 olduğu tespit edildi (P<0,001, Şekil 4-2). ATP verilerine göre; HUVEC'lerde Paklitaksel ve Mangiferin'in sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla Paklitaksel ya da Mangiferin ile muamele sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri Tablo 4-2'de verilmiştir.

Tablo 4-2: HUVEC hücrelerinde Paklitaksel ve Mangiferin'in ATP canlılık testi sonuçlarına göre 48 saat tedavi süresindeki IC_{50} ortalama±standart sapma değerleri.

IC50 (µM)	Paklitaksel	Magniferin
HUVEC	10,8±9,5	>300

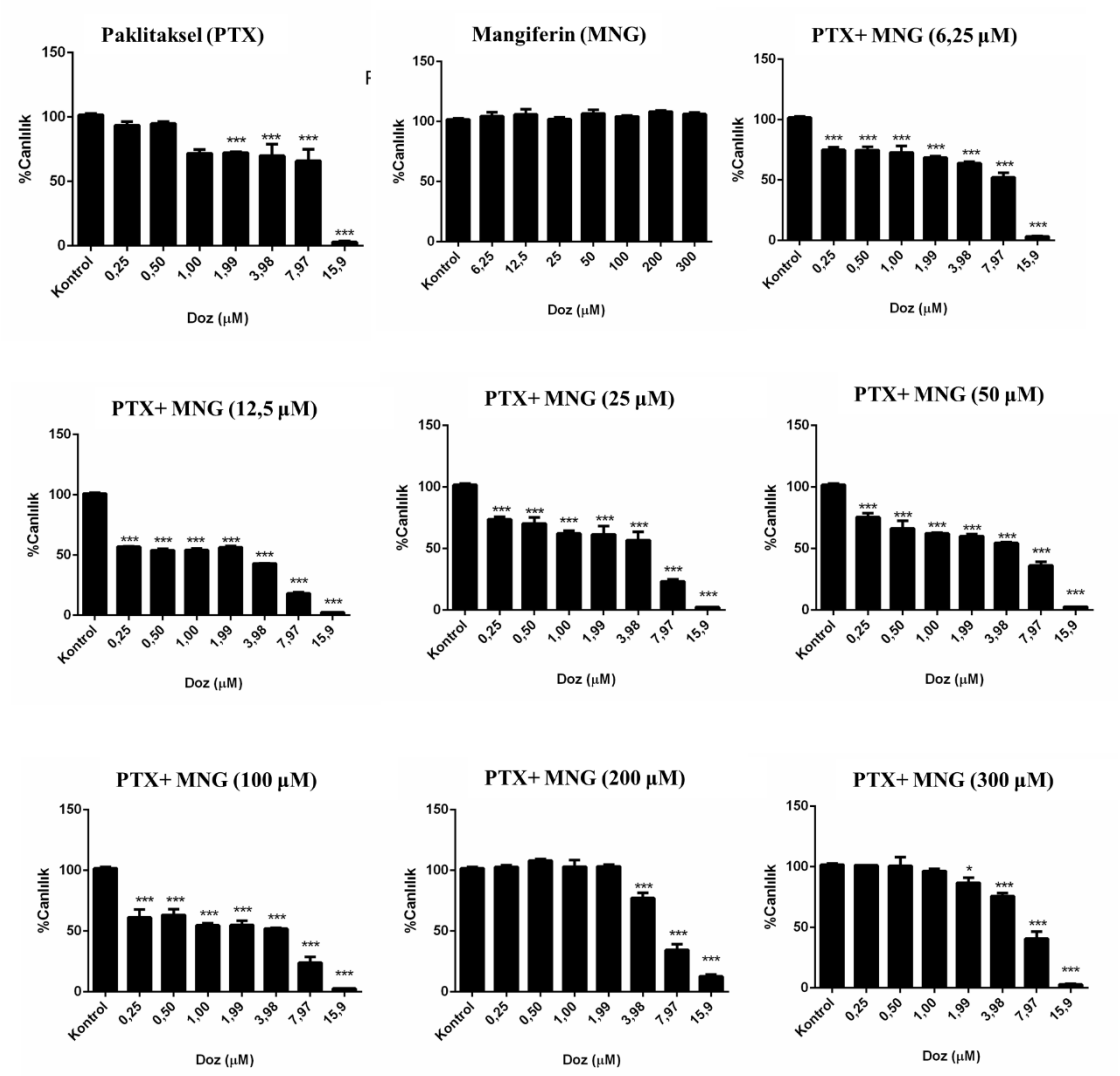
Paklitaksel'in yükselen dozları ile Mangiferin'in 6,25 µM dozu kombine edildiğinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görüldü (P<0,001). Mangiferin'in 12,5 µM ve Paklitaksel'in 0,25-0,50-1,00-1,99 µM konsantrasyonları ile yapılan kombinasyonlarda, kontrol grubuna göre % canlılık değerlerinde anlamlı bir azalma olduğu görüldü (sırasıyla 56,44; 54,23; 54,10 ;56,91 ve P<0,001). Mangiferin 12,5 µM ile Paklitaksel 3,98-7,97 ve 15,9 µM konsantrasyonlarının kombinasyonlarında ise % canlılık değerlerinin 50'nin altına indiği belirlendi (sırasıyla 43,06; 18,22; 2,54 ve P<0,001).

Mangiferin'in 25 ve 50 µM konsantrasyonları Paklitaksel'in yükselen dozları ile kombine edildiğinde ise, kontrol grubuna göre kombinasyon gruplarında % canlılık değerlerinde azalma görüldü. Ancak, Mangiferin 12,5 µM ile Paklitaksel kombinasyonu karşılaştırıldığında, bu kombinasyonların % canlılık değerlerinin daha yüksek olduğu gözlendi. Mangiferin'in 25 µM konsantrasyonunun, Paklitaksel'in yükselen dozları ile kombine edildiği gruplarda % canlılık değerleri sırasıyla 70,27; 73,66; 62,16; 61,47; 56,84; 23,29; 2,39 ve P<0,001'dir. Mangiferin'in 50 µM konsantrasyonu ile Paklitaksel kombinasyonlarının da, 25 µM konsantrasyon dozlarına benzer olduğu görüldü.

Mangiferin'in 100 µM dozunun Paklitaksel'in yükselen dozlarıyla kombinasyonundan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kontrole göre daha düşük % canlılık değerleri belirlendi. Mangiferin'in 100 µM ile Paklitaksel'in 7,97 µM dozunun kombinasyonunda, canlılığın %23,89 olarak kontrole göre anlamlı oranda azaldığı tespit edildi (P<0,001).

Mangiferin dozunun daha yüksek olduğu 200 µM ve 300 µM konsantrasyonlarının, düşük dozlarda Paklitaksel ile kombinasyonlarında ise ilginç bir şekilde kontrol grubuna göre % canlılık değerlerinin azalmadığı, tam tersine Paklitaksel'in tek başına uygulamasından daha da yüksek olduğu görüldü. Mangiferin 200 µM ve 300 µM dozlarının, yalnızca Paklitaksel'in yüksek dozları olan 7,97 ve 15,9 µM ile olan kombinasyonlarında % canlılık değerlerinin %50'nin altına indiği görüldü (P<0,001).

Paklitaksel'in 7,97 µM dozu ile Mangiferin'in 50 µM, 25 µM ve 12,5 µM dozları kombine edildiğinde, % canlılık değerlerinin benzer şekilde sırasıyla 36,13 - 23,29 - 18,22 olduğu ve kontrol grubuna göre azaldığı görüldü (Şekil 4-2). Ayrıca, düşük doz uygulama yapılan Mangiferin 12,5 µM ve Paklitaksel 3,98 µM dozlarında % canlılık değerinin 43,06 olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, Mangiferin'in düşük dozlarının Paklitaksel ile kombinasyonu % canlılık üzerinde etkili olmuştur. Mangiferin'in 200 ve 300 µM konsantrasyonları ile Paklitaksel'in yükselen konsantrasyonları kombine edildiğinde ise % canlılık değerlerinde artış gözlenmiştir.



Şekil 4-2: HUVEC hücre soyuna ait Paklitaksel, Mangiferin ve kombinasyonlarının ATP canlılık testi sonuçları.

*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

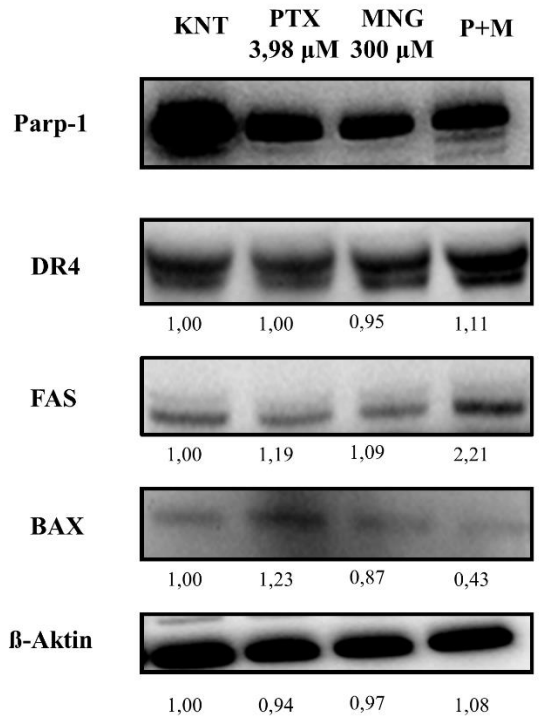
4.1.2. Western Blot Bulguları

Bu testte kullanılacak olan dozlar EAC hücrelerinde yapılan ATP sitotoksisite testi sonuçları doğrultusunda belirlendi. Paklitaksel 3,98 µM, Mangiferin 300 µM ve kombinasyonunun 48 saatlik tedavi sonrası EAC hücrelerindeki apoptozis, otofaji ve sağkalım yolakları üzerindeki protein ekspresyonlarındaki değişiklikler incelendi.

4.1.2.1. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonunun Apoptozis Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Gösterilmesi

EAC hücrelerinde Paklitaksel, Mangiferin ve kombinasyonunun 48 saatlik tedavi sonunda apoptozis üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla, apoptozis dışsal yolak

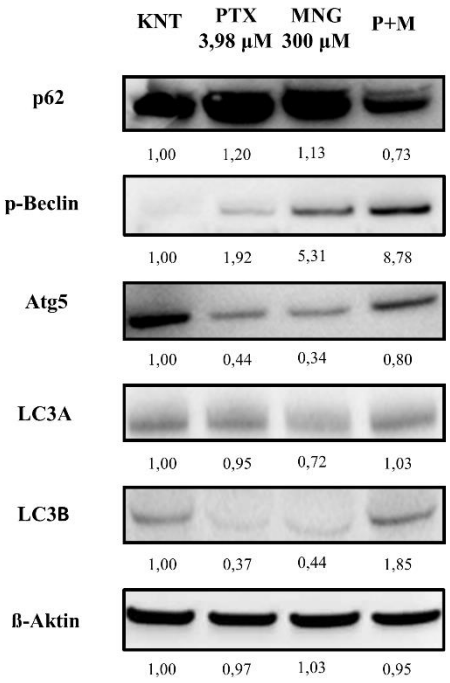
belirteçlerinden DR4 ve FAS, apoptozis mitokondriyal yolak belirteçlerinden BAX ve apoptozis varlığında kırılarak aktifleşen Parp-1 proteinlerinin ekspresyonları incelendi. DR4 ekspresyonunda tek başına Paklitaksel ve Mangiferin uygulamasında, kontrole göre önemli bir değişim gözlenmedi. Kombinasyon grubunda ise DR4 ekspresyonunda kontrole göre hafif bir artış görüldü. FAS ekspresyonu incelendiğinde, tek başına Paklitaksel ve Mangiferin uygulamasında kontrole göre az miktarda artış görüldü, ancak kombinasyon grubunda FAS ekspresyonunun kontrolün yaklaşık iki katı kadar arttığı görüldü. BAX ekspresyonu incelendiğinde, tek başına Paklitaksel grubunda kontrole göre arttığı görülürken, tek başına Mangiferin uygulamasında BAX ekspresyonunda kontrole göre azalma görüldü. Paklitaksel ve Mangiferin'in kombine edildiği grupta ise BAX ekspresyonunun kontrol grubunun yarısından daha az olduğu gözlendi. Parp-1 ekspresyonu incelendiğinde, tek başına Paklitaksel ve Mangiferin grubunda kontrole göre Parp-1 kırılması az oranda görülürken, kombinasyon grubunda Parp-1'in kontrole göre belirgin bir şekilde kırıldığı belirlendi (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: Paklitaksel (3,98 µM), Mangiferin (300µM) ve kombinasyonunun 48 saatlik tedavi sonrası EAC hücrelerinde DR4, FAS, BAX, Parp-1 ekspresyonları üzerine etkisinin western blot yöntemi ile belirlenmesi.

4.1.2.2. Paklitaksel, Mangiferin ve Kombinasyonunun Otofaji Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Gösterilmesi

EAC hücrelerinde Paklitaksel, Mangiferin ve kombinasyonunun 48 saatlik tedavi sonunda otofaji üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla, erken otofaji belirteci p-Beclin, otofagozom belirteçlerinden Atg5, LC3A, LC3B ve otofaji kargo proteini p62 ekspresyonları incelendi. p-Beclin ekspresyonunun tek başına Paklitaksel uygulamasında kontrolün yaklaşık 2 katına, tek başına Mangiferin uygulanan grupta kontrolün yaklaşık 5 katına çıktığı görüldü. Kombinasyon grubunun p-Beclin-1 ekspresyon düzeyi incelendiğinde ise, kontrolün 8 katı kadar arttığı görüldü. Grupların Atg5 düzeyleri incelendiğinde, Paklitaksel ve Mangiferin'in tek başına uygulandıkları grupta belirgin kontrole göre azalma görülürken, kombinasyon grubunda Atg5 ekspresyonu kontrole benzerdi. LC3A ekspresyonunda, tek başına Paklitaksel grubunda ve kombinasyon grubunda kontrol grubuna göre belirgin bir değişim olmazken, tek başına Mangiferin grubunda kontrole göre azalma görüldü. Tek başına Paklitaksel ve Mangiferin uygulaması LC3B ekspresyon düzeyini kontrolün yarısına indirirken, kombine edildiği grupta LC3B ekspresyon düzeyini kontrol grubunun yaklaşık iki katına çıkarmıştır (Şekil 4-4).

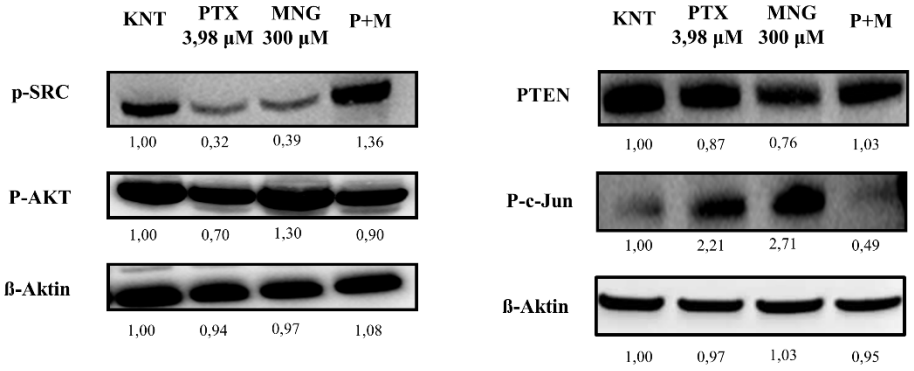


Şekil 4-4:Paklitaksel (3,98 µM), Mangiferin (300 µM) ve kombinasyonunun 48 saatlik tedavi sonrası EAC hücrelerindeki p-Beclin, Atg5, LC3A, LC3B ve p62 ekspresyonları üzerine etkisinin western blot yöntemi ile belirlenmesi.

p62 protein ekspresyonu incelendiğinde, tek başına Paklitaksel ve Mangiferin uygulamalarında kontrole göre az miktarda artış görülürken, iki maddenin kombinasyon uygulamasında p62 ekspresyon düzeyinde kontrole kıyasla azalma gözlendi (Şekil 4-4).

4.1.2.3. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonunun Sağkalım Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Gösterilmesi

EAC hücrelerinde Paklitaksel, Mangiferin ve kombinasyonunun 48 saatlik tedavi sonunda sağkalım yolağı üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla p-SRC, p-AKT, PTEN ve p-c-Jun ekspresyonları incelendi. p-SRC ekspresyonu, Paklitaksel ve Mangiferin uygulamalarında kontrol grubunun yaklaşık yarısı kadar azalırken, kombinasyon uygulamasında artış gözlendi. p-AKT protein ekspresyonları incelendiğinde, tek başına Paklitaksel ve ikili kombinasyon grubunda kontrole göre benzer şekilde azalırken, tek başına Mangiferin grubunda p-AKT ekspresyonu kontrol grubuna göre artmıştır. PTEN ekspresyonunun, tek başına Paklitaksel ve Mangiferin uygulamasında benzer şekilde azaldığı belirlenirken, kombinasyon grubunda kontrole göre arttığı görüldü. Tek başına Paklitaksel ve Mangiferin gruplarının p-c-Jun ekspresyonları incelendiğinde, kontrole göre belirgin artış gözlenirken, kombine edildiği grupta kontrol grubuna göre belirgin azalma görüldü (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: Paklitaksel (3,98 µM), Mangiferin (300 µM) ve kombinasyonunun 48 saatlik tedavi sonrası EAC hücrelerindeki p-SRC, p-AKT, PTEN ve p-c-Jun ekspresyonları üzerine etkisinin western blot yöntemi ile belirlenmesi.

4.1.3. Tüp Formasyon Testi Bulguları

Anjiyogenez, tümör büyümesinde önemli mekanizmalardan birisidir. Anjiyogenezin baskılanmasına yönelik tedavilerin geliştirilmesi, yeni ilaç ve bileşiklerin keşfi için önem arz etmektedir. Tez çalışmasında, Mangiferin, Paklitaksel ve kombinasyonlarının antianjiyogenik etkilerini görmek amacıyla HUVEC tüp formasyon

testi yapıldı. Bu testte kullanılacak olan dozlar, HUVEC ATP sitotoksisite testi sonuçları doğrultusunda belirlendi. Negatif kontrol olarak hücre besi yeri, pozitif kontrol olarak talidomit 200 µM kullanıldı. Mangiferin 12,5 µM, 25 µM ve 50 µM, Paklitaksel 1,99 µM, 3,98 µM, 7,96 µM ve 15,93 µM dozlarında tek başına uygulandı. HUVEC sitotoksisite dozları referans alınarak kombinasyon için Mangiferin'in 12,5 µM dozu seçildi ve Paklitaksel'in 0,5-15,93 µM aralığındaki dozları ile kombine edildi. Grupların tüp formasyon üzerine olan etkisi 0., 2., 4., 8., 12. ve 16. saatlerde incelenerek fotoğraflandı. Tüm değerlendirmeler, pozitif kontrol talidomide göre yapıldı.

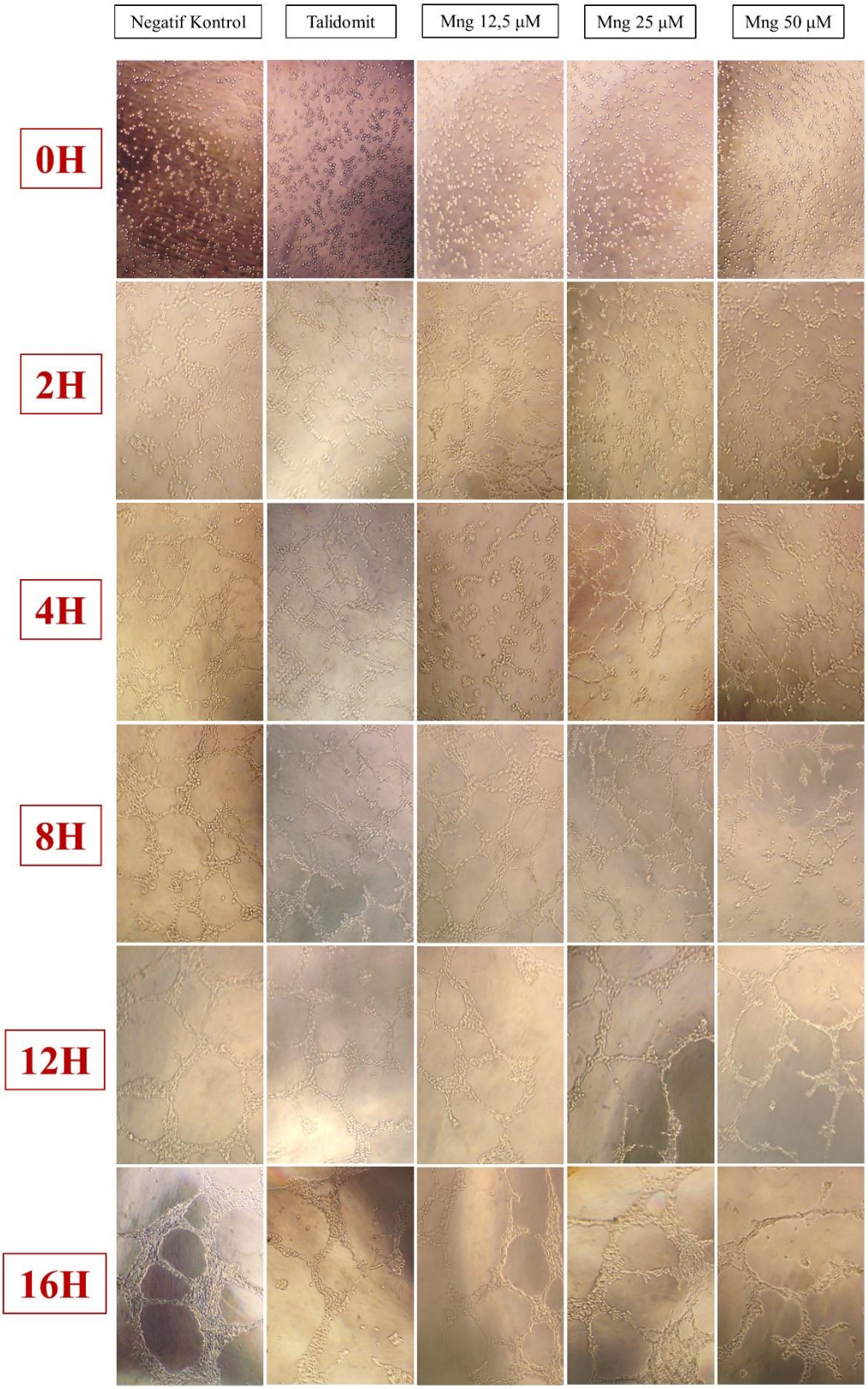
Sonuçlar değerlendirildiğinde, 0.-2. saatlerde uygulanan dozların hiçbirinde tüp formasyonunun başlamadığı gözlendi. Tüp formasyonunun 4. saat sonuçları değerlendirildiğinde, Mangiferin'in tüm dozlarında tüp oluşumunun pozitif kontrole benzer olduğu gözlendi. Paklitaksel'in 1,99 µM, 3,98 µM dozlarında tüp oluşumu üzerine etkisinin, pozitif kontrol grubuna da benzer şekilde, etkisiz olduğu görüldü. Paklitaksel 7,96 µM dozda ise nispeten tüp oluşumunun kontrole göre azaldığı 15,93 µM dozunda ise tüp oluşumunun gelişmediği belirlendi. Kombinasyon gruplarında Mangiferin 12,5 µM ve Paklitaksel 0,5 µM dozunun tüp formasyon üzerine etkisinin olmadığı, diğer kombinasyonlarda ise 4. saatte tüp formasyon oluşumunun gözlenmediği belirlendi (Şekil 4-6, Şekil 4-7, Şekil 4-8 ve Şekil 4-9).

Bir diğer saat olan 8. saatte Mangiferin'in 50 µM dozunda, tüp formasyonunu pozitif kontrole göre daha fazla bozduğu görüldü. Paklitaksel uygulamalarında ise 1,99 µM dozunda, Talidomide benzer şekilde tüp formasyonu oluşumunun olduğu, diğer dozlarda ise tüp formasyonunun oluşmadığı görüldü. Kombinasyon uygulamalarında, yine Mangiferin 12,5 µM ve Paklitaksel 0,5-3,98 µM kombinasyonlarının tüp formasyon oluşumlarının kontrole benzer şekilde ve negatif kontrolden daha az olduğu görüldü. Yine 8. saatte Paklitaksel'in 7,96 µM ve 15,93 µM dozlarının Mangiferin ile kombinasyonlarının tüp formasyonu oluşumunu engellediği belirlendi (Şekil 4-6, Şekil 4-7, Şekil 4-8 ve Şekil 4-9).

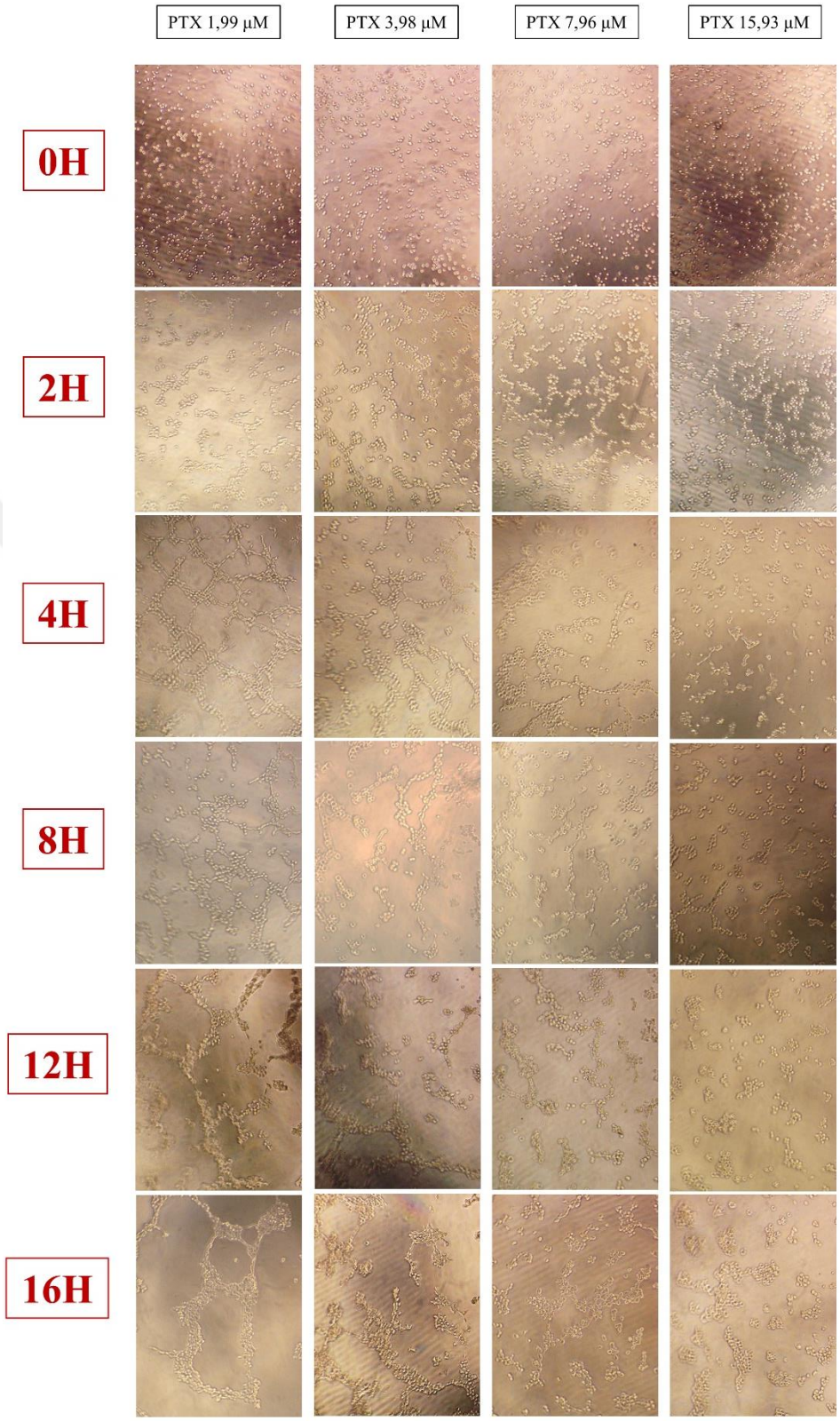
12. saat tüp formasyon değerlendirilmelerine bakıldığında, Mangiferin'in tüm dozlarının talidomide benzer etki gösterdiği belirlendi. Paklitaksel'in 1,99 µM dozu daha az olmakla birlikte, 3,98-15,93 µM doz aralığında tüp formasyonunu etkili bir biçimde engellediği görüldü. Bu saatte yine Mangiferin 12,5 µM ve Paklitaksel 0,5 µM-15,93 µM

kombinasyonlarının tüp formasyon oluşumunu azalttığı ve kontrol grubundan çok daha etkili olduğu belirlendi (Şekil 4-6, Şekil 4-7, Şekil 4-8 ve Şekil 4-9).

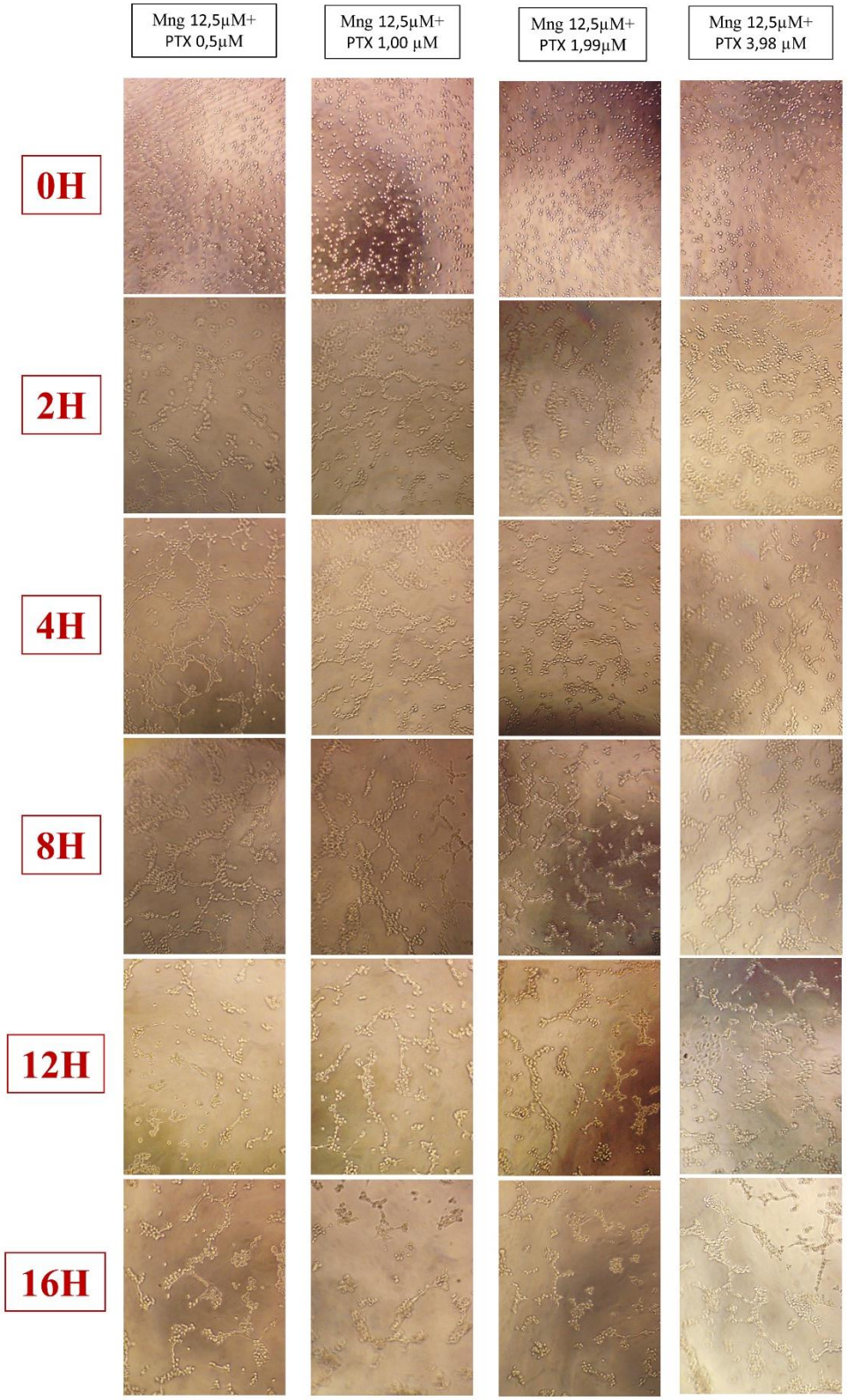
Mangiferin 50 µM dozunda 16. saatte kontrole benzer şekilde azalmış tüp formasyonu görülürken, diğer Mangiferin dozlarında bir etki belirlenmedi. Paklitaksel'in 1,99 µM dozu hariç tüm dozlarının 16. saatte tüp formasyon oluşumunu engellediği ve bu etkinin pozitif kontrolden daha güçlü olduğu görüldü. Kombinasyon dozlarında ise, Paklitaksel'in tüm dozlarında tüp oluşumunun engellendiği belirlendi. Ancak Mangiferin'in, Paklitaksel 0,5 µM, 1 µM ve 1,99 µM dozları ile yapılan kombinasyonlarında, yüksek doz Paklitaksel kombinasyonlarına göre hücrelerin oldukça azaldığı ve yine bu sonucun talidomitten daha etkili olduğu gözlendi (Şekil 4-6, Şekil 4-7, Şekil 4-8 ve Şekil 4-9).



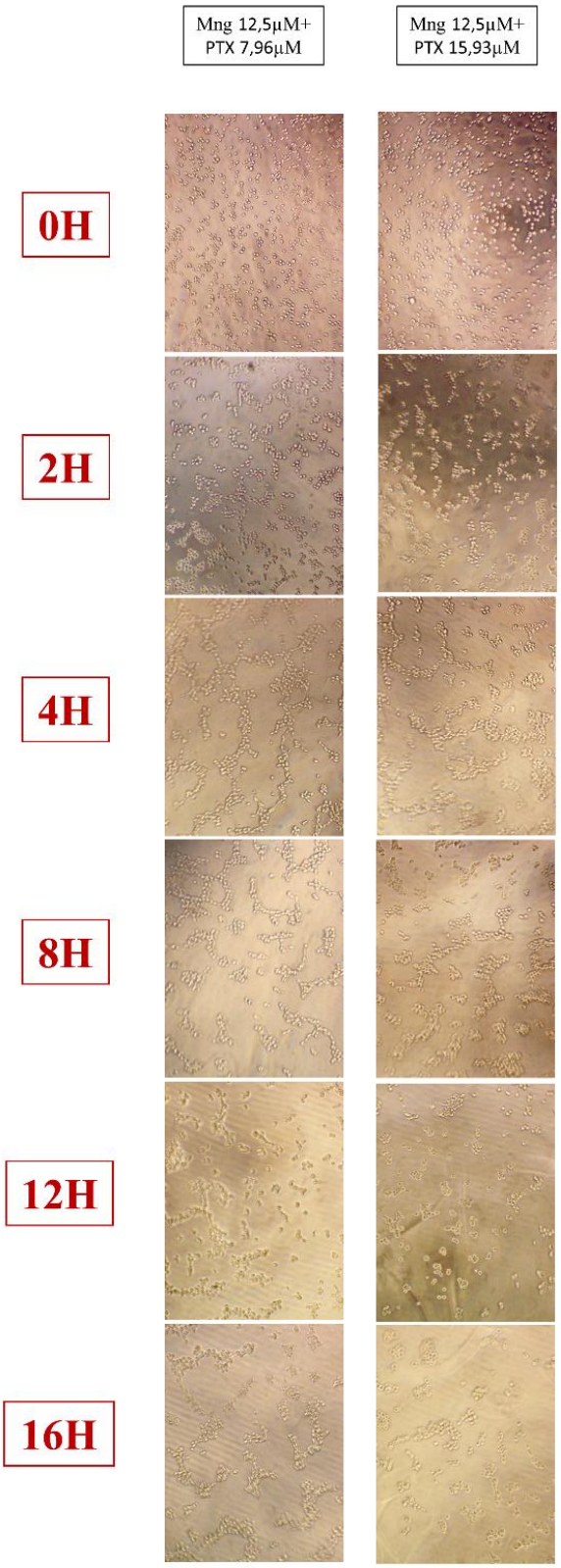
Şekil 4-6: 0.-2.-4.-8.-12.-16. saat dilimlerinde, negatif kontrol, talidomit 200 µM, Mangiferin (MNG) 12,5 µM, 25 µM ve 50 µM dozlarının HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yetenekleri üzerine etkisi.



Şekil 4-7: 0.-2.-4.-8.-12.-16. saat dilimlerinde, Paklitaksel'in (PTX) 1,99 µM, 3,98 µM, 7,96 µM ve 15, 93 µM konsantrasyonlarının HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yetenekleri üzerine etkisi.



Şekil 4-8: 0.-2.-4.-8.-12.-16. saat dilimlerinde, Paklitaksel (PTX) 0,5 µM, 1 µM, 1,99 µM ve 3,98 µM dozlarının, Mangiferin 12,5 µM dozuyla kombinasyonlarının HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yetenekleri üzerine etkisi.



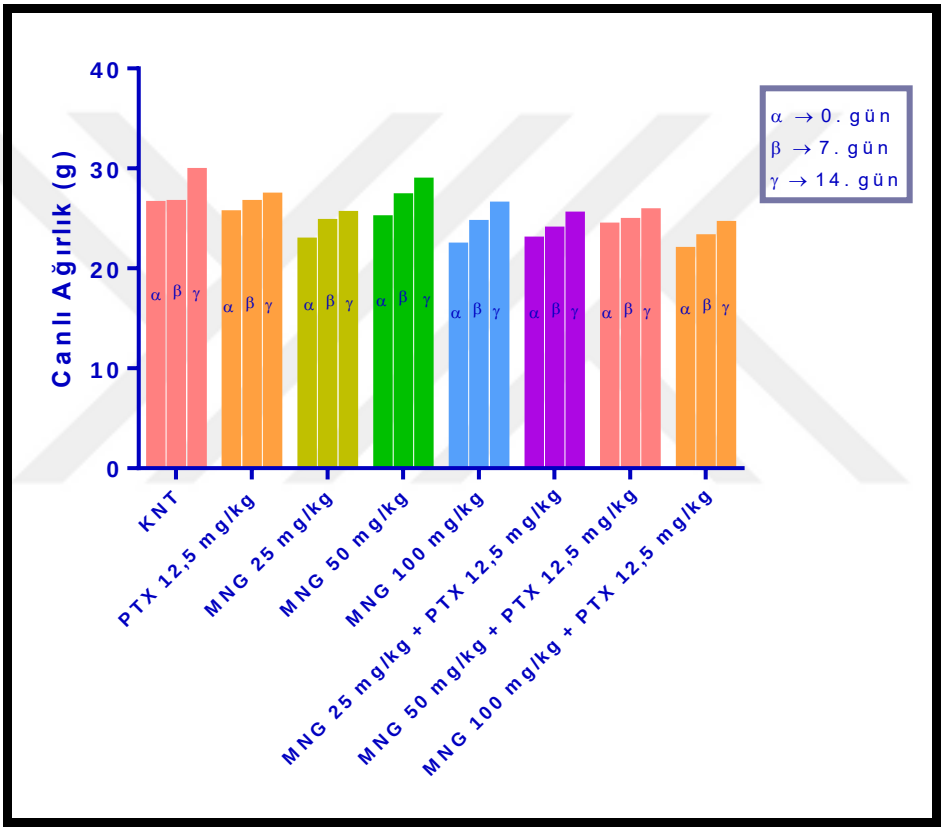
Şekil 4-9: 0.-2.-4.-8.-12.-16. saat dilimlerinde, Paklitaksel (PTX) 7,96 µM ve 15,93 µM dozlarının, Mangiferin 12,5 µM dozuyla kombinasyonlarının HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yetenekleri üzerine etkisi.

4.2. *İn Vivo* Bulgular

4.2.1. Deneysel EAC Modeli Bulguları

4.2.1.1. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyon Gruplarına Ait Canlı Ağırlık ve Tümör Ağırlığı Değişimleri

Tüm gruplarda bulunan hayvanların vücut ağırlıklarında deney süresince artış gözlenmiştir (Şekil 4-10). Hayvan ağırlıkları deney başlangıcında ortalama 24±2 gram, deney sonunda ise 27±2 gram arasında bulunmaktaydı. Kontrol ve deney gruplarında deney süresince hayvan ölümüne rastlanmamıştır.



Şekil 4-10: Deney başlangıcında (0. gün), 7. gün ve deney sonunda (14. gün) tüm gruplara ait farelerden elde edilen ortalama ağırlık değerleri.

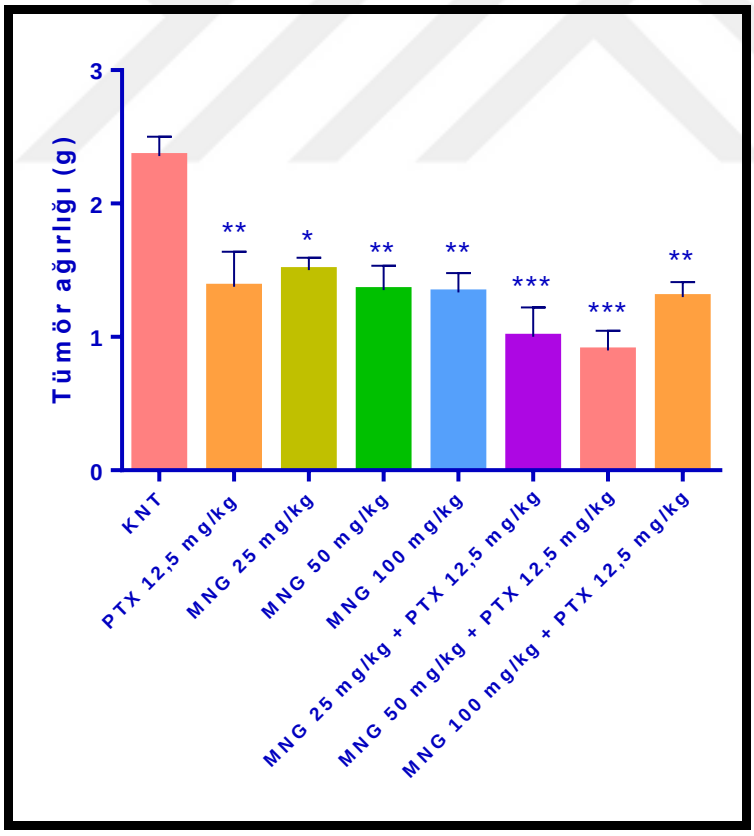
Deney sonunda, hayvanlardan elde edilen tümörlerin ağırlıkları hassas terazide ölçüldü. Tüm gruplardaki tümör ağırlığında, kontrol grubuna göre (2,36±0,14) belirgin bir azalma olduğu belirlendi. Paklitaksel 12,5 mg/kg, Mangiferin 50 mg/kg, Mangiferin 100 mg/kg ve Paklitaksel 12,5 mg/kg ile Mangiferin 100 mg/kg'ın kombine edildiği gruplarda tümör ağırlıklarının (sırasıyla; 1,38±0,27; 1,35±0,18, 1,33±0,14; 1,30±0,11) birbirleri ile benzerlik gösterdiği görüldü. Bu 4 gruba ait tümör ağırlıkları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ($P<0,01$) tespit edildi. Kontrol grubuna göre tümör ağırlığında en belirgin azalmanın ($P<0,01$) MNG 25 ve 50

mg/kg dozlarının PTX ile kombine edildiği gruplarda (sırasıyla; 1,00±0,22; 0,90±0,15) olduğu belirlendi (Tablo 4-3) (Şekil 4-11).

Tablo 4-3: Tüm gruplarda tümör ağırlığı (g) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

Gruplar	Tümör Ağırlığı (g)
KNT	2,36±0,14
PTX 12,5 mg/kg	1,38±0,27**
MNG 25 mg/kg	1,50±0,10*
MNG 50 mg/kg	1,35±0,18**
MNG 100 mg/kg	1,33±0,14**
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	1,00±0,22***
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	0,90±0,15***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	1,30±0,11**

*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-11: Tüm gruplara ait tümör ağırlığı (g) değerleri.

*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

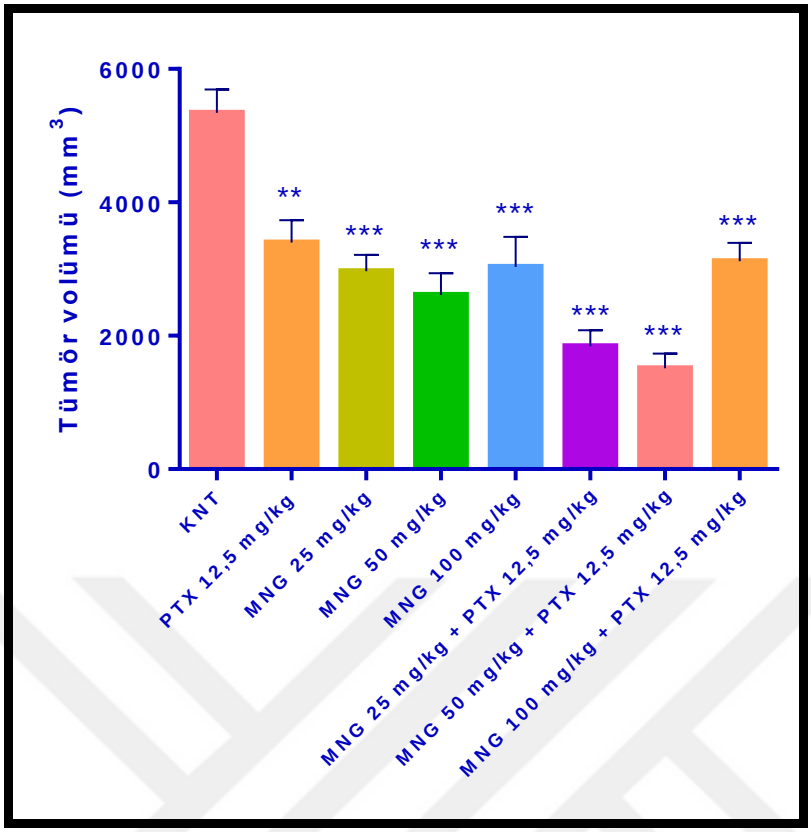
4.2.1.2. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Tümör Volümü Üzerine Etkisi

Deney sonunda hayvanlardan elde edilen meme tümörleri kumpasla ölçüldü. "[(Kısa çap)2 x (Uzun çap)]/2" formülü ile tümör volümleri hesaplandı. Kontrol grubuna (5342±352) göre deney gruplarına ait tümör volümü ortalamalarında belirgin bir azalma olduğu belirlendi. Mangiferin'in (MNG) tek başına 25, 50 ve 100 mg/kg gruplarına ait tümör volümü ortalamalarının (sırasıyla 2967±245; 2615±323; 3033±452) birbirleri ile benzerlik gösterdiği ve bu üç gruba ait tümör volümlerindeki azalmanın ($P<0,001$) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Paklitaksel (PTX) 12,5 mg/kg grubuna ait tümör volümü ortalamasındaki azalmanın (3397±338) da ($P<0,01$) kontrol grubuna göre anlamlı olduğu bulundu. MNG + PTX kombinasyonlarındaki tümör volümü ortalamalarının ise, Mangiferin dozlarına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ve MNG 25-50-100 mg/kg dozuyla PTX kombine edildiğinde tümör volümü ortalamalarının (sırasıyla 1844±239; 1512±221; 3116±276) önemli ölçüde azaldığı ($P<0,001$) belirlendi. Kontrol grubuna göre tümör volümünde en belirgin azalmanın MNG 25 ve 50 mg/kg dozlarının PTX ile kombinasyon yapıldığı gruplarda olduğu gözlendi. Bu kombinasyonlarda ilaçların birbiri üzerine additif etki gösterdiği tespit edildi. MNG 100 mg/kg ile PTX kombinasyonu yapılan grubun tümör volümündeki azalmanın, tek başına MNG 100 mg/kg uygulanan grupla benzer olduğu görüldü (Tablo 4-4, Şekil 4-12).

Tablo 4-4: Tüm gruplara ait tümör volümü değerleri.

Gruplar	Tümör Volümü (mm^3)
KNT	5342±352
PTX 12,5 mg/kg	3397±338**
MNG 25 mg/kg	2967±245***
MNG 50 mg/kg	2615±323***
MNG 100 mg/kg	3033±452***
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	1844±239***
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	1512±221***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	3116±276***

P<0,01;*P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

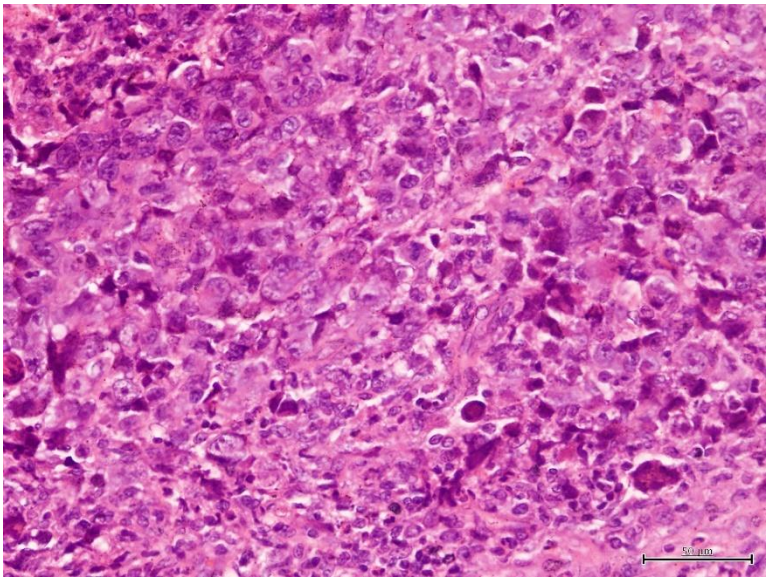


Şekil 4-12: Tüm gruplara ait tümör volümü (mm^3) değerleri.

**P<0,01; ***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.

4.2.1.3. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarına ait tümör dokularına ait histolojik inceleme

Elde edilen tümörler histolojik takipten geçtikten sonra, hematoksilen & eosin ile boyanarak fotoğraflandı (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: Hematoksilen & eosin ile boyanmış EAC tümör dokusu. Bar: 50 µm.

4.2.1.4. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Hücre Proliferasyon, Apoptozis, Otofaji ve Sağkalım Üzerine Etkisi

4.2.1.4.1. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

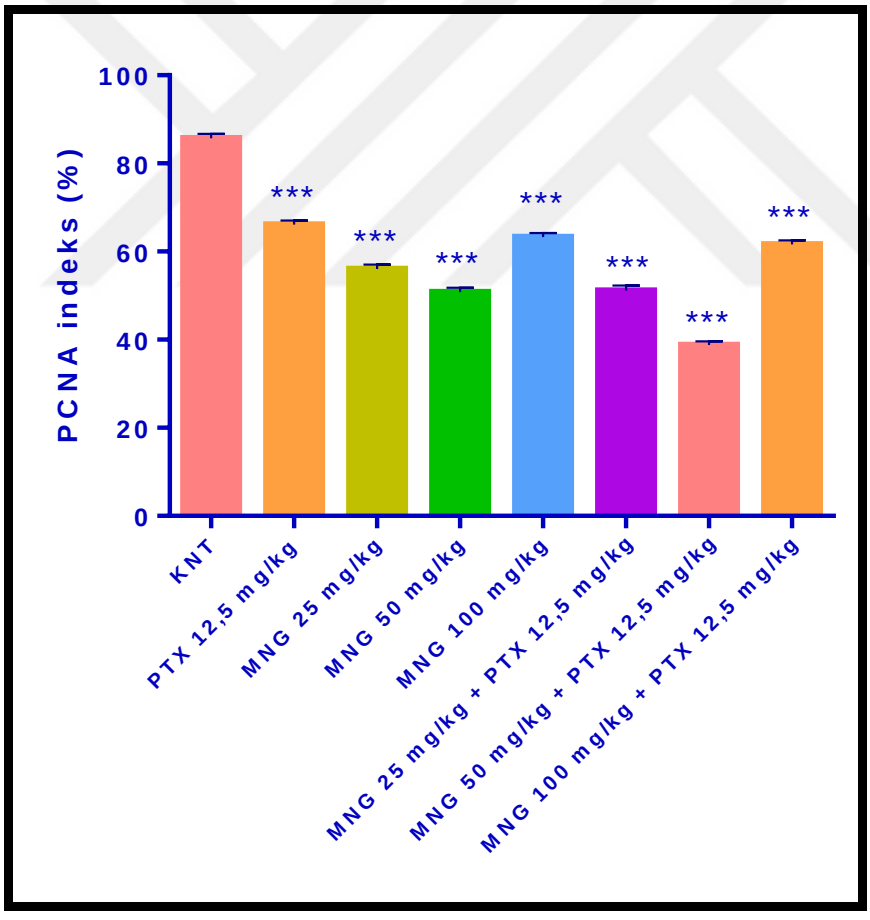
4.2.1.4.1.1. PCNA İndeks (%) Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

Tümör proliferasyonunu belirlemek için kullanılan belirteçlerden biri PCNA'dır. Çoğalan nukleusların belirlenmesinde kullanılan PCNA için yapılan immünohistokimyasal boyamalardan elde edilen PCNA indeks değerleri kontrol grubu (85,73±0,97) ile karşılaştırıldığında, tüm gruplarda anlamlı bir azalma olduğu görüldü (P<0,001). MNG 100 mg/kg, PTX 12,5 mg/kg tek başına ve birlikte kombine edildikleri gruplardaki PCNA indeks ortalama değerlerinin (sırasıyla 63,29±0,89; 66,13±0,93; 61,61±0,91) birbirine benzer olduğu, kombinasyonun herhangi bir etkisinin olmadığı bulundu. Ayrıca, en düşük PCNA indeks değerlerinin MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg kombinasyon grubunda olduğu (38,81±0,79) (P<0,001) ve kontrol grubuna göre anlamlı olduğu görüldü (Tablo 4-5, Şekil 4-14, Şekil 4-15).

Tablo 4-5: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde PCNA indeks (%) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

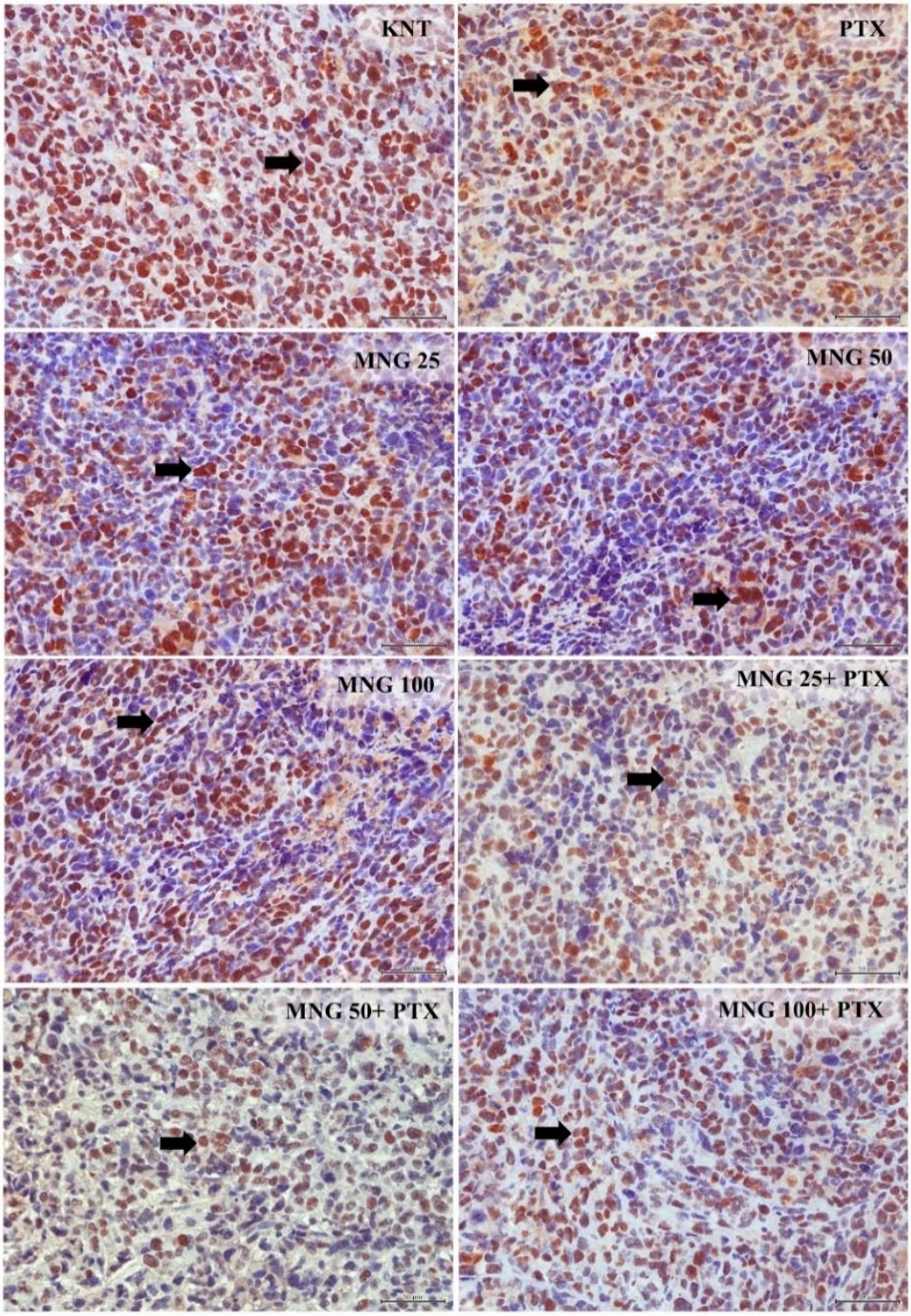
Gruplar	PCNA İndeks (%)
KNT	85,73±0,97
PTX 12,5 mg/kg	66,13±0,93***
MNG 25 mg/kg	56,01±1,05***
MNG 50 mg/kg	50,82±0,98***
MNG 100 mg/kg	63,29±0,89***
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	51,11±1,19***
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	38,81±0,79***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	61,61±0,91***

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-14: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde PCNA indeks (%) değerleri.

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-15: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde, çoğalan hücrelerde nukleus PCNA reaksiyonu (→).
Zıt boya: Mayer Hematoksilen. Bar: 50 µm.

4.2.1.4.2. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Apoptozis Üzerine Etkisi

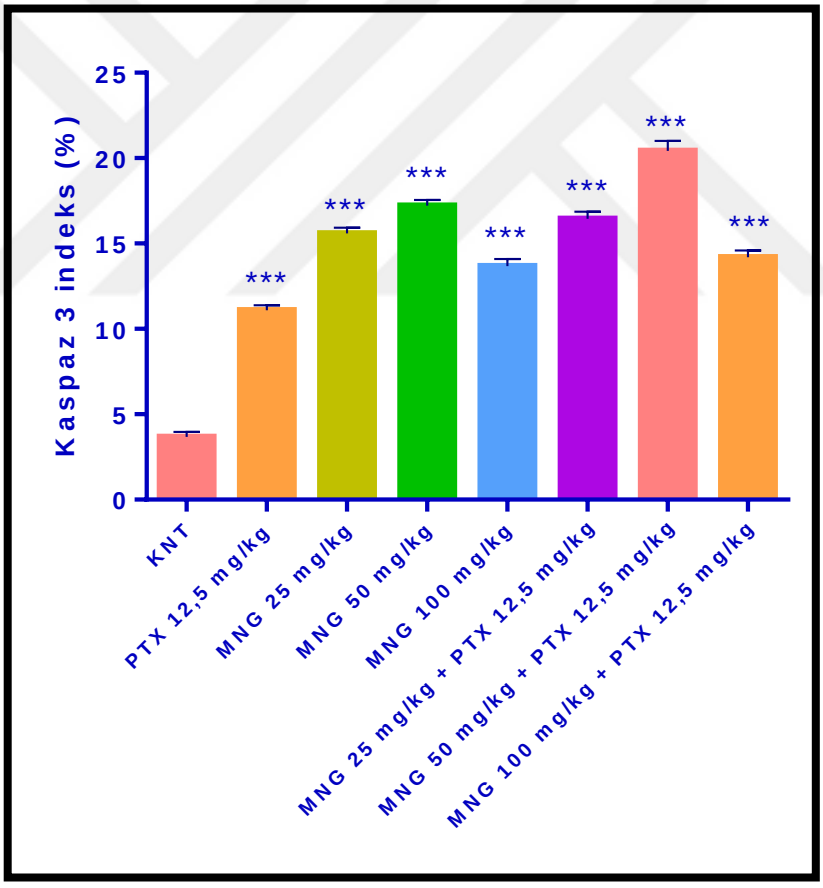
4.2.1.4.2.1. Aktif Kaspaz 3'ün Apoptotik Indeks (%) Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

Tümör dokularında apoptozis belirteçlerinden biri olan aktif kaspaz-3'ün indeks değerlerine bakıldığında, tüm deney gruplarında apoptotik indeksin kontrol grubuna (3,68±0,3) göre anlamlı olarak yükseldiği belirlendi (P<0,001). PTX grubundaki apoptotik indeks artış, MNG 100 mg/kg grubu ile benzerlik göstermekteydi (sırasıyla 11,09±0,29 ve 13,67±0,43). Aktif kaspaz-3 indeks ortalamasının PTX ve MNG 100 mg/kg birlikte uygulandığı grupta (14,21±0,40), tek başına Paklitaksel uygulanan gruptan (11,09±0,29) daha fazla olduğu görüldü. MNG 25 mg/kg ve 50 mg/kg uygulanan gruplardaki aktif kaspaz-3 apoptotik indeksinin (sırasıyla 15,59±0,35 ve 17,22±0,34) MNG 100 mg/kg grubundan daha yüksek olduğu (13,67±0,43) görüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kombinasyon grupları arasında aktif kaspaz-3 artışının en fazla MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg (20,43±0,6) (P<0,001) grubunda olduğu belirlendi (Tablo 4-6, Şekil 4-16, Şekil 4-17).

Tablo 4-6: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde aktif kaspaz-3 İndeks (%) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

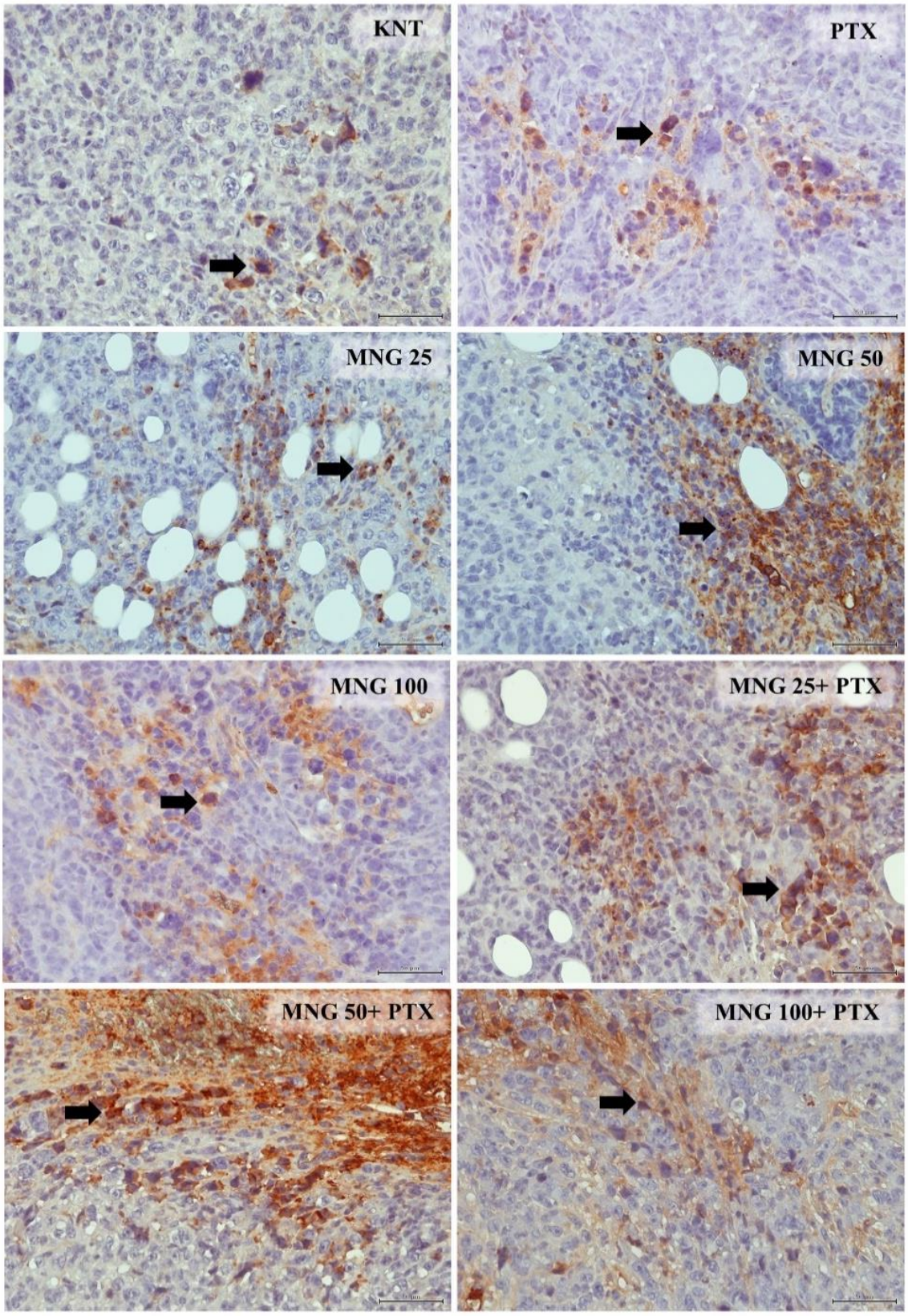
Gruplar	Aktif Kaspaz-3 İndeks (%)
KNT	3,68±0,30
PTX 12,5 mg/kg	11,09±0,29***
MNG 25 mg/kg	15,59±0,35***
MNG 50 mg/kg	17,22±0,34***
MNG 100 mg/kg	13,67±0,43***
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	16,46±0,41***
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	20,43±0,60***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	14,21±0,40***

***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-16: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde aktif kaspaz-3 (%) indeks değerleri.

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-17: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde hücre sitoplazmalarında aktif kaspaz-3 reaksiyonu (→) ile apoptotik hücreler.

Zıt boya: Mayer Hematoksilen. Bar: 50 µm.

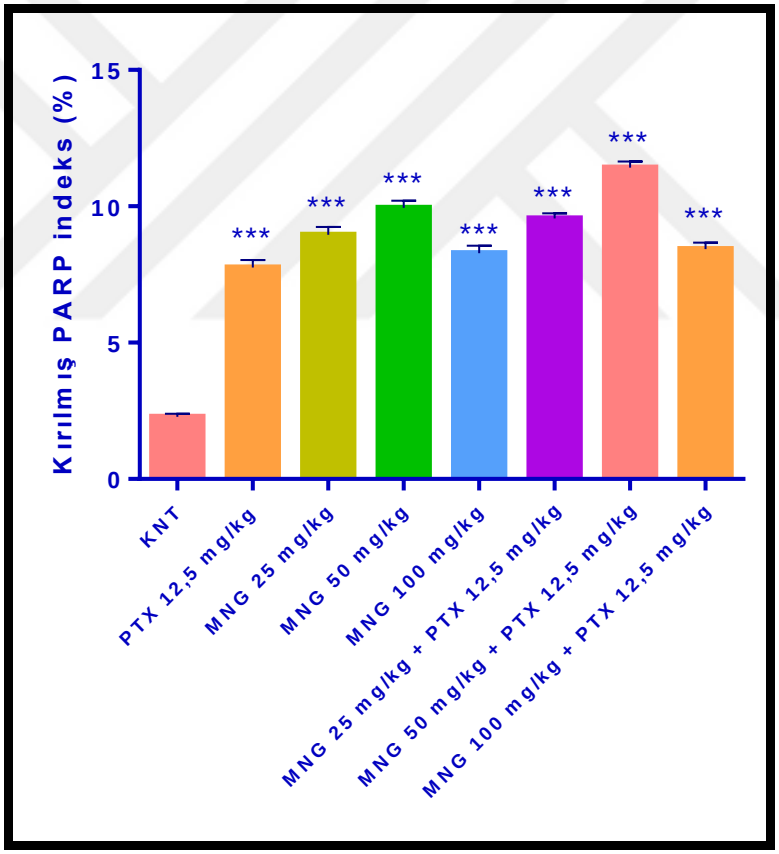
4.2.1.4.2.2. Kırılmış PARP'a Ait Apoptotik İndeks (%) Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

Kırılmış PARP için yapılan immünohistokimyasal boyamalarda, antikorla işaretlenen hücreler sayıldı ve % indeks ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, sonuçların kırılmış kaspaz-3 % indeks değerlerine benzer olduğu bulundu (Tablo 4-7). Kontrol grubuna göre tüm gruplarda kırılmış PARP % indeksinin anlamlı şekilde yükseldiği ($P<0,001$) görüldü. MNG tek başına uygulanan gruplarda 50 mg/kg uygulanan grupta ve kombinasyonda da MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg uygulanan grupta, kırılmış PARP indeksinin en yüksek değerde olduğu belirlendi (9,95±0,25; 11,57±0,45) ($P<0,001$). MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg grubunda MNG 100 mg/kg tek başına uygulama yapılan gruba göre bir artış olmadığı (8,43±0,24) görüldü (Tablo 4-7, Şekil 4-18, Şekil 4-19).

Tablo 4-7: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde kırılmış PARP indeks (%) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

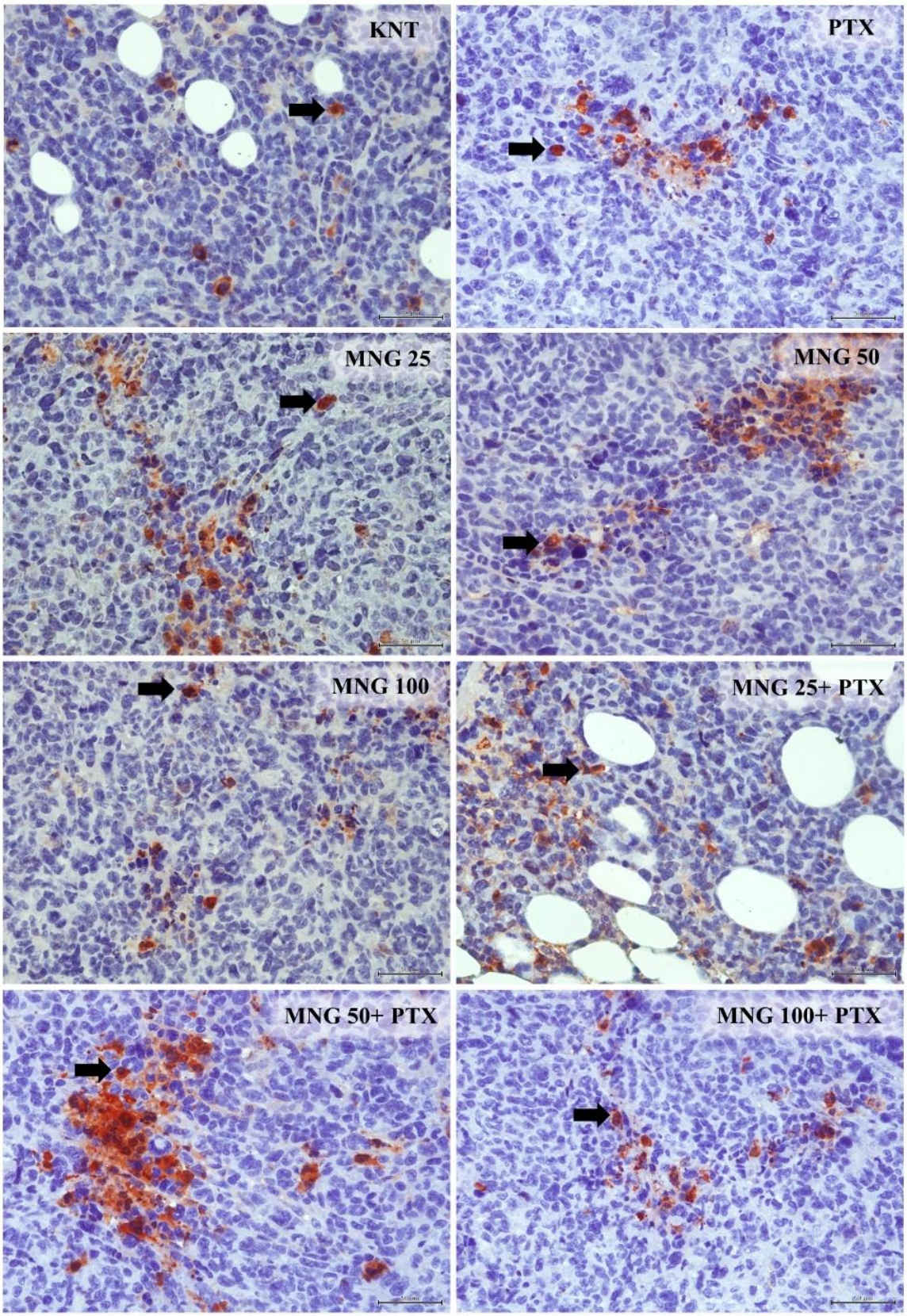
Gruplar	PARP indeks (%)
KNT	2,28±0,12
PTX 12,5 mg/kg	7,76±0,27***
MNG 25 mg/kg	8,96±0,28***
MNG 50 mg/kg	9,95±0,25***
MNG 100 mg/kg	8,28±0,28***
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	9,56±0,19***
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	11,57±0,45***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	8,43±0,24***

***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-18: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde kırılmış PARP indeks (%) değerleri.

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-19: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde hücrede nukleus kırılmış PARP reaksiyonu (→).

Zıt boya: Mayer Hematoksilen. Bar: 50 µm.

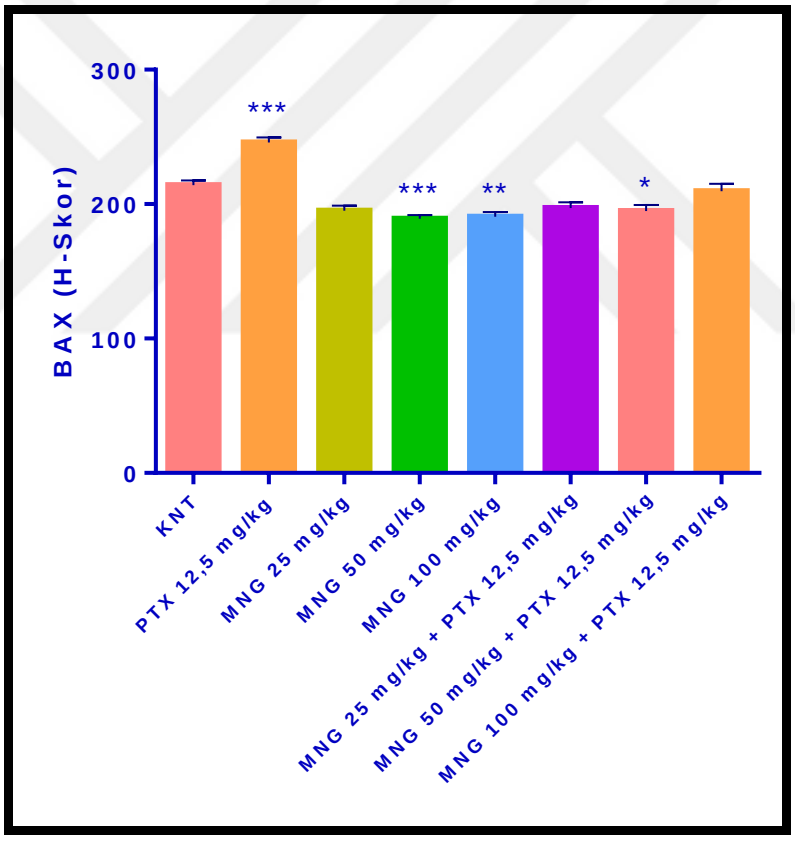
4.2.1.4.2.3. BAX'a Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

Apoptoz içsel yolak belirteçlerinden BAX'a ait immünohistokimyasal boyamalardan elde edilen H-skor değerlerine bakıldığında, kontrol grubuna göre anlamlı artış sadece PTX 12,5 mg/kg grubunda (245,80±3,73; P<0,001) görülmektedir. MNG 50 mg/kg, MNG 100 mg/kg ve MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg gruplarına ait BAX değerleri (ortalama değerler sırasıyla; 189,00±2,94; 190,60±3,44; 194,80±4,64) kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma görülmüştür (sırasıyla; *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001). MNG 25 mg/kg, MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg ve MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg gruplarına ait BAX değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Tablo 4-8: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde BAX (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

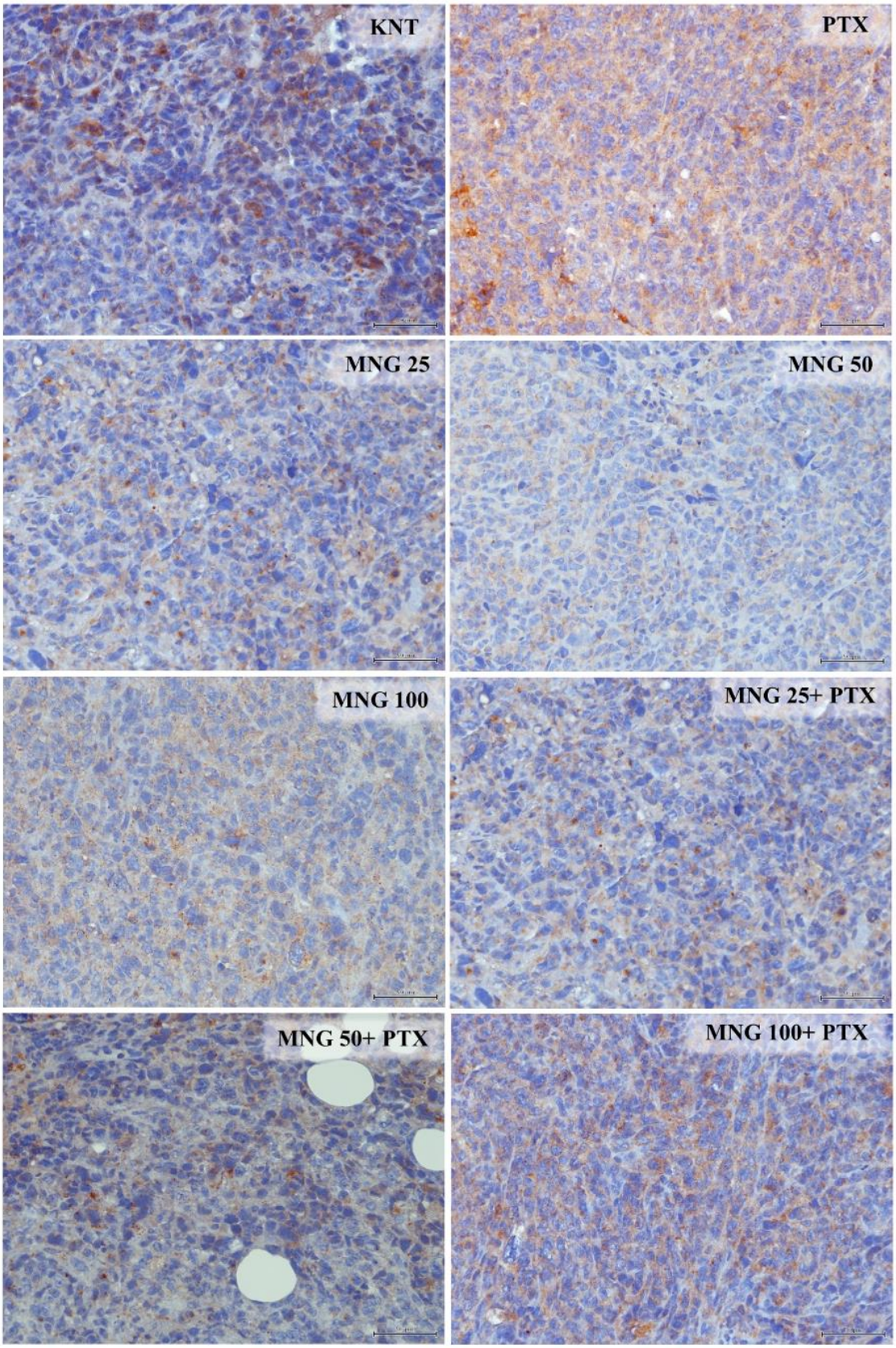
Gruplar	BAX (H-Skor)
KNT	214,20±3,57
PTX 12,5 mg/kg	245,80±3,73***
MNG 25 mg/kg	195,00±3,86
MNG 50 mg/kg	189,00±2,94***
MNG 100 mg/kg	190,60±3,44**
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	197,10±4,20
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	194,80±4,64*
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	209,60±5,42

**P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-20: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde BAX (H-Skor) değerleri

*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-21: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik BAX reaksiyonu.

Zıt boya: Mayer Hematoksilen. Bar: 50 µm.

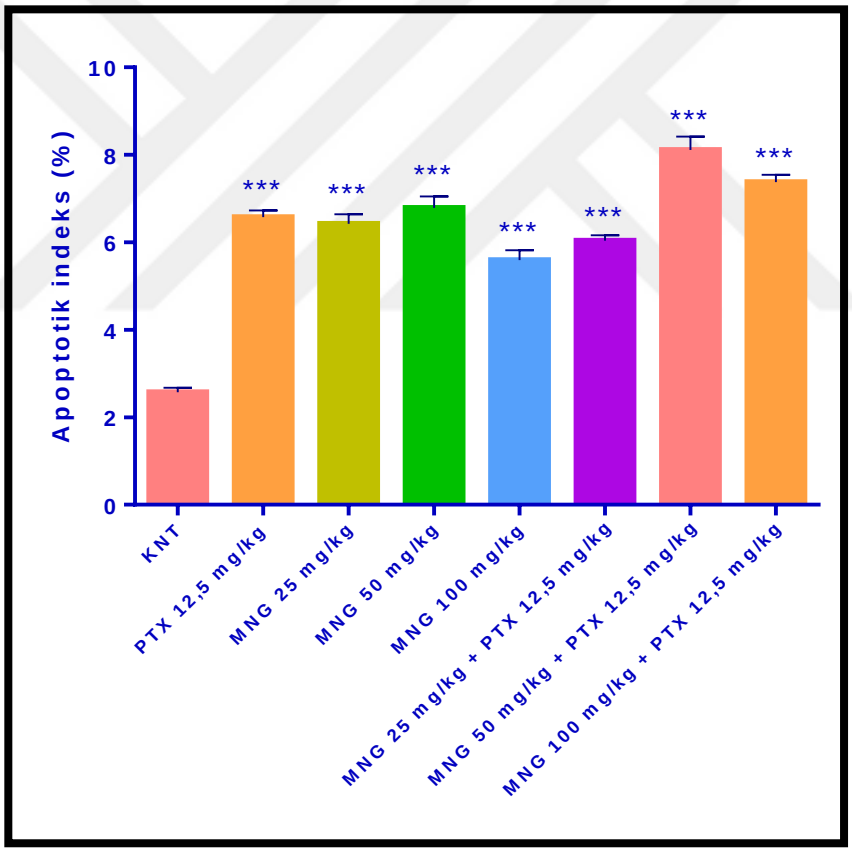
4.2.1.4.2.4. TUNEL Tekniği Kullanılarak Apoptotik Indeks (%) Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

Geç apoptotik dönemdeki 180-200 bp ve katları olan DNA kırıklarının işaretlenmesi ile apoptotik hücrelerin gösterilmesi için yapılan TUNEL tekniği ile işaretlenen hücre nukleusları sayılarak apoptotik % indeks hesaplandı (Tablo 4-8). Tüm gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, apoptotik hücre sayısının anlamlı şekilde yükseldiği ($P<0,001$) görüldü. MNG 25 mg/kg, 50 mg/kg ve PTX 12,5 mg/kg tek başına uygulanan grupların ortalama apoptotik % indeks değerleri birbirine benzerdi (sırasıyla 6,43±0,22; 6,79±0,26; 5,60±0,22). MNG 100 mg/kg uygulanan gruba ait indeks değerleri, kombinasyon grubu olan MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg grubu ile benzerdi (sırasıyla 5,60±0,223, 6,04±0,13). MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg grubunun, kontrole göre anlamlı ve en yüksek (8,12±0,31, $P<0,001$) apoptotik indeks değerlerine sahip olduğu görüldü (Tablo 4-9, Şekil 4-22, Şekil 4-23).

Tablo 4-9: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde TUNEL yöntemi ile apoptotik indeks (%) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

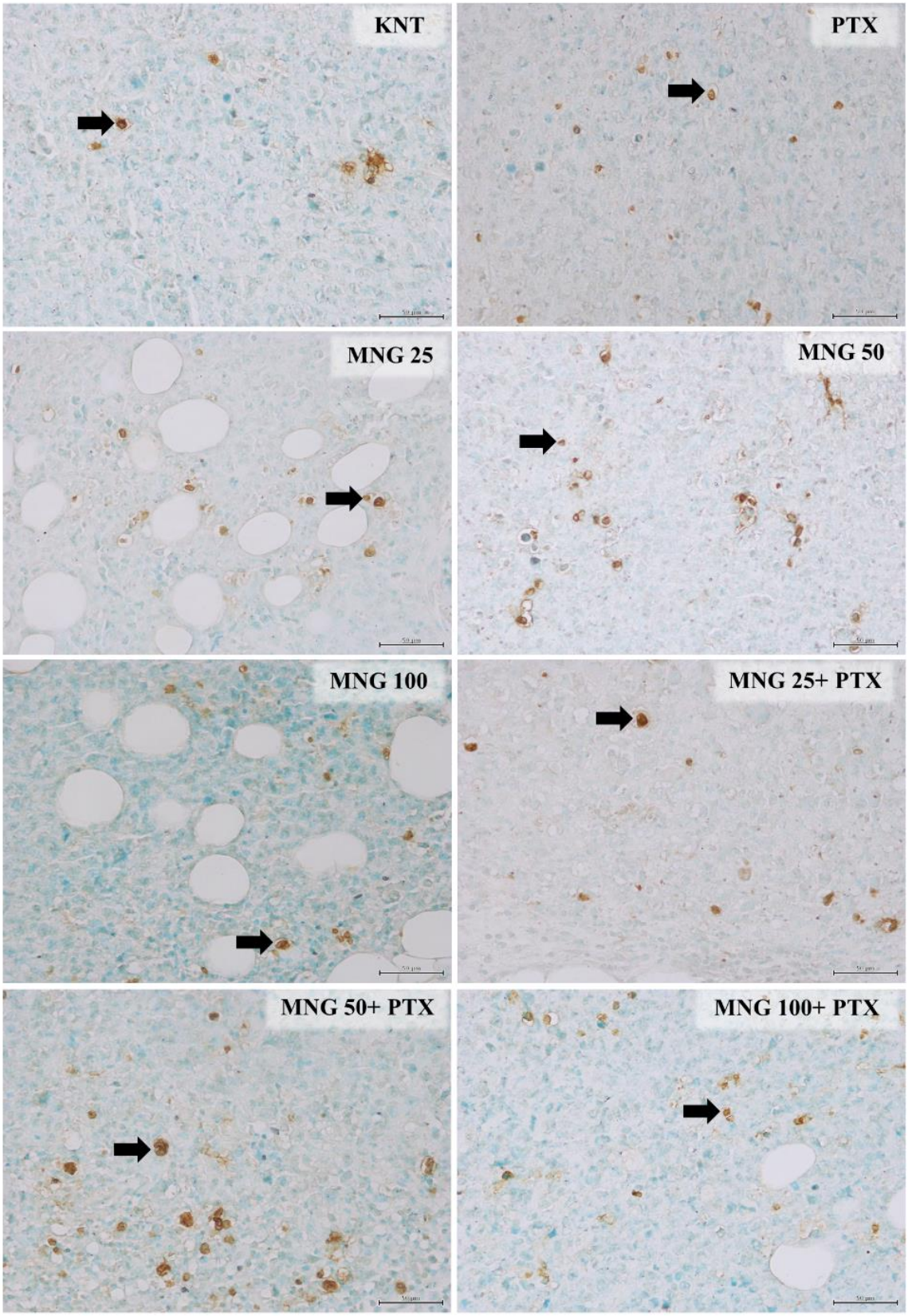
Gruplar	TUNEL indeks (%)
KNT	2,58±0,10
PTX 12,5 mg/kg	6,58±0,16***
MNG 25 mg/kg	6,43±0,22***
MNG 50 mg/kg	6,79±0,26***
MNG 100 mg/kg	5,60±0,22***
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	6,04±0,13***
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	8,12±0,31***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	7,38±0,17***

***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-22: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde TUNEL tekniğine ait apoptotik indeks (%) değerleri.

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-23: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde apoptotik hücre nukleuslarında kahverengi TUNEL reaksiyonu (→).

Zıt boya: Metil yeşili. Bar: 50 µm.

4.2.1.4.3. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Otofaji Üzerine Etkisi

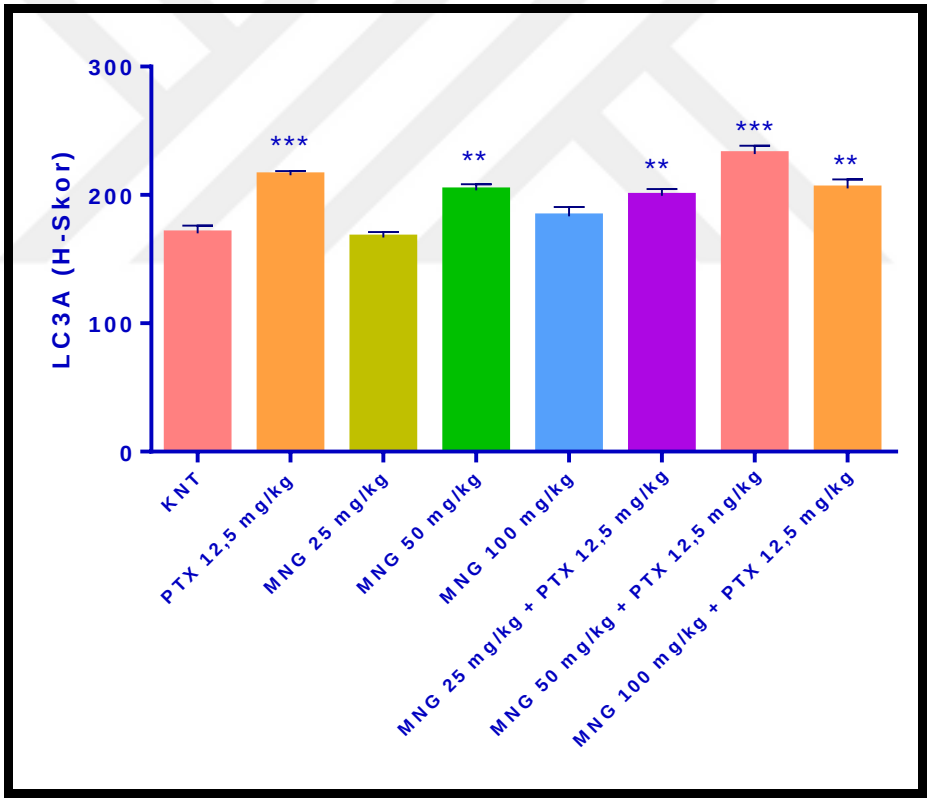
4.2.1.4.3.1. LC3A'ya ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

Otofaji belirteçlerinden biri olan LC3A, otofagozom membranının uzaması için gerekli proteinlerden birisidir. LC3A immünohistokimyasal boyamalarından elde edilen H-skor değerlerine bakıldığında, kontrol grubuna göre en fazla anlamlı artışın PTX 12,5 mg/kg ve MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg grubunda olduğu (sırasıyla; 215,33 ± 3,42 ve 231,90 ± 6,34) görüldü. Yine, tek başına MNG 50 mg/kg uygulanan grup (203,62 ±4,79), kombinasyon olarak uygulanan MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg (199,30 ± 5,32) ve MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg (205,00 ± 7,06) gruplarının LC3A düzeylerinin kontrole göre anlamlı düzeyde yükseldiği ($P<0,01$) belirlendi. Tek başına MNG 25 mg/kg ve MNG 100 mg/kg uygulanan gruplarda (sırasıyla; 167,00 ± 4,13 ve 183,40 ± 7,35) kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 4-10, Şekil 4-24, Şekil 4-25).

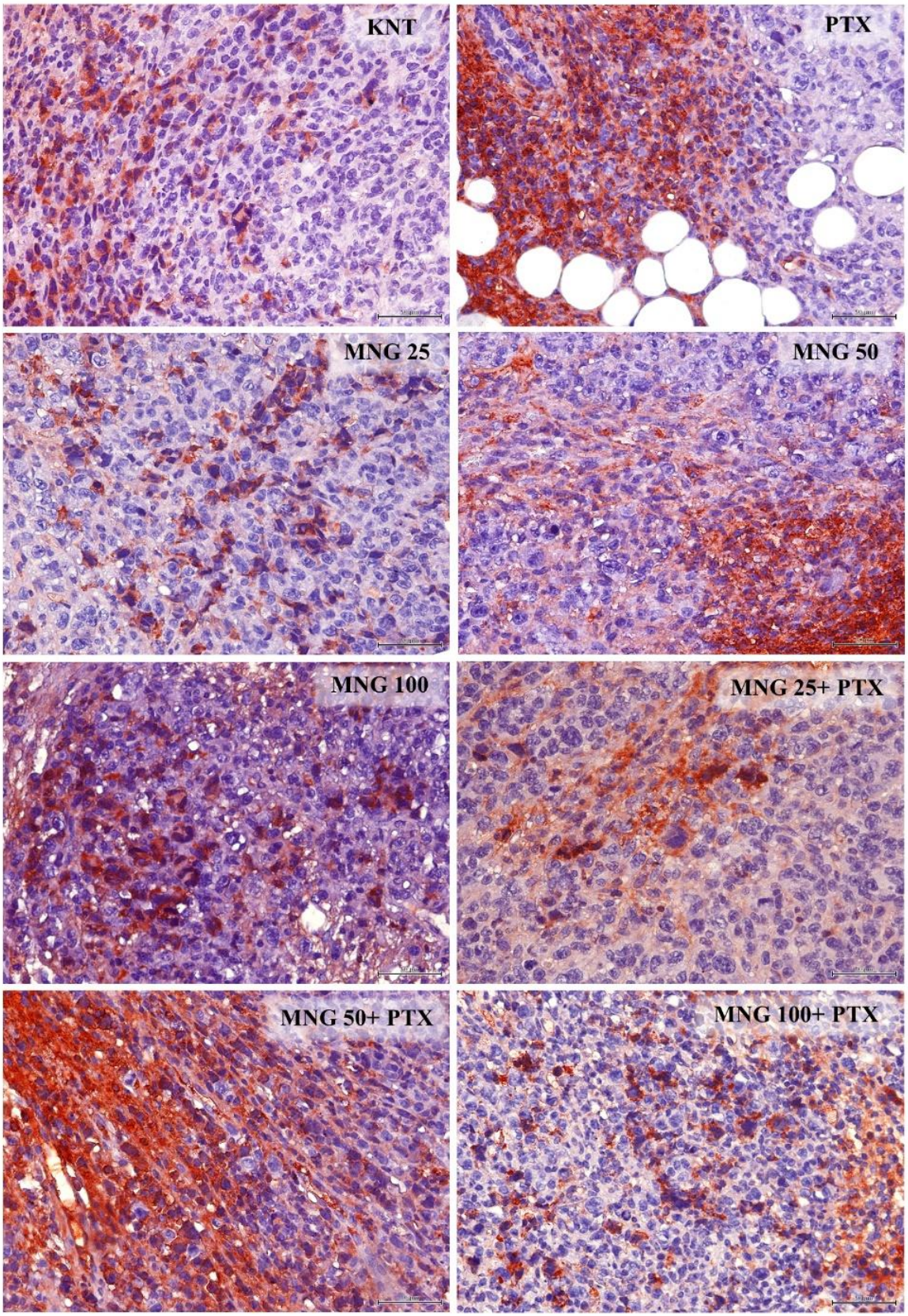
Tablo 4-10: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde LC3A (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

Gruplar	LC3A (H-Skor)
KNT	170,20±5,92
PTX 12,5 mg/kg	215,33±3,42***
MNG 25 mg/kg	167,00±4,13
MNG 50 mg/kg	203,62±4,79**
MNG 100 mg/kg	183,40±7,35
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	199,30±5,32**
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	231,90±6,34***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	205,00±7,06**

**P<0,01; ***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri



Şekil 4-24: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde LC3A (H-Skor) değerleri.
**P<0,01; ***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-25: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik LC3A reaksiyonu.

Zıt boya: Mayer Hematoksilen. Bar: 50 µm

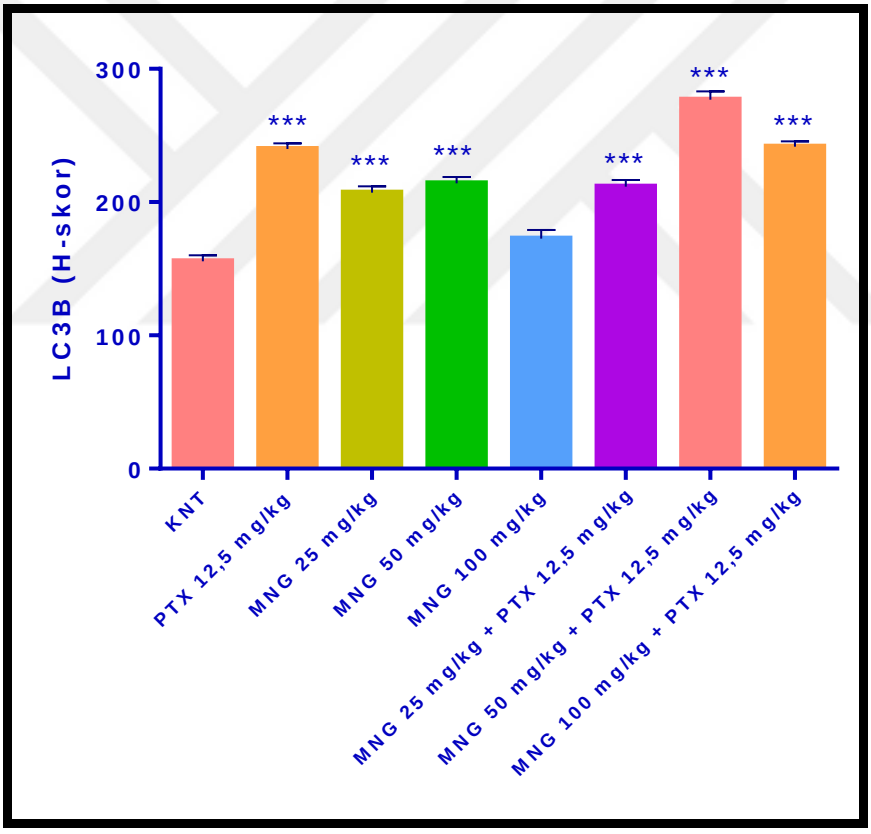
4.2.1.4.3.2. LC3B'ye Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

LC3B, bir diğer otofagozom membranının uzaması için gerekli proteindir. Otofaji belirteçlerinden olan LC3B immünohistokimyasal boyamalarından elde edilen H-skor değerleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre tek başına MNG 100 mg/kg uygulama yapılan grupta anlamlı bir fark bulunamadı. Diğer tüm gruplarda kontrol grubuna göre LC3B H-skor değerlerinde anlamlı bir yükselme ($P<0,001$) olduğu görüldü. En yüksek LC3B H-skorlarının ($P<0,001$) tek başına PTX 12,5 mg/kg, MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg ve MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg kombinasyon gruplarında olduğu (sırasıyla; 239,90 ±4,15; 276,82 ±6,31; ve 241,52 ±4,02) (Tablo 4-11, Şekil 4-24, Şekil 4-27) belirlendi.

Tablo 4-11: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde LC3B (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

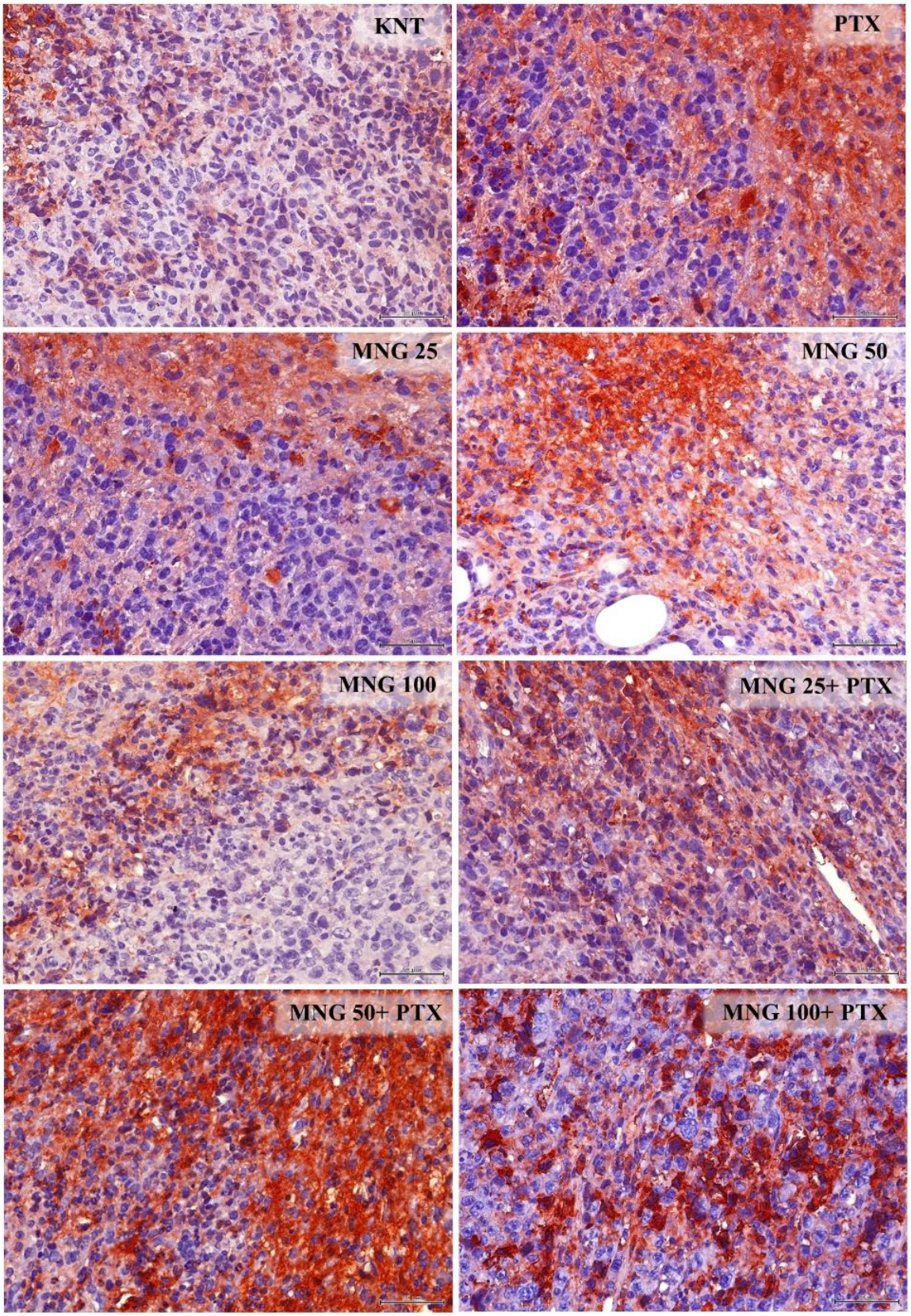
Gruplar	LC3B (H-Skor)
KNT	155,50 ± 4,56
PTX 12,5 mg/kg	239,90 ±4,15***
MNG 25 mg/kg	207,20 ±4,81***
MNG 50 mg/kg	214,00 ±4,78***
MNG 100 mg/kg	172,58 ±6,54
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	211,72 ±4,98***
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	276,82 ±6,31***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	241,52 ±4,02***

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-26: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde LC3B (H-Skor) değerleri.

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-27: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik LC3B reaksiyonu.

Zıt boya: Mayer Hematoksilen. Bar: 50 µm.

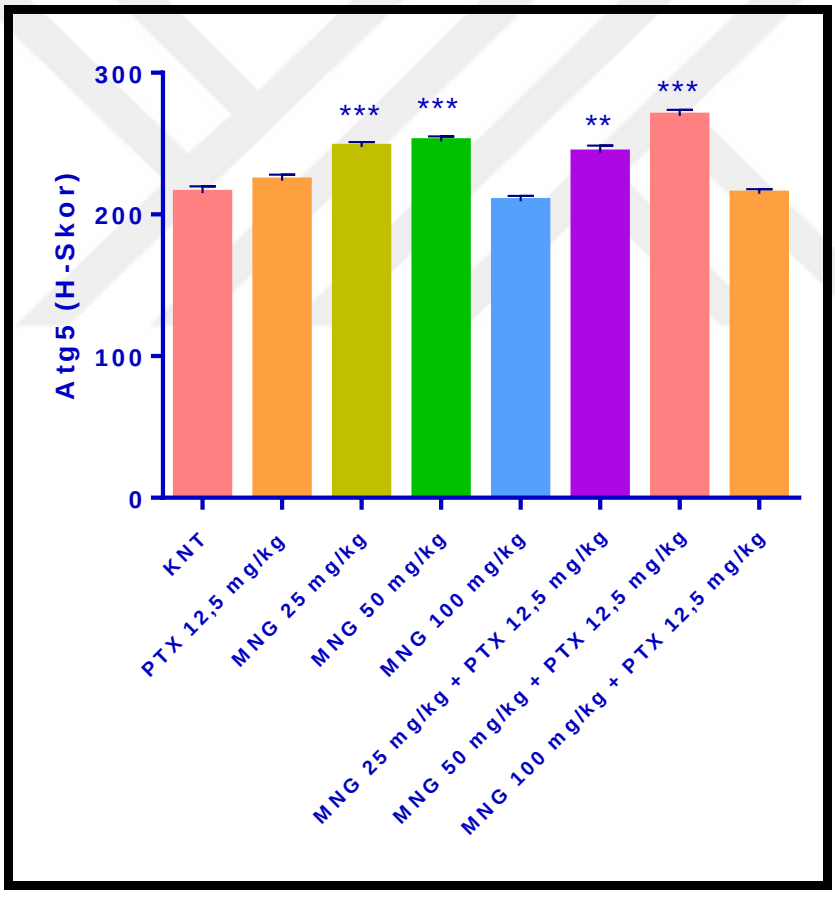
4.2.1.4.3.3. Atg5'e Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

Otofajinin belirlenmesinde kullanılan belirteçlerden bir diğeri de Atg5'dir. Atg5 için yapılan H-skor değerlerine bakıldığında, tek başına MNG 100 mg/kg, PTX 12,5 mg/kg ve kombinasyon MNG 100 mg/kg+ PTX 12,5 mg/kg gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunamadı (sırasıyla; 209,46±3,64; 223,92±4,33; ve 214,58±3,36). H-skor değerlerinin, tek başına MNG 25 mg/kg, MNG 50 mg/kg ve MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg, MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg kombinasyon gruplarında (sırasıyla; 247,72±3,46; 251,70±3,46; 243,55±5,19 ve 269,74±4,25) kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu görüldü (MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg grubu için $P<0,01$; diğer gruplar için; $P<0,001$) (Tablo 4-12, Şekil 4-28, Şekil 4-29).

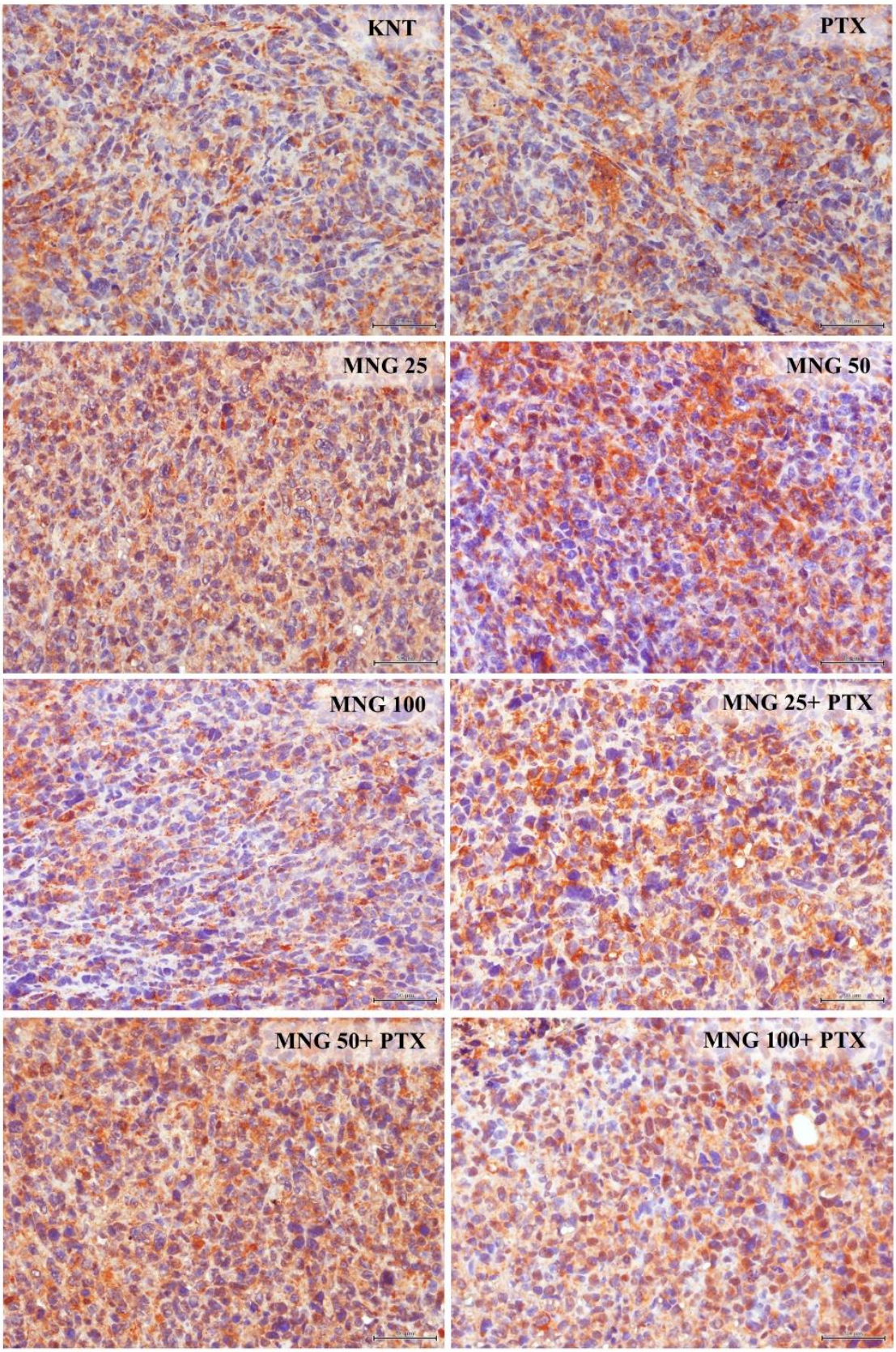
Tablo 4-12: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde Atg5 (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

Gruplar	Atg5 (H-Skor)
KNT	215,00±4,85
PTX 12,5 mg/kg	223,92±4,33
MNG 25 mg/kg	247,72±3,46***
MNG 50 mg/kg	251,70±3,46***
MNG 100 mg/kg	209,46±3,64
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	243,55±5,19**
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	269,74±4,25***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	214,58±3,36

**P<0,01; ***P<0,001, kontrol grubuna göre anlamlılık değeri



Şekil 4-28: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde Atg5 (H-Skor) değerleri.
**P<0,01; ***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-29: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik Atg5 reaksiyonu.

Zıt boya: Mayer Hematoksilen. Bar: 50 µm.

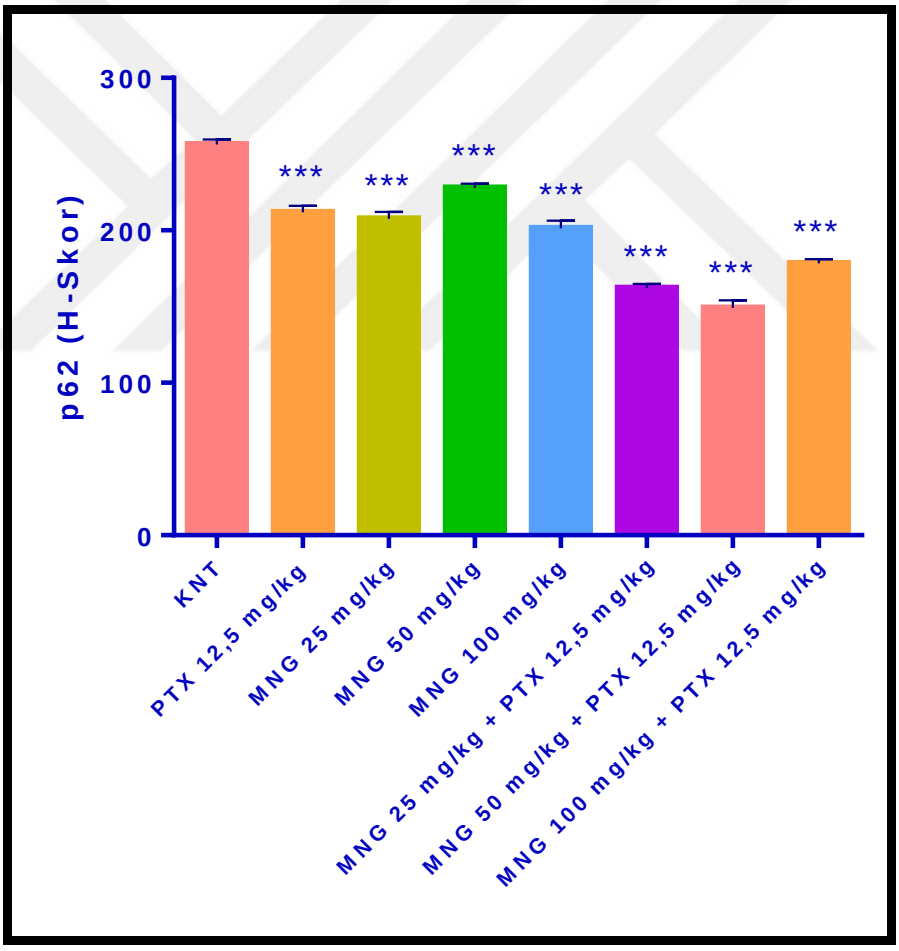
4.2.1.4.3.4. p62'ye Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

Otofaji sürecinde p62 proteini, hücre içindeki hasarlı organellerin sağlıklı olanlardan ayrılıp, otofagozom tarafından tanınmasında otofajik reseptör olarak rol oynayan önemli belirteçlerden biridir. p62 düzeyleri immünohistokimyasal boyamalar yapılarak H-skor ile değerlendirildiğinde, tüm grupların H-skor değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma ($P<0,001$) olduğu görüldü. p62 reaksiyonunun MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg kombinasyon grubunda en az düzeyde (149,20±5,04) olduğu belirlendi (Tablo 4-13, Şekil 4-30, Şekil 4-31).

Tablo 4-13: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde p62 (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

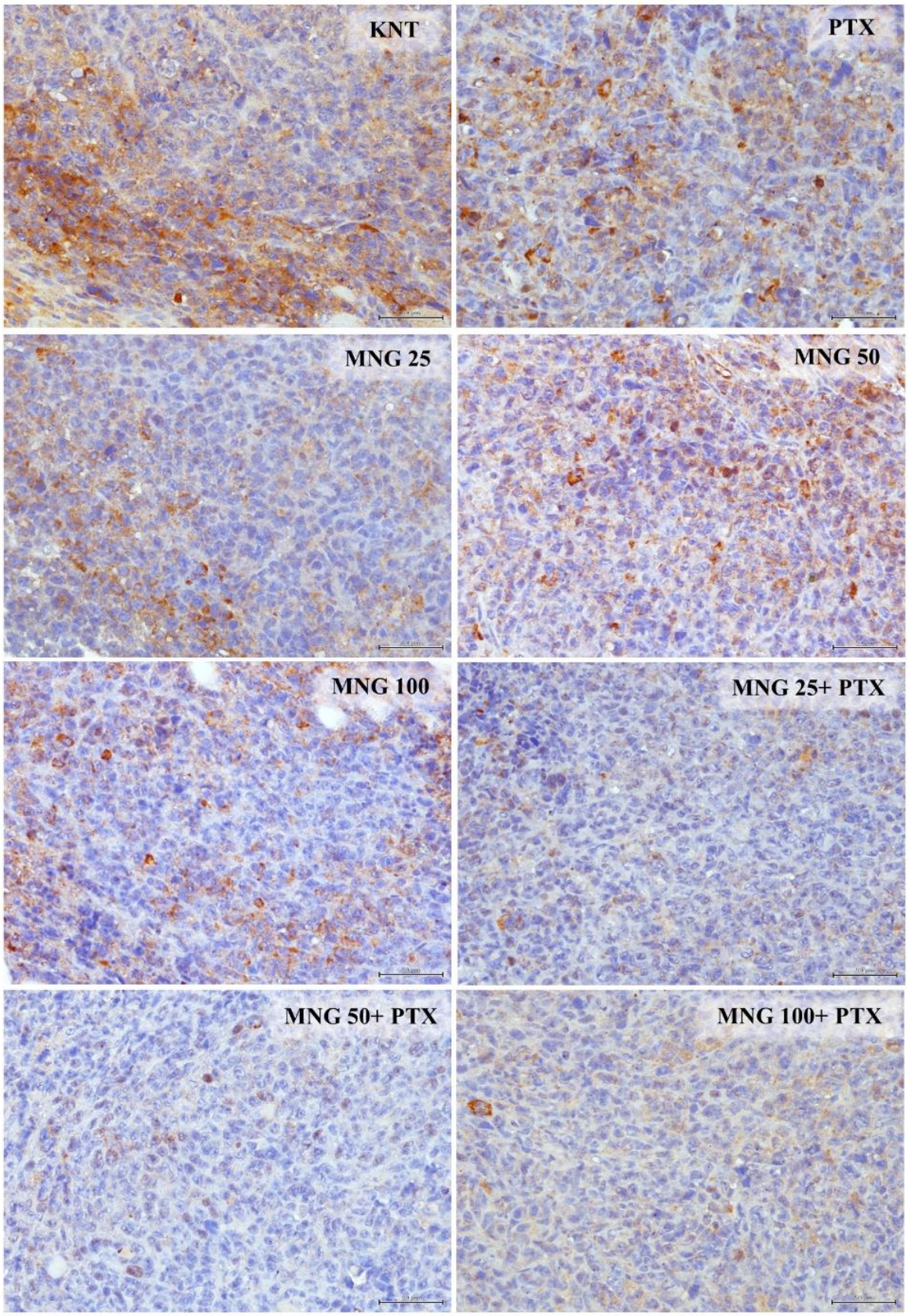
Gruplar	p62 (H-Skor)
KNT	256,40±3,15
PTX 12,5 mg/kg	212,00±4,27***
MNG 25 mg/kg	207,60±4,47***
MNG 50 mg/kg	227,90±2,81***
MNG 100 mg/kg	201,40±4,92***
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	162,20±2,60***
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	149,20±5,04***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	178,30±2,87***

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri



Şekil 4-30: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde p62 (H-Skor) değerleri.

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-31: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik p62 reaksiyonları.

Zıt boya: Mayer Hematoksilen. Bar: 50 µm.

4.2.1.4.4. Mangiferin, Paklitaksel ve Kombinasyonlarının Sağkalım Yolağı Üzerine Etkisi

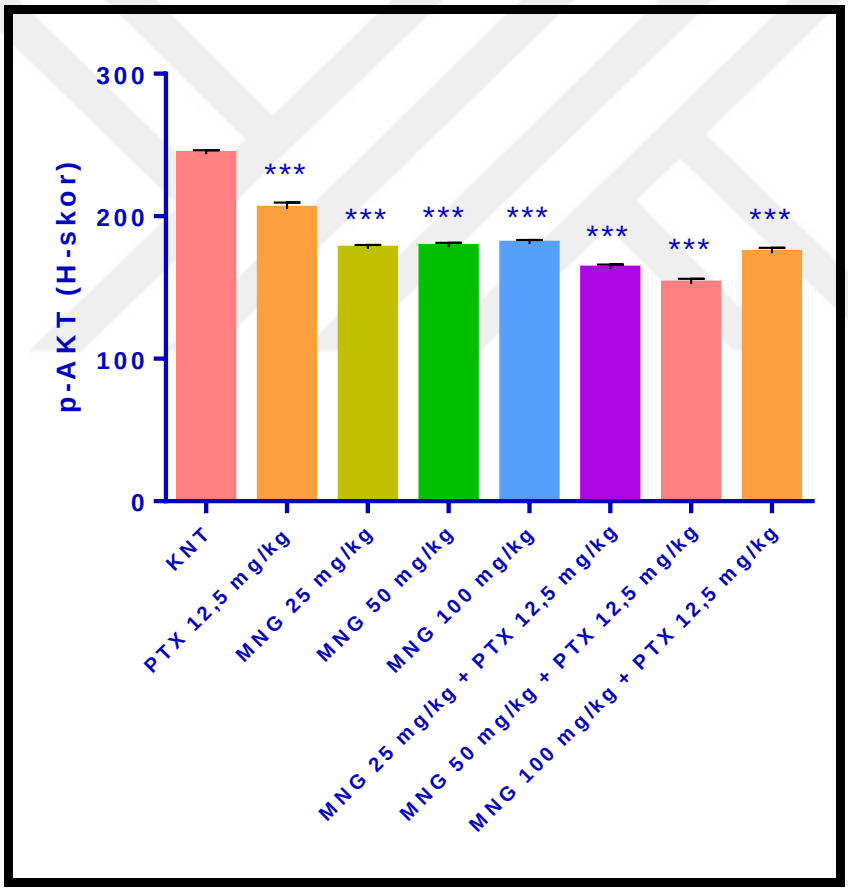
4.2.1.4.4.1. p-AKT'e Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

Hücre sağkalımı, farklılaşması, büyümesi ve çoğalmasını sağlayan yolaklar üzerinde etkili bir protein olan Serin 473 fosforilasyonuna sahip p-AKT oranları, tüm gruplarda immünohistokimya yöntemiyle H-skor yapılarak değerlendirildi. Tüm MNG gruplarında ve MNG+PTX gruplarında p-AKT H-skor değerlerinin kontrole göre anlamlı oranda azaldığı ($P<0,001$) görüldü. En düşük ($P<0,001$) p-AKT H-skorunun (152,68±3,49) MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg grubunda olduğu belirlendi (Tablo 4-14, Şekil 4-32, Şekil 4-33).

Tablo 4-14: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde p-AKT (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

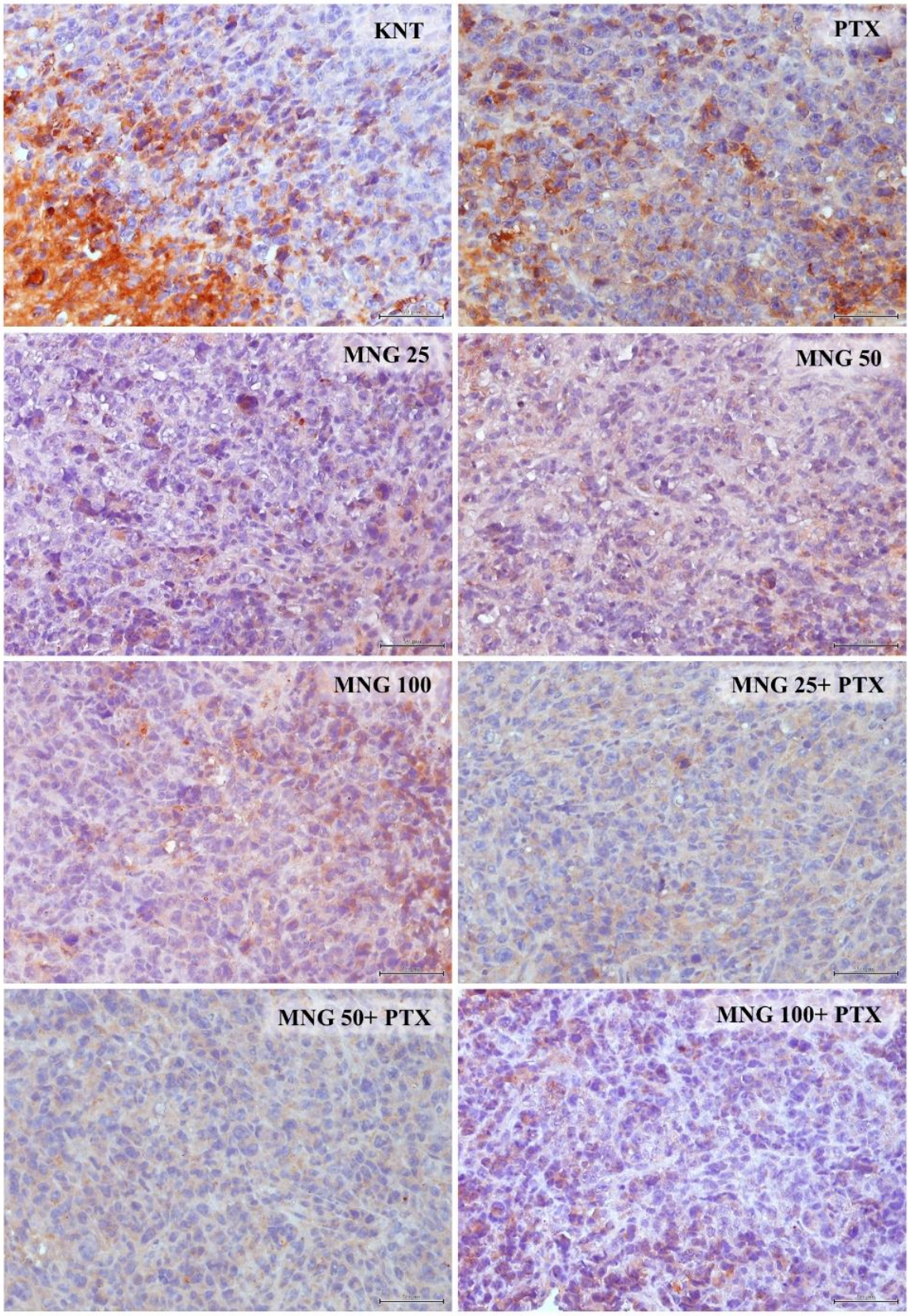
Gruplar	p-AKT (H-Skor)
KNT	243,50±2,88
PTX 12,5 mg/kg	205,00±4,63***
MNG 25 mg/kg	177,08±2,74***
MNG 50 mg/kg	178,38±2,99***
MNG 100 mg/kg	180,56±2,81***
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	163,22±2,83***
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	152,68±3,49***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	174,14±3,86***

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri



Şekil 4-32: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde p-AKT (H-Skor) değerleri.

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-33: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik p-AKT reaksiyonu.

Zıt boya: Mayer Hematoksilen. Bar: 50 µm.

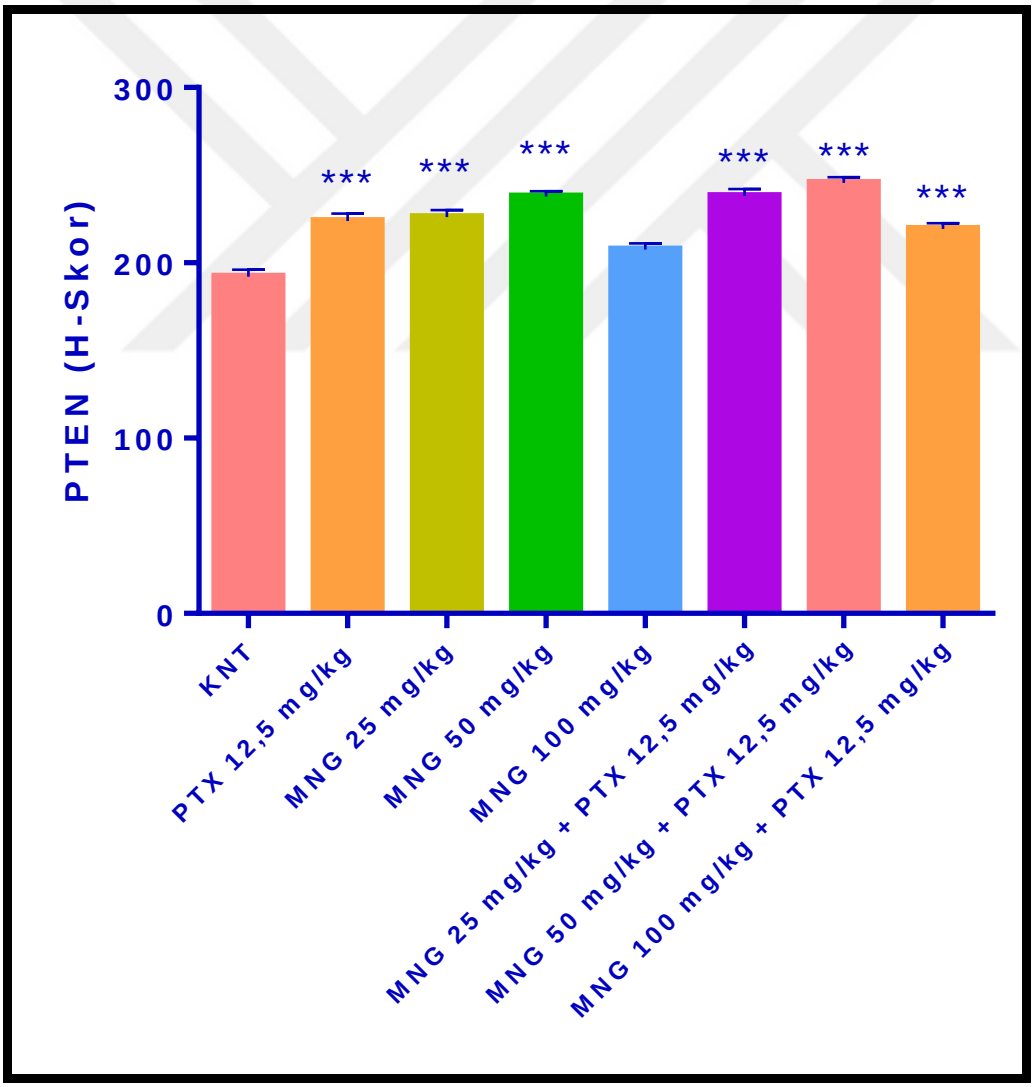
4.2.1.4.4.2. PTEN'e Ait H-Skor Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

PTEN, hücrede tümör baskılayıcı bir gendir. PI3K/AKT yolağını inhibe ederek negatif düzenleyici rol oynar. PTEN immünohistokimya boyamalarından elde edilen H-skor değerlerinde, MNG 100 mg/kg uygulanan grup hariç (207,50±3,50), kontrol grubuna göre tüm deney gruplarında anlamlı bir artış ($P<0,001$) olduğu bulundu. PTEN H-skor değerlerinin, tek başına MNG 50 mg/kg (237,80±3,14), MNG 25 mg+PTX 12,5 mg/kg (238,04±4,07) ve MNG 50 mg+PTX 12,5 mg/kg (245,00±3,36) kombinasyon gruplarında benzer olduğu görüldü (Tablo 4-15, Şekil 4-34, Şekil 4-35).

Tablo 4-15: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinden alınan kesitlerde PTEN (H-Skor) sonuçlarına ait ortalama ± standart hata değerleri.

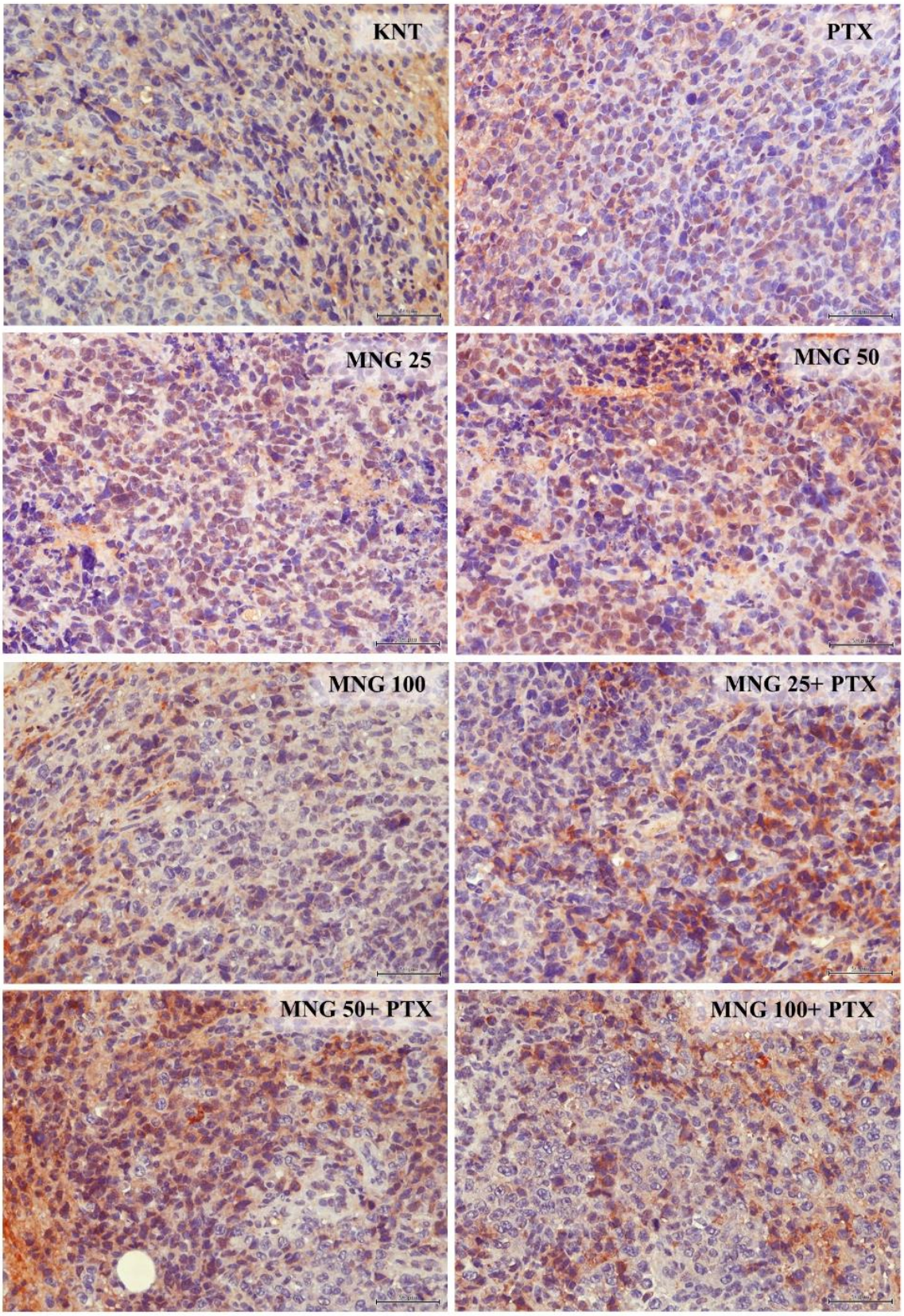
Gruplar	PTEN (H-Skor)
KNT	192,10±3,89
PTX 12,5 mg/kg	224,00±4,07***
MNG 25 mg/kg	226,18±3,89***
MNG 50 mg/kg	237,80±3,14***
MNG 100 mg/kg	207,50±3,50
MNG 25 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	238,04±4,07***
MNG 50 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	245,00±3,36***
MNG 100 mg/kg + PTX 12,5 mg/kg	219,40±3,14***

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-34: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde PTEN (H-Skor) değerleri.

***P<0,001; kontrol grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-35: Tüm gruplara ait tümör dokusu örneklerinde sitoplazmik PTEN reaksiyonu.

Zıt boya: Mayer Hematoksilen. Bar: 50 µm.

4.2.2. Koryoallantoyik Membran (CAM) Testi Bulguları

Mangiferin, Paklitaksel ve kombinasyonlarının antianjiyogenik aktiviteleri *in vivo* CAM testi ile incelendi. Pozitif kontrol olarak (±)-talidomit, negatif kontrol olarak ise boş agar kullanıldı. Elde edilen sonuçlar stereomikroskop yardımıyla kantitatif olarak değerlendirildi. Döllenmiş yumurtanın koryoallantoik membranı (CAM) üzerine uygulanan peletin alt yüzeyinde ve etrafındaki kapillar gelişimi değerlendirilerek skor verildi (Tablo 4-16.) Mikroskobik görüntülemede verilen skorlardan elde edilen sonuçlar, pozitif kontrol (±)-talidomit (skor 0,81±0,03) ile karşılaştırıldı. Buna göre, Mangiferin 50 µg/pelet (skor 0,96±0,09) kuvvetli antianjiyogenik etki gösterirken, Mangiferin 25 µg/pelet (skor 0,72±0,10) ve Mangiferin 12,5 µg/peletin (skor 0,66±0,11) zayıf antianjiyogenik etki gösterdiği bulundu.

Antianjiyogenik özelliği bilinen Paklitaksel'in azalan dozlarının CAM üzerindeki antianjiyogenik özellikleri incelendi. Paklitaksel'in 3 µg/pelet (skor 1,80±0,08; P<0,001), 1,5 µg/pelet (skor 1,50±0,11; P<0.01) ve 0,75 µg/pelet (skor 1,11±0,09) konsantrasyonları çok kuvvetli antianjiyogenik etki gösterirken, 0,375 µg/pelet (skor 0,76±0,03) konsantrasyonunda kuvvetli antianjiyogenik etki gösterdiği saptandı.

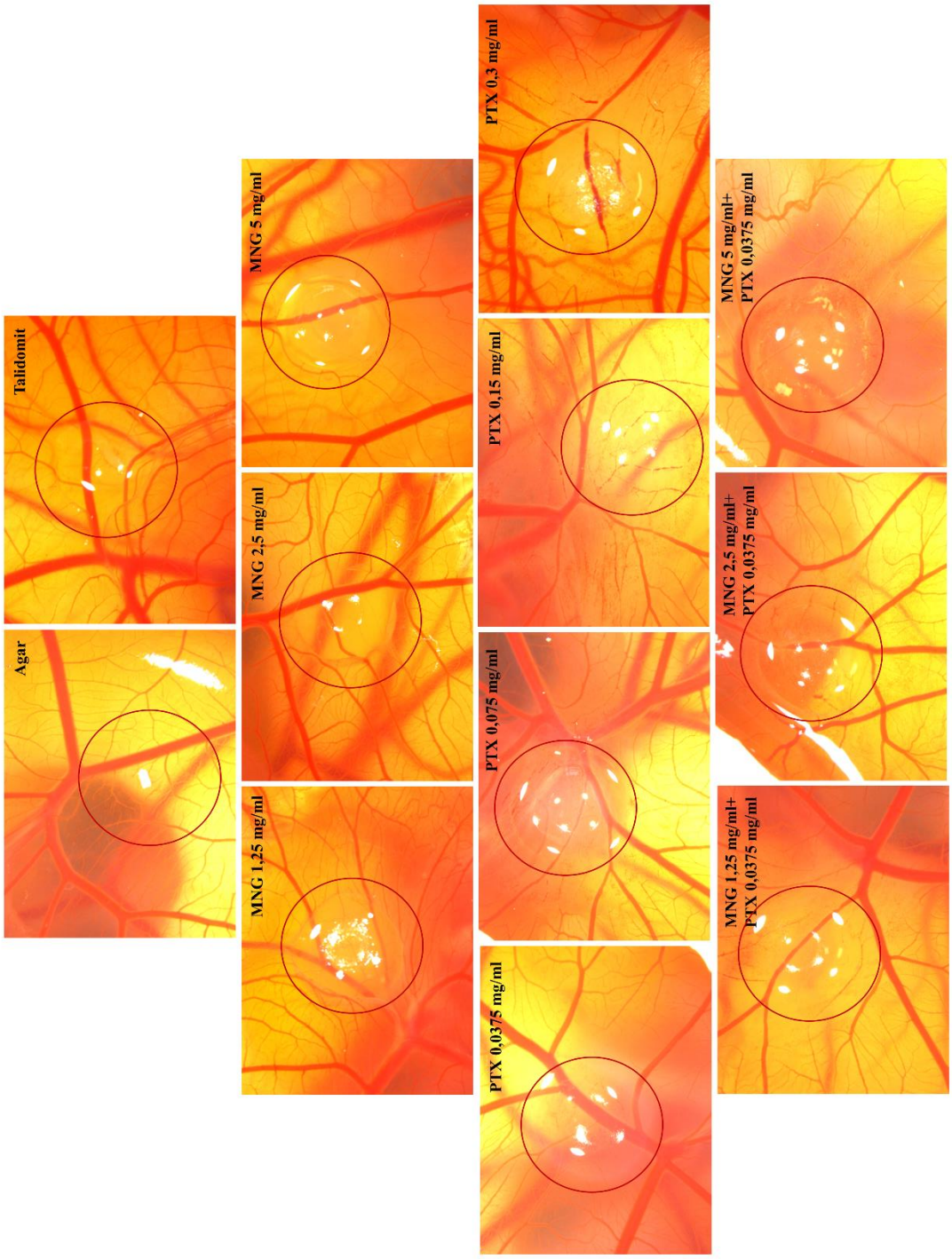
Kuvvetli etkinin görüldüğü 0,375 µg/pelet konsantrasyonundaki Paklitaksel dozu seçilerek, Mangiferin'in 50 µg/pelet, 25 µg/pelet ve 12,5 µg/pelet konsantrasyonları ile kombine edildi ve antianjiyogenik etkileri pozitif kontrol (±)-talidomit ile karşılaştırıldı. Bu kombinasyonlar, pozitif kontrol (±)-talidomit ile karşılaştırıldığında, sırasıyla skor sonuçlarında (1,69±0,09; P<0,001), (1,46±0,10; P<0,001), (1,25±0,08; P<0.05) ile çok kuvvetli etki tespit edildi. Agarın (skor 0,20±0,20) kapillerlerin ve embriyonun gelişimi üzerine hiçbir etkisinin olmadığı gözlendi (Şekil 4-36).

Sonuç olarak *in vivo* CAM yönteminde pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, Mangiferin'in 50 µg/pelet dozunda kuvvetli etki, diğer dozlarda ise zayıf antianjiyogenik etkiye sahip olduğu tespit edildi. Tüm Mangiferin dozlarının, kuvvetli etkiye sahip Paklitaksel dozu olan 0,375 µg/pelet ile kombine edildiklerinde, istatistiksel olarak anlamlı ve additif etki ile çok kuvvetli antianjiyogenik etki gösterdiği bulundu.

Tablo 4-16: CAM testinde Mangiferin, Paklitaksel ve kombinasyonlarının antianjiyogenik etkileri.

Maddeler	Konsantrasyon (µg/pelet)	Ortalama skor	Antianjiyogenik etki
(±)-Talidomit (Pozitif kontrol) 5 mg/ml	50	0,81 ± 0,03	Kuvvetli
Agar (kör)	%2,5, a/h	0,20 ± 0,20	Yok
Mangiferin 5 mg/ml	50	0,96 ± 0,09	Kuvvetli
Mangiferin 2,5 mg/ml	25	0,72 ± 0,10	Zayıf
Mangiferin 1,25 mg/ml	12,5	0,66 ± 0,11	Zayıf
Paklitaksel 0,3 mg/ml	3	1,80 ± 0,08***	Çok kuvvetli
Paklitaksel 0,15 mg/ml	1,5	1,50 ± 0,11**	Çok kuvvetli
Paklitaksel 0,075 mg/ml	0,75	1,11 ± 0,09	Çok kuvvetli
Paklitaksel 0,0375 mg/ml	0,375	0,76 ± 0,03	Kuvvetli
Mangiferin 5 mg/ml + Paklitaksel 0,0375 mg/ml	50 + 0,375	1,69 ± 0,09***	Çok kuvvetli
Mangiferin 2,5 mg/ml + Paklitaksel 0,0375 mg/ml	25 + 0,375	1,46 ± 0,10***	Çok kuvvetli
Mangiferin 1,25 mg/ml + Paklitaksel 0,0375 mg/ml	12,5 + 0,375	1,25 ± 0,08*	Çok kuvvetli

*P<0,05 **P<0,01; ***P<0,001, pozitif kontrol (±)-talidomit grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 4-36: Civciv koryoallantoik membran (CAM) testi ile farklı konsantrasyonlarda Mangiferin, Paklitaksel ve kombinasyonlarının antianjiyogenik etkilerinin stereomikroskop görüntüleri.

Negatif kontrol agar (%2,5, a/h) etki yok. Pozitif kontrol (±)-talidomit'in 50 µg/pelet konsantrasyonunda kuvvetli antianjiyogenik etki. Mangiferin'in 50 µg/pelet konsantrasyonunda kuvvetli etki, 2,5 µg/pelet ve 1,25 µg/pelet konsantrasyonlarında zayıf antianjiyogenik etki. Paklitaksel'in 3 µg/pelet, 1,5 µg/pelet ve 0,75 µg/pelet konsantrasyonlarında çok kuvvetli antianjiyogenik etki, 0,375 µg/pelet konsantrasyonunda kuvvetli antianjiyogenik etki. Mangiferin'in 50-25-12,5 µg/pelet konsantrasyonları, Paklitaksel'in 0,375 µg/pelet konsantrasyonu ile kombine edildiğinde additif etki ile çok kuvvetli antianjiyogenik etki.

5. TARTIŞMA

Son zamanlarda yapılan çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, doğal bileşiklerin antikanser ilaçlar ile birlikte uygulanmasının kanser hücrelerinin duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir (Nabekura (2010). Bu tez çalışmasında da, değişen dozlarda Mangiferin ve Paklitaksel uygulamasının Ehrlich ascites carsinoma hücrelerindeki proliferasyon apoptozis, otofaji ve sağkalım yolakları üzerine etkileri in vitro ve in vivo yöntemlerle incelenmiştir. Ayrıca, bu iki etken maddenin tek başına ve birlikte uygulamalarının, tümör oluşumunda önemli rol oynayan anjiyogenez üzerine etkisi de *in vitro* tüp oluşumu testinde ve *in vivo* CAM modelinde gösterilmiştir.

Mangiferin'in çeşitli kanser hücreleri üzerine proliferasyonu baskıladığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında Mangiferin (6,25-300 µM), Paklitaksel (0,25-15,9 µM) ve kombinasyonlarının 48 saat sonra EAC hücreleri üzerine etkileri ATP hücre canlılık testi ile incelenmiştir.

Li ve ark. (2013) Mangiferin'i 75-150 ve 300 µM dozlarda, MDA-MB-231, BT549, MCF7, T47D gibi çeşitli meme tümör hücre hatları üzerine uygulamışlar ve CCK-8 sitotokisite testi ile hücre canlılıklarını değerlendirmişlerdir. 48 saat sonunda doza bağlı olarak bütün hücre hatlarında Mangiferin 300 µM'da sitotoksik etki görmüşlerdir. Garcia-Rivera ve ark. (2011)'nın, MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde Mangiferin'in 25-800 µg/ml dozlarını uygulayarak 48. saatte MTT yöntemi kullandıkları başka bir çalışmada, uygulanan doz aralığında sitotoksik bir etki görmemişlerdir. Bu sonuçlar, yüksek dozlarda sitotoksik etki görmediğimiz farklı bir meme kanser hücresi olan EAC sitotoksisite sonuçlarımızla uyumludur. Ancak, Li ve ark. (2013)'dan farklı olarak, EAC meme tümöründe Mangiferin 6,25-300 µM doz aralığında 48 saat sonunda ATP testinde sitotoksik etki göstermemiştir. Bunun nedeninin, farklı bir sitotoksisite testi kullanılmasından, EAC'nin farklı bir meme tümörü olmasından, çalışmamızda Mangiferin'in EAC IC50 değerinin altında bir doz kullanılmasından ve Mangiferin'in yüksek dozlarda etki göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Shi ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, Mangiferin'in proliferatif özelliklerini Caco-2, HeLa, A375, HepG2, 7721, MCF-7, A549 ve glioblastoma U87 hücreleri gibi farklı tipte kanser hücreleri üzerinde MTT metoduyla 24. saatte incelemiş ve bu hücre hatlarına ait IC50 doz değerlerini sırasıyla 33, 45, 54, 46, 28, 48, 25 ve 32 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, Mangiferin'in en iyi sitotoksik etkisini akciğer kanser

hücreleri olan A549'da görmüşlerdir. Çalışmada ayrıca, sisplatinin yükselen dozlarıyla, Mangiferin'in 25 µg/ml dozu kombine edilip, MTT metoduyla hücre canlılığı üzerine etkisi incelendiğinde, kombinasyonun sitotoksite üzerine sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, Shi ve ark. (2016) ile benzer şekilde, Mangiferin'in 200 ve 300 µM dozunun EAC meme tümörü hücrelerinde Paklitaksel ile kombine edildiğinde sinerjik etki göstererek sitotoksisiteyi arttırdığı, ancak çok daha düşük doz olan Mangiferin 6,25-100 µM konsantrasyonlarında Paklitaksel ile kombine edildiğinde, tek başına Paklitaksel uygulamasından daha yüksek % canlılık değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize, Mangiferin'in düşük dozları ile Paklitaksel kombine edildiğinde proliferasyonun arttığını ve ortaya çıkan bu farklı cevapların Mangiferin dozuna bağlı olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Polifenollerle yapılan çeşitli kombinasyon çalışmalarında, doza bağlı olarak artan etkinin ortaya çıktığı bildirilmektedir. Huang ve ark. (2019), SW480 kanser hücrelerinde yine bir polifenol olan resveratrolun 80-320 µM dozları ile 5-florourasil'i kombine ettiklerinde, resveratrolün artan dozuna bağlı olarak yükselen sitotoksik bir etki tespit etmişlerdir.

Louisa ve ark. (2014), 12,5-25-50 µM Mangiferin'i bir diğer ajan olan 0,1 µM doksorubisin ile kombine ederek MCF-7 meme tümörü hücrelerine uygulayarak, 96. saatte sitotoksik etkisine bakmışlardır. Mangiferin 50 µM dozu ile kombinasyonda en fazla sitotoksik etki görülmesine rağmen, bu etki %50'nin altına düşmemiştir. Bu tez çalışmasında da, bu çalışmaya benzer şekilde Mangiferin'in 50 µM dozu ile Paklitaksel'in düşük dozları kombine edildiğinde sitotoksik etki göstermediği, hatta proliferasyonu yukarı çektiği belirlenmiştir.

Cuccioloni ve ark. (2016), MCF-10A ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde 50-300 µM aralığında Mangiferin uygulamış ve 24. saat MTT sitotoksisite sonuçlarını incelemişlerdir. Sağlıklı meme hücre hattı olan MCF-10A'da tüm dozlarda sitotoksik bir etki görmemişlerdir. Bizim çalışmamızda da, sağlıklı hücre hattı olarak HUVEC hücre hattı kullanılmış ve 6,25-300 µM Mangiferin dozlarının hiçbirinde, benzer şekilde sitotoksik etki görülmemiştir. Ancak, Cuccioloni ve ark. (2016), MCF-7 üzerine Mangiferin'in 50-300 µM dozlarını uyguladıklarında, konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ve hücre canlılığında azalma görüldüğünü ve bu etkinin Mangiferin'in seçici bir şekilde sitotoksik etki göstermesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Sadhukhan ve ark. (2018), SKRC-45 metastatik insan renal kanser hücresi ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Mangiferin'i sisplatin ile kombine ederek uygulamışlardır. Bu araştırmada, Mangiferin ve sisplatin tamamen farklı olan bu iki tümör hücresi üzerinde benzer sinerjistik etki göstererek, sitotoksisiteyi arttırmıştır (SK-RC-45, %34,5 ve MCF-7, %28,04). Bu tez çalışmasında da Mangiferin'in HUVEC hücrelerinde 12,5-100 µM düşük dozlarında ve EAC kanser hücrelerinde 200-300 µM yüksek dozlarında Paklitaksel ile kombinasyonunda, farklı iki hücre hattı olmasına rağmen benzer şekilde doza bağlı olarak sinerjistik etki ile sitotoksisiteyi arttırdığı bulunmuştur.

Zou ve ark. (2017), CaOV3, SKOV3, OVCAR3, A2780, TOV112D, TOV21G gibi çeşitli ovaryum kanser hücre hatları üzerinde Mangiferin'i 12,5-100 µg/ml uygulamışlar ve bu hücrelerdeki sitotoksik cevapları incelemişlerdir. Bu hücreler içerisinde hepsi insan over kanser hücre hattı olmasına rağmen, en düşük IC50 değeri OVCAR3 hücrelerinde görülmüştür. Sonrasında bu hücrelere Mangiferin uygulanarak MTT sitotoksisite testi yapılmış ve 48 saat sonunda Mangiferin'in doz ve zamana bağlı olarak proliferasyonu inhibe ettiği belirlenmiştir. Ardından, sisplatin ile kombine edildiğinde sensiviteyi arttırarak, zamana ve doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca Zou ve ark. (2017), sağlıklı Çin Hamsteri ovaryum hücrelerine yüksek doz 100 µg/ml Mangiferin uyguladıklarında, sitotoksik etki görmemişler ve kanser ile sağlıklı hücre arasında seçici sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Shoji ve ark. (2011) AML, KG-1, KY821, NIH3T3, ST2 ve MC3T3-E1 gibi farklı hücre hatları üzerinde 100 µg/ml Mangiferin uygulaması yaptıklarında, Mangiferin'in lösemi tümör hücre hattı olan KG-1, KY821 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu, ancak sağlıklı NIH3T3, ST2 ve MC3T3-E1 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olmadığını göstermişlerdir. Ayrıca, AML hücrelerine 10-100 µg/ml Mangiferin uygulaması yaptıklarında, 10-25 µg/ml dozlarının sitotoksisiteye etkisi olmadığını, ancak 100 µg/ml yüksek dozda canlılığın %42,39 oranında düştüğünü belirlemişlerdir. Shoji ve arkadaşlarından farklı olarak, çalışmamızda EAC meme tümörü ve HUVEC sağlıklı hücre hattı kullanılmıştır. Ancak sonuçlar değerlendirildiğinde, Mangiferin 200 ve 300 µM dozunun Paklitaksel ile kombine edildiğinde, seçici bir şekilde meme tümörü hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterirken, sağlıklı hücreler olan HUVEC üzerinde proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, Mangiferin'in diğer polifenoller gibi tümör ve

sağlıklı hücreler üzerinde seçici davranarak, sitotoksik etki ortaya koyduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında Mangiferin'in farklı dozları ve bu dozların Paklitaksel ile kombinasyonunun *in vivo* EAC meme tümörü üzerinde etkilerinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, erkek Balb/c farelerde in vivo EAC solid tümör modeli oluşturulmuştur. Mangiferin 25-50-100 mg/kg, Paklitaksel 12,5 mg/kg tek başına ve bu dozların kombinasyonları şeklinde, EAC tümörü geliştirilen hayvanlara uygulanmıştır. Deneyin sonunda hayvanlar sakrifiye edildikten sonra elde edilen tümör volümleri incelendiğinde, tüm Mangiferin, Paklitaksel ve kombinasyon gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. Mangiferin'in tek başına uygulandığı grupların tümör volümlerindeki azalmanın sırasıyla; Mangiferin 25 mg/kg grubunda %44,45; Mangiferin 50 mg/kg grubunda %51,04; Mangiferin 100 mg/kg grubunda %43,22 olduğu tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olan Paklitaksel grubunda ise tümör volümünün %36,40 oranında azaldığı belirlenmiştir. EAC tümörü üzerinde Mangiferin'in 50 mg/kg dozunun tek başına uygulanan dozlar içerisinde, tümör volümünü en fazla küçülten doz olduğu görülmektedir. Kombinasyon gruplarında ise, 25 mg/kg ve 50 mg/kg Mangiferin'in belirgin sinerjik etki göstererek Paklitaksel sensivitesini arttırdığı ve EAC tümör volümünü sırasıyla %65,48 ve %71,70 oranında küçülttüğü bulunmuştur. Ancak, yüksek doz olan Mangiferin'in 100 mg/kg dozu ile Paklitaksel 12,5 mg/kg kombinasyonunda kontrol grubuna göre azalma olsa da sinerjik etki göstermediği belirlenmiştir.

Sadhukhan ve ark. (2018), swiss albino erkek farelerde, EAC solid meme tümörü üzerine Mangiferin ve sisplatin uygulamasının etkilerini in vivo çalışmayla incelemişlerdir. Bu çalışmada, üç hafta boyunca her gün Mangiferin 20 mg/kg dozda oral yolla, sisplatin ise 10 mg/kg dozda haftada bir kez olacak şekilde intraperitonal enjeksiyonla hayvanlara tek başına ve kombinasyon olarak uygulanmıştır. Çalışmada, Mangiferin'in belirtilen dozda tek başına EAC tümöründe tümör volümünü kontrol grubuna göre neredeyse yarı yarıya düşürdüğü, sisplatinle kombine edildiğinde ise sinerjistik antitümöral etki göstererek, tümör volümünü kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha da küçülttüğü gösterilmiştir Bu tez çalışmasında, Balb/c farelerde oluşturulan in vivo EAC solid tümör modelinde Mangiferin'in tek başına 25 mg/kg düşük doz olarak uygulaması da Sadhukhan ve ark. (2018)'nın çalışmasına benzer şekilde, kontrol grubuna göre tümör volümünü %44,45 azaltmıştır. Ayrıca, Mangiferin'in bu dozunun Paklitaksel ile kombinasyonunda

da sinerjistik etki ile tümör volümünü %65,48 oranında kontrole göre küçülttüğü görülmüştür. Sadhukhan ve ark. (2018) çalışmasında 20 mg/kg Mangiferin 3 hafta boyunca her gün uygulanmış, kontrol grubuna göre tümör volümü azalmasına rağmen, bu değer anlamlı bulunmamıştır. Bu tez çalışmasında ise, 12 gün gibi kısa bir sürede 25 mg/kg Mangiferin uygulaması, kontrol grubuna göre EAC tümör volümünü anlamlı şekilde küçültmüştür. Daha kısa sürede, 25 mg/kg Mangiferin'in tümör volümünü etkili bir şekilde azaltmasının, kullanılan fare soyundan ve başlangıçta inoküle edilen EAC tümör hücre sayısından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasında, 50 ve 100 mg/kg Mangiferin dozları da EAC meme tümörü üzerinde uygulanmış ve pozitif kontrol olan Paklitaksel ile de kombine edilmiştir. Mangiferin'in çeşitli tümörlerde tek başına farklı dozlarda uygulaması yapılmıştır, ancak EAC tümörü üzerinde 50 ve 100 mg/kg dozu ilk defa bu tezde tek başına uygulanmış ve tümör volümü üzerine olan etkileri ortaya konulmuştur. Sonrasında EAC tümörü üzerinde Paklitaksel ile Mangiferin'in yükselen dozları kombine edilerek, sinerjistik etkisinin olduğu ve bu etkinin doza bağlı olarak ortaya çıktığı belirlenmiş ve yine bu kombinasyonun ilk kez bu tez çalışmasında EAC tümöründe tümör volümü üzerine etkileri ortaya konmuştur.

Li ve ark. (2013), SCID farelere tümör inokülasyonundan önce bir hafta boyunca 100 mg/kg Mangiferin'i gavaj yoluyla uygulamışlardır. Ardından insan meme tümörü olan $2x10^6$ MDA-MB-231 meme kanseri hücresini subkutan olarak hayvanlara inoküle etmişlerdir. Devamında 5 hafta gavaj yoluyla Mangiferin uygulamışlardır. Beş haftalık süre sonunda hayvanların tümör volümlerinde ve tümör ağırlıklarında azalma olduğunu göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında da, uygulanan 100 mg/kg Mangiferin dozunda 12 günlük kısa bir uygulama süresi olmasına rağmen, EAC meme tümörü üzerinde Li ve ark. (2013)'nın bulgularına benzer şekilde tümör volümünün ve tümör ağırlıklarının kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür.

Wang ve ark. (2018), in vivo zenograft meme kanser modelinde, bir Mangiferin analoğu olan Isomangiferin'in etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla, solid meme tümörü oluşturulan hayvanlara bir ay boyunca intraperitonal olarak 10 mg/kg/gün Isomangiferin uygulamışlardır. Çalışmanın sonunda tümör büyüklüklerinin baskıladığını ve kontrol grubuna göre isomangiferin uygulanan grupta yaklaşık %75 tümörlerin küçüldüğünü, göstermişlerdir. Bu çalışmada sadece kontrol grubu ile karşılaştırma yapılmış herhangi bir

pozitif kontrol ya da Mangiferin kullanılmamıştır. Bizim çalışmamızda ise tek başına Mangiferin uygulanan gruplar arasında en yüksek tümör inhibisyonunun %51,04 ile 50 mg/kg Mangiferin uygulanan grupta görüldüğü tespit edilmiştir. Çalışmamızda Mangiferin 50 mg/kg ile Paklitaksel kombinasyonu yapıldığında sinerjistik etki ile %71,7 oranında tümör inhibisyonu görülmüş ve bu sonucun İsomangiferinin etkisine benzer olduğu belirlenmiştir. Mangiferinin, İsomangiferine göre farklı dozlarda etki göstermesinin kullanılan tümör çeşidinden ve farklı uygulanma sürelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Mangiferin ile çeşitli kanser türlerinde yapılan in vivo çalışmalar da mevcuttur. Zou ve ark. (2017), insan ovaryum adenokarsinoma olan $5x10^6$ OVCAR3 hücresi kullanarak BALB/c nude farelerde zenograft solid tümör modeli oluşturmuşlardır. Sonrasında Mangiferin'in 10-50-100 mg/kg olarak belirlenen üç farklı dozu intraperitonal enjeksiyonla 2 hafta boyunca her gün hayvanlara uygulanmıştır. Bu çalışmada, öncelikle Mangiferin'in farklı dozlarının tümör büyüklüğü ve sağkalım üzerine olan etkileri incelenmiş ve intraperitonal enjeksiyonla verilen Mangiferin'in 50 ve 100 mg/kg dozlarının kontrol grubuna göre tümör volümünü doza bağlı bir şekilde anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir. Tümör volümü üzerinde düşük doz olan 10 mg/kg dozu, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalmaya neden olmamıştır. Bu çalışmada Mangiferin 50 mg/kg dozu, 10 mg/kg sisplatin ile kombine edilerek uygulanmış ve OVCAR3 hücreleri üzerinde Mangiferin'in sisplatinin sensivitesini arttırarak, tümör büyüklüğünü azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, Mangiferin'in OVCAR3 solid tümörlü farelerde yaşam süresini kontrol grubuna göre arttırdığı gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da üç farklı Mangiferin dozu belirlenmiş ve EAC hücrelerine Zou ve ark. (2017)'nın çalışmasından farklı olarak, Mangiferin oral olarak uygulanmış ve tümör volümü üzerindeki etkileri incelenmiştir. Zou ve ark. (2017) oluşturdukları deneysel çalışma için, öncelikle tümör büyüklüklerinin belirli bir aşamaya gelmesini bekleyerek, sonrasında Mangiferin uygulamaya başlamış ve 14 gün bu uygulamaya devam etmişlerdir. Hayvanlardan bir kısmını ayırarak sağkalım takibi yapmışlardır. Bu tez çalışmasında ise, EAC meme tümör hücre inokülasyonu ile birlikte Mangiferin uygulaması yapılmaya başlanmış ve sağkalım takibi yapılmamıştır. Çalışmada her ne kadar sağkalım takibi yapılmasa da, deneysel çalışma süresi içerisinde hayvanlarda uygulamalara ya da tümör gelişimine bağlı olarak ölüme rastlanmamıştır. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara bakıldığında, Mangiferin'in 25-50 ve 100 mg/kg dozlarının EAC meme tümörü üzerinde, OVCAR3 solid tümör üzerine benzer şekilde etki gösterdiği

bulunmuştur. Mangiferin 25-50-100 mg/kg dozları EAC solid tümör volümünü sırasıyla %44, 45; %51,04 ve %43,22 oranında kontrol grubuna göre baskılamıştır. Zou ve ark. (2017)'nın çalışma sonuçlarına benzer şekilde Mangiferin, doza bağlı olarak EAC meme tümör volümü üzerine etki göstemiştir. Ancak, bu tez çalışmasında Mangiferin'in 100 mg/kg olan yüksek dozunda tümör volümü üzerinde etkili olsa da, bu etkinin doz artışına bağlı olmadığı gösterilmiştir. 100 mg/kg dozunun tümör volümü üzerindeki bu etkisi, 25 mg/kg düşük doz grubuna benzer bulunmuştur. Yine Zou ve ark. (2017), sisplatin 10 mg/kg ve Mangiferin 50 mg/kg dozunu kombine ederek, solid tümör modelinde hayvanlara uygulamışlardır. Bu tez çalışmasında da, 50 mg/kg Mangiferin ve 12,5 mg/kg Paklitaksel kombinasyonu EAC meme tümörü üzerinde sinerjistik etki göstererek, tümör volümünü %71,70 oranında kontrol grubuna göre anlamlı olarak baskılamıştır. Bu sinerjistik etki, farklı bir tümör olmasına rağmen OVCAR3 solid tümör hücrelerinde sisplatin 10 mg/kg ve Mangiferin 50 mg/kg kombinasyonunun gösterdiği sinerjistik etki ile benzerdir.

Shi ve ark. (2016), A549 insan akciğer tümör hücreleri kullanarak yaptıkları fare zenograft çalışmalarında, 10-50-100 mg/kg dozda Mangiferin'i intraperitonal enjeksiyonla iki hafta boyunca uygulamışlar ve bu dozların antikanser özelliğini sisplatinle karşılaştırmışlardır. Çalışmada, sisplatin 10 mg/kg uygulaması tümör volümünü %80,60 azaltırken, Mangiferin'in 100 mg/kg dozu da sisplatine benzer şekilde, tümör volümünü %71,30 baskılamıştır. Diğer uygulanan 50 mg/kg ve 10 mg/kg Mangiferin dozlarının da benzer etki göstererek, tümör volümünü sırasıyla %29,50-%23,90 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir. Ancak 10 mg/kg dozunun, tümör volümü üzerinde azalmaya neden olsa da, bu değerin kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında EAC meme tümörü farklı bir tümör olmasına rağmen, 50 ve 100 mg/kg Mangiferin uygulamasından elde edilen tümör volümü sonuçlarının, Shi ve ark. (2016)'nın sonuçlarına benzer olduğu bulunmuştur. Ancak, EAC tümörü üzerinde 50 mg/kg Mangiferin, tümör volümünü %51,04; 100 mg/kg Mangiferin ise %43,22 oranında baskılamıştır. Shi ve ark. (2016)'nın çalışmasında 50 mg/kg Mangiferin, tez çalışmasındakine benzer sürelerde uygulanmasına rağmen, A549 solid tümör volümü üzerine daha az etki göstermiştir. Mangiferin 100 mg/kg uygulaması ise A549 solid tümör volümü üzerinde kontrol grubuna göre çok daha yüksek etki göstermiştir. Tez çalışmasından farklı olarak ortaya çıkan bu sonucun, Mangiferin'in tümör tipleri üzerine seçici etki göstermesinden ve farklı yollardan uygulanmasının Mangiferin'in etkinliğini değiştirebileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tümör hücrelerinin proliferasyon yeteneği, kanser diyagnozunda önemli bir belirteçtir. Bu nedenle kanser sağaltımında proliferasyonu baskılamak, esas hedefler arasında yer almaktadır (Farber, 1995; Feitelson ve ark., 2015). Hücrelerin proliferasyon özellikleri, çeşitli belirteçlerle tespit edilebilmektedir. En iyi bilineni, hücre siklusu belirteçlerinden birisi de olan prolifere hücre nukleus antijeni (PCNA) proteinidir (Juríková ve ark., 2016). Hücre içi PCNA ekspresyonu, hücre döngüsünün G1-S fazları sırasında önemli ölçüde yükselmektedir. Bölünmeyen hücrelerdeki PCNA ekspresyonunun çok düşük olması, bu proteini iyi bir hücre proliferasyon belirteci yapmaktadır (Aaltomaa ve ark., 1993). In vivo EAC meme tümörü kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, Paklitaksel'in tek başına 12,5 mg/kg uygulamasının PCNA'yı baskıladığı bildirilmiştir (Armutak ve ark., 2016).

Cuccioloni ve ark. (2016), MCF7 meme kanseri ve MCF10-A sağlıklı meme hücre hatlarında Mangiferin'in 10 μM ve 100 μM dozlarının 24. saatte PCNA üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmayla, MCF7 hücrelerinde özellikle Mangiferin 100 μM dozunun PCNA ekspresyon düzeyini azaltarak, hücre proliferasyonunu bloke ettiği bildirilmiştir. İnsan meme kanseri olan MDA-MB-231 hücreleri ile yapılan bir zenograft çalışmada, uzun süreli oral 100 mg/kg dozda Mangiferin uygulamasının, başka bir proliferasyon belirteci olan Ki-67 düzeyini düşürdüğü bildirilmiştir (Li ve ark., 2013). Araştırmacılar, immünohistokimyasal Ki-67 % indeks düzeylerinin, kontrol grubunda %50 düzeylerindeyken, Mangiferin uygulanan grupta %10'a kadar düştüğünü ve buna paralel olarak tümör büyüklüğünün de azalmış olduğunu göstermişlerdir (Li ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında, 100 mg/kg Mangiferin daha kısa süre uygulanmasına rağmen, sonuçlar Li ve ark. (2013)'nın bulgularına benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda 100 mg/kg Mangiferin uygulamasıyla PCNA indeks değerleri kontrol grubuna göre azalmış ve indeks değeri %63,29 olarak belirlenmiştir. Ayrıca kullandığımız tüm Mangiferin dozları, kontrol grubuna göre PCNA indekslerini azaltmış ve bu azalmanın, tümör büyüklüklerindeki küçülme ile de paralel olduğu görülmüştür. Çalışmamızda 100 mg/kg ve 25 mg/kg Mangiferin'in Paklitaksel ile kombine edilmesinin, proliferasyon üzerinde sinerjistik bir etkisi olmadığı görülmüştür. Ancak, tek başına 50 mg/kg Mangiferin uygulanan grubun %50,82 olan PCNA indeksi düzeylerinin, Paklitaksel ile kombine edildiğinde %38,81 düzeylerine düştüğü görülmüştür. Bu sonuçlar bize, EAC meme tümöründe tek başına uygulanan Mangiferin dozlarının, proliferasyon üzerinde Paklitaksel kadar baskılayıcı bir etkisi olduğunu göstermiştir. EAC tümöründe, Paklitaksel ile proliferasyon üzerine en fazla

sinerjistik etki gösteren Mangiferin dozunun da 50 mg/kg olduğu, ilk defa bu tez çalışmasında belirlenmiştir.

Apoptozis, normal gelişim ve yaşlanma sırasında, dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için ortaya çıkan programlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Ayrıca immün reaksiyonlarda ya da hücreler çeşitli hastalık veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak da karşımıza çıkmaktadır (Vinatier ve ark., 1996; Norbury ve Hickson, 2001). Kanserlerin gelişiminde ve ilerlemesinde, apoptozisin baskılanmasının merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (Kerr ve ark., 1994). Dolayısıyla, birçok hastalığın tedavi stratejisinde popüler hedef olan apoptozis, kanser tedavisinde de önemli bir rol oynamaktadır (Wong, 2011).

MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hatlarını kullanarak Mangiferin'in antikanser özelliğinin incelendiği bir çalışmada, Mangiferin'in 75, 150 ve 300 µM konsantrasyonlarda 48 saatte flow sitometri yöntemi ile apoptotik özellikleri incelenmiş ve hücrelerde doz artışıyla yükselen bir apoptozis etkisi gözlenmiştir. Özellikle, yüksek doz olarak kullanılan 300 µM dozda, apoptotik yüzdede belirgin bir artış tespit edilmiştir (Li ve ark., 2013). Yine Mangiferin'in OVCAR3 hücreleri üzerine apoptotik etkisinin flow sitometri yöntemiyle incelendiği farklı bir çalışmada, 25 µg/ml Mangiferin uygulamasının apoptozisi arttırdığı ve 1 µg/ml sisplatin ile kombine edildiğinde, bu etkinin sinerjistik olarak daha da yükseldiği bildirilmiştir (Zou ve ark., 2017). Bu tez çalışmasında, *in vitro*da Mangiferin 300 µM ve Paklitaksel 3,98 µM tek başlarına ve kombinasyon olarak uygulanmıştır. 48 saatin sonunda apoptozis üzerine etkileri western blot yöntemi ile incelendiğinde, apoptozis dış yolak üzerinde yer alan DR4 reseptör ekspresyonunun değişmediği görülmüştür. Dış yolak üzerinde yer alan ölüm reseptörlerinden bir diğeri de FAS'tır (Safa, 2013). Çalışmamızda FAS ekspresyonu incelendiğinde ise, Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunda FAS'ın belirgin düzeyde arttığı belirlenmiştir, Paklitaksel ve Mangiferin'in tek başına uygulamasında FAS ekspresyonunun kontrole göre az oranda arttığı gözlenmiştir. Rajendran ve ark. (2015), Mangiferin'in farklı bir kanser hücre hattı olan K562 hücrelerinde apoptozis üzerine hangi yoldan etki ettiğini inceledikleri çalışmalarında, Mangiferin'in FAS ekspresyonunu arttırarak dışsal apoptotik yolağını aktive ettiğini bildirmişlerdir (Cheng ve ark., 2007). Bu sonuçlar bize in vitroda Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunun apoptozisi dış yolak üzerinden başlattığını göstermektedir.

Çalışmamızda, apoptoziste mitokondriyal yol belirteci olan BAX protein düzeyi incelendiğinde, *in vitro*da Mangiferin 300 μM ile Paklitaksel 3,98 μM kombinasyonunda belirgin şekilde azalma gözlenmiştir. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak Cuccioloni ve ark. (2016)'nın çalışmasında, 10 ve 100 μM dozda Mangiferin'in MCF7 hücrelerinde BAX'ı kademeli olarak arttırdığı, Bcl 2 düzeylerini ise kademeli olarak azalttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, p27 ve kaspaz-9 aktivitesi incelenmiş ve Mangiferin'in içsel yolak kullanarak hücreleri apoptozise sürüklediği bildirilmiştir. Cuccioloni ve ark. (2016)'nın, insan meme tümör hücreleri kullanarak elde ettikleri bu sonuçların, bizim çalışmamızın sonuçlarından farklı olmasının, her iki çalışmada kullanılan meme tümörü hücrelerinin ve Mangiferin dozlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

EAC deneysel meme tümörü dokularında BAX protein düzeyleri immünohistokimyasal metotla incelendiğinde, Paklitaksel 12,5 mg/kg dozda BAX'ın arttığı görülmüştür. Armutak ve ark. (2016), EAC meme tümörü dokularında Paklitaksel'in BAX üzerine etkisini inceledikleri çalışmada, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde BAX değerlerinin kontrole göre belirgin olarak arttığını bildirmişlerdir. Mangiferin'in 25-50 ve 100 mg/kg gruplarına ait BAX değerleri incelendiğinde ise, kontrole göre bir azalma göze çarpmaktadır. Kombinasyon gruplarına ait BAX değerleri incelendiğinde ise, Mangiferin 25 mg/kg ile 50 mg/kg konsantrasyonlarının Paklitaksel ile kombine edildiği gruplarda, tek başına Mangiferin gruplarına benzer şekilde, kontrole göre azalma gözlenmiştir. Mangiferin 100 mg/kg ile Paklitaksel'in kombine edildiği gruba ait BAX düzeyi, kontrol grubuna benzer çıkmıştır. EAC meme tümöründen elde edilen dokularda incelenen BAX protein düzeyi, western blot bulguları ile karşılaştırıldığında da benzerlik göstermektedir. Mangiferin, EAC meme tümörü dokularında tek başına ve kombinasyon gruplarında BAX düzeyini baskılamaktadır.

Zou ve ark. (2017), OVCAR3 kanser hücrelerinde 24. saatte western blot yöntemiyle Mangiferin'in etkilediği apoptozis yolağını tanımlamak için yaptıkları çalışmalarında, hücrelerin BID yolağı üzerinden mitokondri yolağına geçtiğini tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında, EAC hücrelerinde in vitroda sadece kırılmış PARP düzeyleri incelendiğinden, Zou ve ark. (2017)'nin sonuçları ile bir karşılaştırma yapılamamıştır. Kırılmış PARP düzeyleri incelendiğinde ise, yine Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunda belirgin bir artış gözlenmiştir. Kırılmış PARP'ın varlığı, Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunun apoptozisi arttırdığını kanıtlamaktadır

(Decker ve Muller, 2002). A549 hücre hattında Mangiferin'in apoptotik etkisinin 0-48 saat aralığında incelendiği bir çalışmada, Mangiferin'in 25 µg/ml konsantrasyonda içsel apoptozis yolağında yer alan proapoptotik BAX ekspresyonunu arttırdığı, anti-apoptotik Bcl2 ve Bcl-XL protein seviyelerini inhibe ettiği, mitokondriden sitosole sitokrom c'nin salınımına neden olarak, sonrasında kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün kırılarak aktifleştiği ve PARP'ın da kırıldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada A549 hücre hattında Mangiferin'in kaspaz bağımlı ve içsel yolak kullanılarak apoptotik etki gösterdiği belirlenmiştir (Shi ve ark., 2016). Bu tez çalışmasındaki western blot sonuçlarında, Paklitaksel uygulaması BAX ekspresyonunun artışına neden olurken, Mangiferin tek başına uygulandığında BAX ekspresyonunu azaltmıştır. Paklitaksel ile Mangiferin kombinasyonunda da BAX oranları çok belirgin bir biçimde azalmıştır. Src, hücre için önemli olan çoğalma, senesens ve apoptozis gibi süreçler üzerinde etkili olan, onkogenik potansiyeli yüksek bir proteindir (Lopez ve ark., 2012). Src fosforilasyonu, proapoptotik uyarıda etkili olan genlerden Bad, BAX ve kaspaz-9'un inaktivasyonunu gerçekleştirerek, apoptozis üzerine etki etmektedir (Zha ve ark., 1996; Cardone ve ark., 1998). Bu tez çalışmasında in vitro p-Src düzeyleri, Paklitaksel ve Mangiferin'in tek başına uygulandığı grupta kontrole göre azalırken, kombinasyon yapıldığında belirgin biçimde artış göstermiştir. Kombinasyon grubundaki p-Src nin artışı, BAX protein düzeylerinin belirgin biçimde azalması ve PARP'ın kırılması, p-Src'nin antiapoptotik protein olan BAX'ı baskılayarak, mitokondri yolunun atlanıp, doğrudan dış yolak üzerinden apoptozisin gerçekleşmesine neden olduğunu göstermektedir.

Kaspaz-3, efektör kaspazlar grubunda yer almaktadır. Klasik bir apoptozis belirteci olan kaspaz-3 kırılarak aktifleşir ve DNA'nın internükleozomal bozulmasını başlatır (Enari ve ark., 1998). Meme tümörü olmayan HL-60 hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, Mangiferin'in 100 µg/ml dozda 48 saat uygulanmasıyla, kaspaz-3 aktivitesini belirgin bir düzeyde arttırarak, hücreleri apoptozise sürüklediği raporlanmıştır (Shoji ve ark., 2011). HeLa ve HT29 hücre soylarında Mangiferin ve oksaliplatin beraber kullanıldığında, Mangiferin'in aktif kaspaz-3 yüzdesini arttırarak, oksaliplatinin apoptotik etkisini güçlendirdiği bildirilmiştir (du Plessis-Stoman ve ark., 2011). Mangiferin'in 0-40 µM doz aralığında 72. saatte prostat kanseri hücreleri üzerine flow sitometri yöntemi ile apoptotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, doza bağlı olarak aktif kaspaz-3 varlığının arttığı raporlanmıştır (Li ve ark., 2016). Shi ve ark. (2016)'nın akciğer tümör hattı üzerine yaptıkları in vitro çalışmada, Mangiferin'in kaspaz yolağını kullanarak hücreleri

apoptozise gönderdiği bildirilmiştir. İn vitro şartlarda yapılan çalışmada 25 µg/ml konsantrasyonda 0-48 saat aralığında Mangiferin'in kaspaz-3 aktivasyonu üzerine etkisi incelendiğinde, etkinin saate bağlı olarak arttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada apoptozis belirteçlerinden kırılmış PARP varlığı da analiz edilmiş ve burada da saate bağlı artış gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen bir in vivo çalışmada, 100 mg/kg dozda Mangiferin'in tümör volümü ve apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir. Deney sonucunda Mangiferin'in kontrol grubuna göre tümör volümünü belirgin biçimde düşürdüğü ve aktif kaspaz-3 düzeyini yükselterek apoptozisi arttırdığı tespit edilmiştir (Li ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında, in vivo EAC meme tümöründen elde edilen dokularda apoptotik protein belirteci olarak aktif kaspaz-3 ve kırılmış PARP immünohistokimyasal yöntem ile incelenmiştir. Armutak ve ark. (2016)'nın çalışmasına benzer şekilde, in vivo EAC meme tümörü kullanılarak gerçekleştirilen çalışmamızda Paklitaksel'in 12,5 mg/kg uygulamasının apoptozis üzerine etkileri incelenmiş ve aktif kaspaz-3'ün, dolayısıyla apoptozisin uygulama gruplarında arttığı tespit edilmiştir. Tüm gruplardaki aktif kaspaz-3 sonuçlarının EAC tümöründe, kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yükseldiği görülmüştür. Tüm Mangiferin dozlarının Paklitaksel grubuna göre daha fazla aktif kaspaz-3 artışına neden olduğu bulunmuştur. İn vivo çalışmada, EAC meme tümöründe uygulanan Mangiferin dozları içerisinde aktif kaspaz-3 artışı en çok 50 mg/kg dozunda gerçekleşmiştir. Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonlarına ait aktif kaspaz-3 sonuçları incelendiğinde ise, iki ilacın sinerjik etki göstererek aktif kaspaz-3 düzeyini yükselttiği görülmüştür. En etkili kombinasyon grubunun, tek başına da etkili olan Mangiferin 50 mg/kg'ın Paklitaksel ile birlikte verilen grup olduğu belirlenmiştir.

Kaspazların ana substratı olan poli-ADP-riboz polimeraz 1'in (PARP-1) bölünmesi, apoptozun değerli bir işaretidir (Decker ve Muller, 2002). PARP-1'in, poli (ADP riboz) polimeraz ile DNA hasarının tespiti ve onarımı, ayrıca NF-kB gibi birçok transkripsiyon faktörüyle eşleşerek transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok işleve sahip olduğu bilinmektedir (Castri ve ark., 2014). Bazı hücrelerde ilaç uygulamasına bağlı gerçekleşen apoptoz esnasında PARP'ın, sırasıyla aktif bölgeyi ve enzimin DNA-bağlanma alanını içeren 89- ve 24-kDa fragmanlarından kırıldığı gösterilmiştir. Bu tür bir bölünme, esasen, PARP'ın DNA tamir yeteneğini tahrip ederek, enzimi etkisiz hale getirmektedir (Boulares ve ark., 1999). Bu tez çalışmasında immünohistokimyasal yöntem kullanılarak

Mangiferin'in tüm dozlarının kırılmış PARP % indeks düzeyleri incelendiğinde, kontrole göre arttığı görülmüştür. Mangiferin'in tek başına uygulanan konsantrasyonları arasında, en yüksek kırılmış PARP düzeyi Mangiferin 50 mg/kg uygulanan grupta belirlenmiştir. Tek başına Mangiferin uygulamalarından elde edilen kırılmış PARP düzeyi, tek başına Paklitaksel uygulanan gruptan daha yüksek bulunmuştur. Mangiferin 50 mg/kg konsantrasyonu ile Paklitaksel kombinasyonunda kontrole göre belirgin bir artış görülmektedir.

Zou ve ark. (2017)'nın OVCAR3 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, Mangiferin'in 0-100 µg/ml konsantrasyonlarda 24 saat sonunda apoptozis üzerine etkisi incelenmiş ve doza bağlı olarak kırılmış PARP miktarının arttığı bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada, OVCAR3 hücreleri üzerinde Mangiferin'in IC50 dozu 23,13 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında ise, Mangiferin'in EAC hücreleri üzerindeki IC50 dozu >300 µM olarak bulunmuş ve Zou ve ark. (2017)'dan farklı olarak IC50 dozundan düşük Mangiferin uygulaması yapılmıştır. Zou ve ark. (2017), IC50 dozunun üzerindeki dozlar arttıkça, kırılmış PARP düzeyinin arttığını bildirmişlerdir.

TUNEL yöntemi, apoptozis varlığını göstermek için kullanılan farklı bir tekniktir. Bu teknikte 180-200 bp ve katları şeklinde kırılan DNA'ların uç kısımları işaretlemektedir. Ayrıca daha geç dönemdeki apoptotik hücrelerin gösterilmesi bu teknikle mümkün olmaktadır (Gavrieli ve ark., 1992; Ulukaya ve ark., 2011). Bu tez çalışmasından elde edilen EAC tümör dokularına ait TUNEL sonuçları incelendiğinde, tüm gruplarda kontrole göre apoptotik hücre indeksinde belirgin bir yükselme göze çarpmıştır. Mangiferin'in tek başına uygulanan dozlarındaki apoptotik hücre indeksi birbirine ve Paklitaksel grubuna benzerdir. Mangiferin 50 mg/kg+Paklitaksel grubunda, apoptotik indeks en yüksek düzeyde bulunmuştur ve iki etken madde apoptozis üzerinde sinerjik etki göstermiştir. Elde edilen sonuçlar aktif kaspaz-3 ve kırılmış PARP sonuçlarına paraleldir ve tümör volümündeki azalmayı da desteklemektedir.

Çeşitli tümör hücrelerinde yapılan *in vivo* deneysel çalışmalarda, Mangiferin'in sadece 100 mg/kg dozunun tümör volümü ve apoptozis üzerine etkisini incelenmiştir. Bu tez çalışmasında ise Mangiferin'in üç farklı dozu ile çalışılmış ve i*n vivo*da EAC tümör hücrelerinde Mangiferin'in yüksek dozu olan 100 mg/kg'ın apoptotik etkisinin, Mangiferin'in 50 ve 25 mg/kg dozlarına kıyasla daha düşük olduğu gösterilmiştir (Rajendran ve ark., 2008a; Rajendran ve ark., 2008b; Li ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında

ilk defa, Mangiferin'in EAC tümöründe *in vitro* ve *in vivo*da apoptozis üzerine etkisi olduğu, Paklitaksel ile kombinasyonunun sinerjistik etki ile apoptozisi arttırdığı ve bu sonuçların *in vitro*da sitotoksisite sonuçları ve *in vivo*da tümör büyüklüğü ile paralel olduğu gösterilmiştir. Mangiferin'in doza bağlı olarak farklı apoptotik etki gösterdiği ve 50 mg/kg dozunun *in vivo*da tümör büyüklüğü ve apoptozis üzerine daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Paklitaksel ile yapılan kombinasyonlarda, yine 25 ve 50 mg/kg doz Mangiferin uygulaması yapılan grupların antitümöral özelliğinin belirgin derecede yüksek olduğu gösterilmiştir.

Otofaji, son zamanlarda II. tip programlanmış hücre ölüm yolu olarak dikkat çekmektedir. Otofaji her ne kadar hücrenin stres koşulları altında aktive olarak, hayatta kalmasını sağlayan bir mekanizma olarak çalışsa da, paradoksal olarak aşırı stres altında hücreyi, kaspaz bağımsız yolak üzerinden, apoptotik olmayan hücre ölümüyle yani otofajik hücre ölüm modeli ile öldürebilmektedir (Amaravadi, 2008). Tümör oluşumunun, otofajinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu ve otofaji ile ilişkili genlerin tümör oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir (Roca ve ark., 2008). Otofajinin varlığı ile seviyesi ve süresi, bir hücrenin hayatta kalmasında veya apoptozis ile ölümünde etkili olabilmektedir. Düşük otofaji seviyeleri, hasarlı hücre içi proteinleri ve organelleri elimine ederek, hayatta kalmayı destekleyebilir. Bu işlem, apoptozu önleyerek hücre sağkalımını artırabilir. Bunun aksine, çeşitli terapi tipleri yardımı ile meydana gelen aşırı otofajinin, temel proteinlerin ve organellerin belirli bir eşiğin ötesinde imha edilmesine neden olarak, hücre ölümüne yol açabileceğini söyleyen çalışmalar da vardır (Zou ve ark., 2011).

Mangiferin'in meme tümörü üzerine otofajik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya şimdiye kadar rastlanmamıştır. Kalp, böbrek, karaciğer ve kemikte doku hasarı oluşturarak gerçekleştirilen Mangiferin'in rejeneratif etkilerinin araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışmada, Mangiferin'in LC3B'yi arttırarak ve P62 düzeyini azaltarak, hasarlı dokularda otofajiyi arttırdığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2017; Bai ve ark., 2018; Hou ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018). Bu nedenle, tez çalışmamızdaki otofaji bulguları, Mangiferin gibi polifenol olan bileşiklerin etkileri ile karşılaştırılarak tartışılacaktır.

Beclin 1, otofajinin başlangıç basamağında yer alan ve otofagozom oluşumunda görevli önemli bir proteindir. Beclin-1 seviyelerindeki artış, otofagozom yapısının düzenli olarak ilerlediğini ve otofajinin varlığını göstermektedir (Wang ve ark., 2014). Beclin 1'in farklı kanser türlerinde ya da aynı kanser türünün farklı aşamalarındaki ekspresyonlarında

gözlenen farklılıklara rağmen, insan kanser patolojisinde önemli rolü vardır. Yüksek Beclin-1 miktarı, bazı kanser tiplerinde kötü prognozu gösterirken, bazı kanser tiplerinde hastaların sağkalım süresini uzatmaktadır (Yue ve ark., 2003; Gu ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda Beclin-1'in, %40 prostat, %50 meme, %75 over kanserlerinde monoallelik delesyona sahip olduğu bildirilmiştir (Futreal ve ark., 1992; Saito ve ark., 1993; Liang ve ark., 1999). Liang ve ark. (1999), Beclin-1 ekspresyonunun meme kanserinde düşük olduğunu bu nedenle tümör baskılayıcı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Beclin-1'in az görüldüğü MCF-7 meme kanser hücrelerine BECN-1 gen transfekte edildiğinde, kanser hücresi çoğalması indirgenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, BECN-1 gen ürünü Beclin-1 tümör baskılayıcı olarak kabul edilmektedir (Hippert ve ark., 2006; Akar ve ark., 2008). Mangiferin ve Paklitaksel uygulaması yapılan EAC hücrelerinde p-Beclin ekspresyonunu western blot yöntemiyle incelendiğimizde, Mangiferin ve Paklitaksel'in tekli ve birlikte uygulamasında p-Beclin ekspresyonunun kontrole göre yükseldiği belirlenmiştir.

Atg5, otofagozom oluşumunun erken evresinde rol oynayan proteindir. Otofajide ubikutin benzeri konjugasyon sisteminde görev alır. (Choi ve ark., 2014). Kim M.S. ve ark. (2011), prostat kanser hücreleriyle yaptıkları çalışmada, Atg5 protein ekspresyonunun normale göre yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu veriler doğrultusunda artmış otofajinin, öncül kanser hücrelerinin bir özelliği olabileceği ileri sürülmüştür. MDA-MA-231 kullanılarak yapılan *in vivo* ve *in vitro* bir çalışmada, Atg5 ekspresyonundaki artışın, tümör hücrelerini antikanser ilaç tedavisine duyarlı hale getirdiği, Atg5'in baskılanmasının ise kemoterapi direncine yol açtığı tespit edilmiştir (Yousefi ve ark., 2006). Yine siRNA yardımı ile Atg5 geninin susturulduğu bir çalışmada, Atg5 yokluğunun, PC9 ve A549 hücre soylarında canlılığı arttırdığı belirlenmiştir (Nihira ve ark., 2014). İki yüz meme kanserli kadından elde edilen tümör dokularıyla yapılan immünohistokimyasal bir çalışmada, yüksek Atg5 ekspresyonuna sahip hastaların, hastalık prognozunun daha iyi olduğu tespit edilmiş, Yousefi ve ark. (2016) benzer şekilde, kanser hücrelerinin ölümünü hızlandıran otofaji ve apoptozis arasındaki etkileşimde Atg5'in önemli bir rolü olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2015; Yousefi ve ark., 2006). Çalışmamızda, in vivo EAC meme tümörü dokularında yapılan H-skor analizi sonucunda, MNG 25 mg/kg, MNG 50 mg/kg ve MNG 25 mg/kg+PTX 12,5 mg/kg, MNG 50 mg/kg+PTX 12,5 mg/kg kombinasyon gruplarının Atg5 düzeylerinde, kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir. MNG 50 mg/kg+PTX 12,5 mg/kg kombinasyon grubunun Atg5 seviyesindeki belirgin artış, iki ilacın sinerjik etkisini kanıtlamaktadır. Atg5 protein seviyeleri üzerine Mangiferin

25 ve 50 mg/kg dozunun etkisi benzerdir ve kontrole göre anlamlıdır, ancak Mangiferin 100 mg/kg dozunun, Atg5 protein seviyesi üzerine bir etkisi yoktur. Tek başına Paklitaksel uygulamasının da Atg5 üzerine bir etkisi görülmemiştir. Xi ve ark. (2011)'nın, Paklitaksel'in A549 kanser hücreleri üzerine otofajik ve apoptotik etkilerini inceledikleri çalışmada, Paklitaksel'in tekli kullanımının Atg5, Beclin 1 ve LC3 düzeylerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. Ancak, MDA-MB-231 ve SKBr3 meme tümörü hattında Paklitaksel'in etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Zou ve ark., 2011), tek başına Paklitaksel uygulamasının bizim sonuçlarımıza benzer şekilde otofajiyi uyarmadığı görülmüştür. Paklitaksel, farklı hücre hatlarında otofaji üzerine değişik etkiler gösterebilmektedir. Dolayısıyla, tek başına Paklitaksel uygulanan grubun Atg5 ekspresyonu düzeyinde, kontrolle karşılaştırıldığında değişiklik olmaması, bu sonucun hücre farkından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Atg5'e ait western blot bulguları incelendiğinde, Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyon grubunda belirgin artış görülmüştür.

LC3 belirteci, otofaji aktivitesini değerlendirmek için kullanılan parametrelerden biridir (Cha ve ark., 2014). LC3, memeli hücrelerinde birçok fonksiyonel homoloğa sahip olup, LC3A/B/C, GABARAPL1/GEC1, GABARAPL2/GATE-16, GABARAPL3 içermektedir. Bu proteinlerin, otofagozumun kapanması için gerekli olduğu belirtilmiştir (Weidberg ve ark., 2010). MDA-MB-231 meme tümörü hücrelerinde, farklı Paklitaksel konsantrasyonlarının otofaji üzerindeki indükleyici etkisinin gösterildiği çalışmada, Paklitaksel'in 12, 24 ve 30 μM dozlarının 24 saat uygulanması sonucunda, LC3-II ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Lee ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında, EAC meme tümöründe LC3A düzeyi üzerine 25 mg/kg ve 100 mg/kg Mangiferin'in bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Bu iki doz, Paklitaksel ile kombine edildiğinde ise, etki kontrole göre yüksek görünse de, Paklitaksel'in tek başına uygulandığı gruptan daha düşük olarak belirlenmiştir. LC3B değerleri incelendiğinde, *in vivo* EAC meme tümörü dokusunda tüm gruplarda artış olduğu belirlenmiştir. Bu artış Mangiferin'de doza bağlı olarak 50 mg/kg grubunda görülmüştür. Kombinasyon gruplarında 25 mg/kg dozunun LC3B üzerine bir etkisi olmadığı, en etkili kombinasyon grubunun 50 mg/kg Mangiferin ve 12,5 mg/kg Paklitaksel uygulanan grup olduğu belirlenmiştir. Fare meme tümörü olan EAC tümör dokusunda Mangiferin uygulamasının doza bağlı olarak etki gösterdiği, LC3A ve LC3B üzerinde ise en etkili Mangiferin dozunun 50 mg/kg olduğu

bulunmuştur. Bu tez çalışmasında EAC meme tümörü dokularında incelenen LC3A ve LC3B seviyelerinin, MNG 50 mg/kg+PTX 12,5 mg/kg grubunda sinerjik etki göstererek, en yüksek değere ulaştığı görülmüştür. Western blot bulguları incelendiğinde, kombinasyon grubunun LC3A ve LC3B ekspresyonlarında artış olduğu ve bu sonucun, *in vivo* EAC meme tümörü bulgularını desteklediği görülmüştür.

p62 / SQSTM1, poliubikutin bağlayıcı proteinlerden ve seçici otofajik substratlardan birisidir. Zarar görmüş veya uzun ömürlü proteinlerin parçalanması için bir kargo reseptörü olarak görev yapmaktadır (Johansen ve Lamark, 2011). p62 ekspresyonunun yükselmesi, kanser invazyonu ve hücre proliferasyonunu uyaran birçok hücre içi sinyal yolağı ile ilişkilendirilmektedir (Duran ve ark., 2008; Moscat ve Dias-Meco, 2009; Komatsu ve ark., 2010; Nihira ve ark., 2014) Meme ve prostat kanseri hastalarında yapılan araştırmalarda, p62 ekspresyonundaki yüksekliğin, tümör için agresif davranış belirtisi olduğu da raporlanmıştır (Kitamura ve ark., 2006; Rolland ve ark., 2007). Yu ve ark. (2017)'nın yaptıkları çalışmada, Paklitaksel'in BGC823 hücrelerinde LC3B protein seviyelerini arttırdığı, p62'yi ise azalttığı belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, EAC meme tümöründen elde edilen dokulardaki p62 düzeylerinde, kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Özellikle Mangiferin ve Paklitaksel'in kombine edildiği gruplarda sinerjik etki göstererek, p62 düzeylerinde dikkat çeken bir azalma tespit edildi ve en etkili azalmanın MNG 50 mg/kg+PTX 12,5 mg/kg kombinasyon grubunda olduğu görüldü. PC9 ve A549 hücre soylarında siRNA kullanılarak p62 geninin susturulduğu bir çalışmada, p62 yokluğunda bozuk çok katmanlı otofagozom yapılar meydana gelerek, hücrelerde canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Nihira ve ark. (2014)'nın yaptığı bu çalışmada, p62 ekspresyonunun otofajik hücre ölümünde önemli bir marker olduğu ve kanser sağaltımında prognozu belirleyici olduğu ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, p62 inhibisyonunun multilayer membran oluşturma üzerine etkisi incelenmiş ve ayrıca siRNA yardımı ile Atg5 de susturulduğunda, hücrenin canlılığını arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, otofajik hücre ölümünün p62 inhibisyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla, bazı kanser çalışmalarında yeni tedavi metodu olarak p62 inhibisyonu hedeflenmektedir (Dikic ve ark., 2010; Nihira ve ark., 2014). Meme tümörü dokusunda da p62 ekspresyonunun, normal meme dokusuna göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Thompson ve ark.,2003).

Paklitaksel'in, BGC823 hücre soyu üzerindeki otofajik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, Paklitaksel'in p62 ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Yu ve ark., 2017).

Tümör volümü sonuçlarına göre, en fazla küçülme gösteren MNG 50 mg/kg+PTX 12,5 mg/kg kombinasyon grubunun p62 ekspresyonunun da en düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Bu grupta ayrıca, Atg5 ekspresyonunda da, diğer gruplara nazaran belirgin bir artış gözlenmektedir. Artan Atg5 ve LC3B ile azalan p62, otofajideki artışı gösterirken, azalan tümör volümü Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunun "otofajik hücre ölüm modelini" kullanmış olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunun EAC hücrelerindeki etkileri western blot yöntemiyle incelendiğinde, p62'nin azaldığı, Beclin 1, LC3A ve LC3B'nin ise arttığı görülmüştür. Bu üç protein seviyesindeki birikim göz önüne alındığında, otofagozom oluşumunun arttığı görülmektedir. Ancak, kombinasyon grubunda p62'de görülen azalma, ATP canlılık testinde elde ettiğimiz azalmayı açıklar niteliktedir. Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunun, EAC hücrelerinde otofajiyi arttırarak hücrelerdeki canlılığı azalttığı düşünülmektedir. Mangiferin ve Paklitaksel'in kombinasyon olarak uygulanması otofajiyi arttırmaktadır. Ancak, tümör hacmindeki ve hücre canlılığındaki azalmanın "otofajik hücre ölümü" kaynaklı olup olmadığının anlaşılması için ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Mangiferin gibi bir polifenol olan curcuminin A549 tümör hattı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 48. saatte Beclin 1 ekspresyonunun LC3II/LC3I oranını arttırarak ve p62'yi azaltarak otofajiyi arttırdığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada curcuminin apoptotik etkileri de tespit edilmiş ve hücrelerdeki canlılığın azalmasında apoptozis ve otofajik ölüm yöntemlerinin beraber çalıştığı bildirilmiştir (Liu ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında da, Liu ve ark. (2018)'nın sonuçlarına benzer sonuçlar western blot çalışması ile elde edilmiş, Mangiferin 300 µM ve Paklitaksel 3,98 µM kombinasyonunda artan LC3B ve Beclin-1 protein ekspresyonu ve azalan p62 protein ekspresyonu artan otofajik etkiyi, artmış PARP kırılması ise apoptozun varlığını göstermektedir.

Tümör baskılayıcı gen olan PTEN, birçok efektör kaspazın substratı olarak bilinmekte ve kanser terapilerinde PTEN ekspresyon seviyesindeki azalmanın, kemodirenç ile ilişkili olduğu söylenmektedir (Singh ve ark., 2013). Ayrıca PTEN'in, AKT fosforilasyonunu baskıladığı da bilinmektedir (Peacock ve ark., 2009). Bu tez çalışmasında, Paklitaksel 3,98 µM ile Mangiferin 300 µM dozu kombinasyonunun western

blot sonuçları incelendiğinde, p-AKT ekspresyonunda azalma, PTEN ekspresyonunda ise hafif bir artış olduğu görülmüştür. Mangiferin ve Paklitaksel *in vitro* ortamda 48 saatte sinerjik etki göstererek, PTEN artışı ile hücrelerdeki sağkalım yolağını baskılamıştır. Ayrıca PTEN artışının, FAS/FASL aracılı apoptozisi arttırdığı bilinmektedir (Peacock ve ark., 2009). Benzer şekilde 48. saatteki western blot bulgularımız incelendiğinde, FAS'ın önemli düzeyde arttığı görülmektedir. Mide kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada, Mangiferin'in PI3K/AKT'yi baskılayarak, hücrelerdeki canlılığı azalttığı bildirilmiştir (Du ve ark., 2017). Zou ve ark. (2017), OVCAR3 hücrelerinde Mangiferin'in yükselen konsantrasyonlarındaki etkilerini incelemiş ve Mangiferin'in doza bağlı olarak artan bir şekilde p-AKT'yi baskıladığını göstermişlerdir. Çalışmamızda, Paklitaksel ile Mangiferin kombinasyonunun *in vitro* ortamda hücre sağkalım sinyallerini baskılayarak, hücreleri ölüme sürüklediği görülmektedir. Bu tez çalışmasına ait *in vivo* p-AKT sonuçları incelendiğinde, tek başına Mangiferin ve Paklitaksel uygulamalarında belirgin bir azalma göze çarpmaktadır. Mangiferin 25-50 ve 100 mg/kg gruplarının p-AKT sonuçları da benzerdir. Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonlarında p-AKT seviyesi daha da azalmıştır ve p-AKT'de en etkili azalmanın, Paklitaksel'in Mangiferin 50 mg/kg ile yaptığı kombinasyon grubunda olduğu görülmüştür. PTEN seviyeleri incelendiğinde ise, tüm gruplarda kontrole göre artış belirlenmiştir. PTEN seviyelerindeki artış, p-AKT düzeylerindeki azalmayı destekler niteliktedir. Sonuçlar Zou ve ark. (2017)'nın çalışmasına paralel olarak, Mangiferin'in EAC tümör hücrelerinde p-AKT'yi baskıladığını göstermektedir.

Mangiferin'in insan U87MG hücreleri üzerine etkilerinin izlendiği başka bir çalışmada ise, Mangiferin'in 0-300 µM aralığında artan etki ile PI3K ve MAPK yolaklarını baskıladığı bildirilmiştir (Jung ve ark., 2012). Western blot bulgularımızda Mangiferin 300 µM dozunun EAC hücrelerinde p-AKT'yi baskılamadığı görülmüştür. Bu durumun, hücre soylarının farklı olmasından ve EAC hücreleri için bulunan Mangiferin IC50 dozundan daha düşük bir doz kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Jung ve ark. (2012)'nın çalışmasında, Mangiferin'in doza bağlı olarak ERK ve JNK yolaklarını baskıladığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, JNK yolağının aşağısında bulunan p-c-Jun ekspresyon düzeyine bakıldığında, Paklitaksel ve Mangiferin'de p-c-Jun ekspresyonunun kontrole göre artarken, kombine edildiği grupta azaldığı belirlenmiştir (Vleugel ve ark., 2006). EAC tümöründe kombinasyon grubunda p-AKT'nin azalması PTEN'in artması ve p-c-Jun düzeyinin belirgin düzeyde azalması, Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunun

sağkalımı etkili bir şekilde baskılayarak, hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir.

Anjiyogenez, tümörün agresif özelliklerinin ortaya çıkmasında önemli bir role sahiptir. Bu sebeple son zamanlarda anjiyogenezi ve sinyal yolaklarını baskılamaya yönelik tedavi yöntemlerinin kullanımı artmıştır (Folkman, 2007). Bu çalışmalar sırasında, etken maddelerin anjiyogenik etkilerinin değerlendirilmesinde çeşitli *in vitro* ve *in vivo* modeller karşımıza çıkmaktadır. Şu ana kadar, Mangiferin'in ayrıntılı olarak *in vitro* tüp formasyon testi ve *in vivo* CAM ile anjiyogenik etkilerinin ortaya konduğu bir literatüre rastlanmamıştır. Bu bölümde elde ettiğimiz bulgular, ağırlıklı olarak Mangiferin gibi polifenol olan farklı bileşiklerin anjiyogenike etkileri ile karşılaştırılarak tartışılmıştır. *In vitro* spesifik anjiyogenez testi olan tüp formasyon testi, endoteliyal hücrelerin tüp oluşturma yeteneklerinin ölçülmesine dayanan bir yöntemdir (Auerbach ve ark., 2003). İnce, şeffaf ve damar yapısı nedeniyle CAM ise, anjiyogenez çalışmalarında in vivo model olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu model, teknik olarak iyi gelişmiş damarsal ağa sahip karmaşık biyolojik sistemde kolay çalışmaya olanak sağlamaktadır (Valdes ve ark., 2002; Kue ve ark., 2015). Klinik çalışmalar sırasında birçok kemoterapötiğin yan etki olarak damar oluşumunu bozduğu ve antianjiyogenik etki gösterdiği fark edilmiştir. Bu ilaçlardan biri olan Paklitaksel'in de antianjiyogenik etkisiyle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Bocci ve ark., 2013). Dordunoo ve ark. (1995), Paklitaksel içeren bileşiklerin, CAM çalışmasında anjiyogenezi inhibe ettiğini yayınlamıştır. Ayrıca Belotti ve ark. (1996), Paklitaksel'in endotel hücreleri ve anjiyogenez üzerine etkisini inceledikleri *in vivo* çalışmada, Paklitaksel'in konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin proliferasyonunu, motilitesini ve invazivliğini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin antianjiyogenik özellikleriyle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Flavonoidler, triterpenoidler, kateşoller, tannenler ve aromatik maddelerin antianjiyogenik etkilerine dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Curcumin, resveratrol, genistein, kersetin, sanguarin gibi polifenolik yapıdaki flavonoidlerin antianjiyogenik mekanizmaları, çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla bildirilmiştir (Kadioglu ve ark., 2013).

Mangiferin'in antianjiyogenik etkisinin ayrıntılı olarak araştırıldığı bir çalışmaya özellikle *in vivo*da rastlanmamıştır. *In vitro*da MDA-MB231 hücre hattı kullanılarak yapılan bir çalışmada 100 µg/ml Mangiferin'in VEGF-A'yı etkileyerek anjiyogenezi

baskıladığı gözlenmiştir (Garcia-Rivera ve ark., 2011; Gold-Smith ve ark., 2016). Ayrıca, insan astroglioma hücreleri üzerine yapılan başka bir çalışmada Mangiferin'in, tümör oluşumunda anjiyogenezi regüle eden matriks metalloproteinaz-9'u inhibe ettiği bildirilmiştir (Jung ve ark., 2012).

Mangiferin'in analoğu olan Isomangiferin'in, çeşitli insan meme kanseri hücre hatlarında antianjiyogenik etkisinin incelendiği bir çalışmada, Isomangiferin'in tümör anjiyogenezinin gelişiminde önemli rol oynayan VEGFR-2'i inhibe ederek, anjiyogenezi baskıladığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada Isomangiferin'in anjiyogenez üzerine etkisi HUVEC tüp formasyon testi ile de incelenmiş ve 10. saatte Isomangiferin'in 3 µM konsantrasyonda tüp oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında ise, Mangiferin'in 50 µM konsantrasyonu 8. saatten itibaren tüp fomasyonunu bozmaya başlamıştır. Wang ve ark., (2018)'nın sonuçlarından farklı olarak daha yüksek dozda etki görmemizin, farklı molekül yapılarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında HUVEC sitotoksisite sonuçları, Mangiferin'in 12,5-25-50 µM dozları ve Paklitaksel'in 1,99-15,93 µM dozları tüp formasyon testinde değerlendirilmek üzere ilk defa çalışılmıştır. *In vitro* tüp oluşum testi sonunda, Mangiferin'in bu üç dozunun, doz artışına ve saate bağlı olarak HUVEC hücrelerinin tüp oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. 12. saatte Mangiferin'in tüm dozlarının tüp oluşumunu, pozitif kontrol talidomide benzer etki ile azalttığı görülmüştür. Mangiferin 12,5 ve 25 µM dozları 16. saatte talidomide benzer etki göstermektedir. Mangiferin'in 50 µM dozunun 8. saatten itibaren tüp oluşumunu bozmaya başladığı ve 16. saatte ise tüp oluşumunu engellemede, pozitif kontrol 200 µM talidomide göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Daha önce yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla, antianjiyogenik etkisi bilinen Paklitaksel'in, bu tez çalışmasında yükselen konsantrasyonlarda HUVEC hücrelerinin tüp oluşturma yeteneğini, 1,99 µM dozu hariç 3,98-15,93 µM dozlarda 0. saatten başlayarak etkili bir şekilde engellediği tespit edilmiştir (Bocci ve ark., 2013). Paklitaksel'in 0,5-15,93 µM aralığındaki dozları ile Mangiferin 12,5 µM kombine edildiğinde, 0. saatten sonra 16. saate kadar tüp oluşumu gözlenmemiş ve bu etkinin pozitif kontrol talidomide göre çok daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Özellikle de Mangiferin'in 12,5 µM dozu ve Paklitaksel'in etkili olmayan düşük dozları (0,5 µM, 1 µM ve 1,99 µM) ile yapılan kombinasyon gruplarında, yüksek doz Paklitaksel dozlarına benzer şekilde tüp oluşumunun gerçekleşmediği ve

hücrelerin oldukça azaldığı gözlenmiştir. Düşük dozların kombinasyonlarında, sinerjik antianjiyogenik etki gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, tüp oluşumunu bozmak için Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunda yüksek dozların kullanılmasına gerek olmadığı tespit edilmiştir. Doğal bir polifenol olan Mangiferin'in Paklitaksel ile olan kombinasyonunun tüp formasyon testiyle antianjiyogenik etkiye sahip olduğu ilk defa bu çalışmayla gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasına benzer şekilde, farklı bir polifenol olan curcumin ile Paklitaksel'in kombine edildiği bir çalışmada HBTSC, LN18 ve U138MG hücrelerinde apoptozis, anjiyogenez ve hücre sağkalımı üzerine etkileri incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada, curcumin ve Paklitaksel'in sinerjik hareket ederek VEGF, b-FGF, MMP-2, MMP-9 ve CD31'i baskıladığı, antianjiyogenik etki gösterdiği bildirilmiştir (Hossasin ve ark., 2012).

Kue ve ark. (2015), Paklitaksel'in toksisite profilini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, CAM testinde 0,3 mg/kg konsantrasyonda Paklitaksel'in 48. saatteki etkilerini incelemişler ve embriyoların %50 sinin yaşadığını tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında, Kue ve ark. (2015)'nın sonuçları referans alınarak, Paklitaksel dozları 0,3-0,0375 mg/kg aralığında belirlenmiştir.

Paklitakselin 4-8-ve 12nM uygulandığı başka bir CAM çalışmasında ise doza bağlı artan antianjiyogenik etki gözlendiği bildirilmiştir (Wang ve ark. 2003). Wang ve ark. (2003)'nın çalışmalarına paralel olarak, çalışmamızda Paklitaksel'e ait CAM sonuçları incelendiğinde, Paklitaksel'in artan şekilde, doza bağlı olarak, 0,3-0,075 mg/kg konsantrasyon aralığında çok kuvvetli; 0,0375 dozunda ise kuvvetli antianjiyogenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Mangiferin 5 mg/kg konsantrasyonda kuvvetli antianjiyogenik etki gösterirken, daha düşük doz olan 2,5-1,25 mg/kg konsantrasyonlarında CAM üzerinde zayıf antianjiyogenik etki göstermiştir. Düşük doz Paklitaksel (0,0375 mg/ml) ile tüm Mangiferin (5-2,5-1,25 mg/kg) konsantrasyonları kombine edildiğinde ise, kombinasyonların tamamında antianjiyogenik etkinin, tek başına uygulamalardan daha güçlü olduğu ve Mangiferin'in, düşük doz Paklitaksel'in antianjiyogenik etkisini arttırarak, çok kuvvetli antianjiyogenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlarla, Mangiferin'in 5 mg/kg konsantrasyonda antianjiyogenik etki gösterdiği ve Paklitaksel ile kombine edilen etkisi olmayan düşük dozlarının, additif etki ile çok kuvvetli etki gösterdiği CAM

modelinde ilk defa ortaya konulmuştur. Elde edilen veriler *in vitro* HUVEC tüp formasyon testi sonuçları ile de paralellik göstermektedir.

Wang ve ark. (2018), *in vivo* zenograft meme kanser modelinde, bir Mangiferin analoğu olan Isomangiferin'in anjiyogenez üzerine etkisini de incelemişlerdir. Bu amaçla, 10 mg/kg Isomangiferin'in VEGFR-2'yi baskılayarak anjiyogenezi inhibe ettiği ve tümör volümünü küçülttüğünü bildirmiştir. Çalışmamızda Mangiferin, Paklitaksel ve kombinasyonlarının *in vitro* tüp formasyon ve *in vivo* CAM modelinde kuvvetli antianjiyogenik etkiye sahip olduğunu gösterdik. Bu kuvvetli antianjiyogenik etkinin Wang ve ark. (2018),'nın sonuçlarına benzer şekilde *in vivo* EAC tümörü büyüklüklerinin azalmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Mangiferin'in tek başına 6,25-300 µM konsantrasyon arasında EAC tümör hücrelerinde ve sağlıklı HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Ancak, EAC hücrelerinde 200-300 µM, HUVEC hücrelerinde 12,5 µM dozunda Mangiferin'in, Paklitaksel 3,98 µM-15,9 µM ile kombine edildiğinde 48. saat ATP testi sonuçlarında sitotoksik etkiyi, doza ve hücre çeşidine bağlı olarak sinerjistik biçimde arttığı görülmüştür.

Apoptozis, otofaji ve sağkalım üzerine EAC tümör hücrelerinde Mangiferin 300 µM, Paklitaksel 3,98 µM ve bu iki dozun kombinasyonları western blot yöntemi ile değerlendirildiğinde, kombinasyon gruplarında FAS'ın arttığı, PARP'ın kırıldığı ve BAX'ın belirgin biçimde azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar bize *in vitro*da Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunda EAC hücrelerinde dış yolak üzerinden ölüm reseptörleri ile başlayarak apoptozisin gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca, kombinasyonda Beclin-1 ile LC3B'nin yükselmesi ve p62'nin azalmasının EAC hücrelerinde otofajinin varlığını göstermiştir. p-AKT azalırken PTEN'in artışı, p-c-Jun'un azalması sağkalım yolağı üzerinde de kombinasyonun etkili olduğunu göstermektedir. ATP sitotoksisite sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, Mangiferin ve Paklitaksel kombinasyonunun sağkalım yolağını baskıladığı ve otofaji varlığında hücrelerde apoptozis meydana getirdiği görülmektedir.

Balb/c farelerde oluşturulan *in vivo* EAC tümör modelinden elde edilen dokularda immünohistokimyasal olarak proliferasyon, apoptozis, otofaji ve sağkalım belirteçleri incelendiğinde, Mangiferin, tek başına ve Paklitaksel ile kombinasyon yapılan gruplarda doza bağlı PCNA'yı azaltarak, proliferasyonu baskılamıştır. Bu sonuç, tümör büyüklükleri

ve ağırlıkları ile de paralel bulunmuştur. Apoptozis ile ilgili parametreler incelendiğinde, BAX'ın Mangiferin varlığı ile azaldığı, aktif kaspaz-3, kırılmış PARP ve TUNEL tekniği ile de apoptotik hücrelerin doza bağlı olarak tek başına Mangiferin ve Paklitaksel ile kombine edildiği gruplarda arttığı görülmüştür. *İn vivo*da otofajik parametreler değerlendirildiğinde, Atg5'in ve LC3B'nin artması, yine *in vitro*ya benzer şekilde p62'nin azalması ile otofaji varlığının devam ettiğini göstermiştir.

Sağkalım belirteçleri için değerlendirilen AKT düzeyleri kontrole göre tüm gruplarda azalmış, PTEN ise artmıştır. Bu sonuçlar, *in vivo*da tümör büyüklüğü, tümör ağırlığı, apoptozis, otofaji ve sağkalım üzerinde en etkili dozun tek başına 50 mg/kg Mangiferin uygulanan grup ve bunun kombinasyon grubu olduğu görülmüştür. Ayrıca 100 mg/kg Mangiferin dozunun Paklitaksel ile genel olarak sinerjistik etki göstermediği belirlenmiştir.

Mangiferin ve kombinasyonlarının anjiyogenez üzerine etkisinin incelendiği *in vitro* tüp formasyon testinde, tek başına 50 μM dozunun etkili olduğu, Mangiferin'in Paklitaksel ile kombinasyonlarında ise, daha düşük dozlarda etkili olduğu belirlenmiştir. CAM sonuçlarında ise yine benzer şekilde Paklitaksel ile kombinasyon yapılan gruplarının, tek başına Mangiferin uygulanan gruplardan daha etkili antianjiyogenik etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, tüm bu bulguların doğrultusunda *in vitro* ve *in vivo*da Mangiferin'in doza bağlı olarak, Paklitaksel kombinasyonu ile EAC hücrelerinde seçici bir biçimde, otofaji varlığında apoptozisi arttırdığı, proliferasyonu ve sağkalım parametrelerini azalttığı, güçlü bir antianjiyogenik etkiye de sahip olmasıyla tümör büyüklüğünü baskıladığı ilk defa bu tez çalışması ile gösterilmiştir. Mangiferin'in düşük dozları Paklitaksel ile kombine edildiğinde, tek başına olduğundan daha güçlü sinerjik etki göstermiştir. Mangiferin'in kanser tedavisinde önemli olan bir çok mekanizma üzerinde etkili olması nedeniyle, farklı kemoterapötikler ile kombinasyonlarının çeşitli kanser türlerinde *in vitro* ve *in vivo* tekniklerle araştırılmasına ihtiyaç olduğu görülmektedr. Mangiferin'in özellikle kanser tedavisinde gelecekteki yeni stratejilerin geliştirilmesi için umut vaad edici potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aaltomaa, S., Lipponen, P., Syrjanen, K. (1993). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling as a prognostic factor in axillary lymph node negative breast cancer. *Anticancer Research, **13***, 533–538.

Anonim, (2011) Pierce Cypridina Luciferase Glow Assay Kit. http://www.piercenet.com

Ashkenazi A. 2008. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews,* **19(3)**, 325-331.

Adams, J.M., Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, ***26***, 61-66.

Ahlmann, M., Hempel, G. (2016). The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, ***78***, 661–671.

Akar, U., Chaves-Reyez, A., Barria, M., Tari, A., Sanguino, A., Kondo, Y., Kondo, S., Arun, B., Lopez-Berestein, G., Ozpolat, B. (2008). Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy*, ***4***, 669-679.

Aktaş, S.H., Akbulut, H. (2014). Kolorektal kanserde anjiyogenez ve anti-anjiyogenik tedaviler. *Türk Onkoloji Dergisi*, ***29***, 67-79

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell. Fourth edition, New York, 1314.

Amaravadi, R.K. (2008). Autophagy-induced tumor dormancy in ovarian cancer. *Journal of Clinical Investigation*, ***118***, 3837-3840.

American Cancer Society. Erişim 30.11.2018 https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html

Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G. (1995). Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Research*, ***55***, 5276-5282.

Arbuck, S.G., Blaylock, B.A. (1995). Taxol: Clinical results and current issues, In Suffness M (ed.), Taxol: Science and Applications, CRC Press, Boca Raton, Florida, 379-415.

Armutak, E.İ., Sonmez, K., Akgün-Dar, K., Sennazli, G., Kapucu, A., Yiğit, F., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. (2015). Anticancer effect of a novel palladium–saccharinate complex of terpyridine by inducing apoptosis on ehrlich ascites carcinoma (EAC) in balb-c mice. *Anticancer Research*, ***35***, 1491-1497.

Armutak, E.İ., Ulukaya, E., Gürel Gürevin, E., Yaylim, I., İşbilen Başok, B., Şennazli, G., Yüzbaşioğlu Öztürk, G., Sonmez, K., Celik, F., Kucukhuseyin, O., Korkmaz, G., Yilmaz, V.T., Zeybek, S.U. (2016). Apoptosis-inducing Effect of a Palladium(II) Complex-[PdCl(terpy)](sac).2H2O] on Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) in Mice, *In Vivo*, ***30***, 457-464.

Arslan, D.Ö., Korkmaz, G., Gözüaçık, D. (2011). Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **2**, 184-194.

Ashkenazi, A. (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine &Growth Factor Reviews*, ***19***, 325-331.

Auerbach, R., Lewis, R., Shinners, B., Kubai, L., Akhtar, N. (2003). Angiogenesis assays: a critical overview. *Clinical Chemistry*, ***49***, 32-40.

Bai, Y., Liu, C., Fu, L., Gong, X., Dou, C., Cao, Z., Quan, H., Li, J., Kang, F., Dai, J., Zhao, C., Dong, S. (2018). Mangiferin enhances endochondral ossification-based bone repair in massive bone defect by inducing autophagy through activating AMP-activated protein kinase signaling pathway. *FASEB Journal*, ***32***, 4573-4584.

Baykara O., (2016) Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balikesir Saglik Bil Derg*, ***5,*** 3.

Battegay, E.J. (1995). Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *Journal of Molecular Medicine*, ***73***, 333-346.

Belotti, D., Vergani, V., Drudis, T., Borsotti, P., Pitelli, M.R., Viale, G., Giavazzi, R., Taraboletti, G. (1996). The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clinical Cancer Research*, ***2***, 1843–1849.

Bocci, G., Di Paolo, A., Danesi, R. (2013). The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. *Angiogenesis*, ***16***, 481–492.

Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S., Smulson, M. (1999). Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *Journal of Biological Chemistry*, ***274***, 22932-22940.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, ***68***, 394-424.

Brower, V. (1999). Tumor angiogenesis new drugs on the block. *Nature Biotechnology*, ***17***, 963-968.

Brozovic, A., Osmak, M. (2007). Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Letters*, ***251***, 1-16

Buja, L.M., Eigenbrodt, M.L., Eigenbrodt, E.H. (1993). Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med*, ***117(12)***, 1208-14.

Bürgermeister, J., Paper, D.H., Vogl, H., Linhardt, R.J., Franz, G. (2002). LaPSvS1, a (1-->3)-beta-galactan sulfate and its effect on angiogenesis in vivo and in vitro. *Carbohydrate Research*, ***337***, 1459-1466.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, ***282***, 1318–1321.)

Castri, P., Lee, Y.J., Ponzio, T., Maric, D., Spatz, M., Bembry, J., Hallenbeck, J. (2014). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and its cleavage products differentially modulate cellular protection through NF-kappaB-dependent signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, ***1843***, 640-651.

Cha, Y.J., Kim, Y.H., Cho, N.H., Koo, J.S. (2014). Expression of autophagy related proteins in invasive lobular carcinoma: comparison to invasive ductal carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, ***7***, 3389-3398.

Chahinian, P., Mandeli, J.P., Gluck, H., Naim, H., Teirstein, A.S., Holland, J.F. (1998). Effectiveness of cisplatin, paclitaxel, and suramin against human malignant mesothelioma xenografts in athymic nude mice. *Journal of Surgical Oncology*, ***67***, 104-111.

Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A., McCubrey, J.A. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, ***17***, 590-603.

Chavoshi, H., Vahedian, V., Saghaei, S., Pirouzpanah, M.B., Raeisi, M., Samadi, N. (2017). Adjuvant therapy with silibinin ımproves the efficacy of paclitaxel and cisplatin

in mcf-7 breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, ***18***, 2243-2247.

Chen, N.C., Chyau, C.C., Lee, Y.J., Tseng, H.C., Chou, F.P. (2016). Promotion of mitotic catastrophe via activation of PTEN by paclitaxel with supplement of mulberry water extract in bladder cancer cells. *Science Reports*, ***6***, 20417.

Chen, Y., Tseng, S.H. (2007). Review. Pro- and anti-angiogenesis effects of resveratrol. *In Vivo*, ***21***, 365-370.

Cheng, P., Peng, Z.G., Yang, J., Song, S.J. (2007). The effect of mangiferin on telomerase activity and apoptosis in leukemic K562 cells. *Zhong Yao Cai (Journal of Chinese Medicinal Materials)*, ***30***, 306-309.

Çevik Ö, Aydın U, Gürsoy RN. (2012) Kanser Tedavisinde Lenfatik Hedeflendirme. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **32**: 67-9.

Chiang, H., Terlecky, S., Plant, C., Dice, J. (1989). A role for a 70 kDa heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular protein. *Science*, ***246***, 382-385.

Choi, J.H., Cho, Y.S., Ko, Y.H., Hong, S.U., Park, J.H., Lee, M.A. (2014). Absence of autophagy-related proteins expression is associated withpoor prognosis in patients with colorectal adenocarcinoma. *Gastroenterology Research and Practice*, ***2014***, 179586.

Cohen JJ. Apoptosis. (1993), *Immunol Today*. **Mar;14(3):**126-30.

Cooper, G.M. (2000). The Cell: A Molecular Approach, 2nd edition.

Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2016). Hücre Moleküler Yaklaşım. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 714.

Cuccioloni, M., Bonfili, L., Mozzicafreddo, M., Cecarini, V., Scuri, S., Cocchioni, M., Nabissi, M., Santoni, G., Eleuteri, A.M., Angeletti, M. (2016). Mangiferin blocks proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells via suppression of the mevalonate pathway and by proteasome inhibition. *Food & Function*, ***7***, 4299-4309.

Dameron, K.M., Volpert, O.V., Tainsky, M.A., Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thorombospongin-1. *Science*, ***265***, 1582-1584.

Danial, N. N., ve Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, ***116***, 205-219.

D'Arcy, P.F., Howard, E.M. (1967). A new anti-inflammatory test, utilizing the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *British Journal of Pharmacolology and Chemotheraphy*, ***29***, 378-387.

Dash, P. (2007). Apoptosis. http:/www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/ (Erişim tarihi:12 Mayıs 2013.)

Decker, P., Muller, S. (2002). Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, ***3***, 275-283.

Deretic, V. ve Levine, B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*, ***5***, 527-549.

Dikic, I., Johansen, T., Kirkin, V. (2010). Selective autophagy in cancer development and therapy. *Cancer Research*, ***70***, 3431-3449.

Dinçel, G.Ç., Kul, O. (2016). *Patolojik apoptozis ve tani yöntemleri*. *Gümüşhane University Journal of Health Sciences*, ***5***, 86-108.

Dong, X.L., Xu, P.F., Miao, C., Fu, Z.Y., Li, Q.P., Tang, P.Y., Wang, T. (2012). Hypoxia decreased chemosensitivity of breast cancer cell line MCF-7 to paclitaxel through cyclin B1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, ***66***, 70–75.

Dordunoo, S.K., Jackson, J.K., Arsenault, L.A., Oktaba, A.M., Hunter, W.L., Burt, H.M. (1995). Taxol encapsulation in poly(epsilon-caprolactone) microspheres. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, ***36***, 279-282.

du Plessis-Stoman, D., du Preez, J., van de Venter, M. (2011). Combination Treatment with Oxaliplatin and Mangiferin Causes Increased Apoptosis and Downregulation of NFκB in Cancer Cell Lines. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, ***8***, 177–184.

Du, M., Wen, G., Jin, J., Chen, Y., Cao, J., Xu, A. (2017). Mangiferin prevents the growth of gastric carcinoma by blocking the PI3K-Akt signalling pathway. *Anticancer Drugs*. Dec 5. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000583.

Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., Wikenheiser, K, Flores, J.M., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J. (2008). The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell*, ***13***, 343-354.

Ekinci, G. (2000). Katı Ehrlich Ascites Tümörünün Büyüme Kinetiği, İstanbul, Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

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

El-Seedi, H.R., El-Barbary, M.A., El-Ghorab, D.M.H., Bohlin, L., Borg-Karlson, A.K., Goransson, U., Verpoorte, R. (2010). Recent ınsights into the biosynthesis and biological activities of natural xanthones. *Current Medicinal Chemistry*, ***17***, 854-901.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, ***391***, 43-50.

Fabbri, F., Carloni, S., Brigliadori, G., Zoli, W., Lapalombella, R., Marini, M. (2006). Sequential events of apoptosis involving docetaxel, a microtubule-interfering agent: a cytometric study. *BMC Cell Biology*, ***7***, 6.

Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, ***37***, 719–727.

Farber, E. (1995). Cell Proliferation as a major risk factor for cancer: A concept of doubtful validity, *Cancer Research*, ***55***, 3759-3762,

Feitelson, M.A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R.J., Blain, S.W., Holcombe, R.F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M.L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N.K., Singh, N., Vlachostergios. P.J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas. A.G., Bilsland, A., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S.S., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M.R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S.I., Azmi, A.S., Bhakta, D., Halicka, D., Keith, W.N., Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets *Seminars in Cancer Biology*, ***35***, S25–S54.

Feng, Y., He, D., Yao, Z., Klionsky, D.J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, ***24***, 24-41.

Ferrara, N., Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, ***438***, 967-974.

Folkman, J. (2007). Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews Drug Discovery*, ***6***, 273e286.

Frederiks, C., Lam, S., Guchelaar, H., Boven, E. (2015). Genetic polymorphisms and paclitaxel-or docetaxel-induced toxicities: a systematic review. *Cancer Treatment Reviews*, ***41***, 935-50.

Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A., Cheresh, D.A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct αV integrins. *Science*, ***270***, 1500-1502.

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

Futreal, P.A., Söderkvist, P., Marks, J.R., Iglehart, J.D., Cochran, C., Barrett, J.C., Wiseman, R.W. (1992). Detection of frequent allelic loss on proximal chromosome 17q in sporadic breast carcinoma using microsatellite length polymorphisms. *Cancer Research*, ***52***, 2624-2627.

García-Rivera, D., Delgado, R., Bougarne, N., Haegeman, G., Berghe, W.V. (2011). Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of Mangifera indica L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells. *Cancer Letters*, ***305***, 21-31.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, ***119***, 493-501.

Gold-Smith, F., Fernandez, A., Bishop, K. (2016). Mangiferin and Cancer: Mechanisms of Action. *Nutrients*. **8,** 1-25.

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

Gu, Y., Chen, T., Li, G., Xu, C., Xu, Z., Zhang, J., He, K., Zheng, L., Guan, Z., Su, X., Cao, J., Teng, L. (2017). Lower Beclin 1 downregulates HER2 expression to enhance tamoxifen sensitivity and predicts a favorable outcome for ER positive breast cancer. *Oncotarget*, ***8***, 52156–52177.

Gump, J.M., Thorburn, A. (2011). Autophagy and apoptosis: what is the connection?. *Trends in Cell Biology*, ***21***, 7.

Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, ***282***, 37298–37302.

Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S.I., Natsume, T., Guan, J.L., Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, ***181***, 497–510.

Hippert, M.M., O'Toole, P.S., Thorburn, A. (2006). Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Research*, ***66***, 9349-9351.

Horvitz, H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans. *Cancer Research*, ***59***, 1701–1706.

Hossain, M., Banik, N.L., Ray, S.K. (2012). Synergistic anti-cancer mechanisms of curcumin and paclitaxel for growth inhibition of human brain tumor stem cells and LN18 and U138MG cells. *Neurochemistry International*, ***61***, 1102–1113.

Hostetmann, K., Hostetmann, M. (1989). Xanthones. In Methods in Plant Biochemistry, Vol. 1. Plant Phenolics. (Dey, P. M. and Harborme, J. B., eds.). pp. 493–508. Academic Press, New York.

Hou, J., Zheng, D., Xiao, W., Li, D., Ma, J., Hu, Y. (2018). Mangiferin Enhanced Autophagy via Inhibiting mTORC1 Pathway to Prevent High Glucose-Induced Cardiomyocyte Injury. Frontiers in Pharmacology, ***9***, 1-9.

Hönscheid, P., Datta, K., Muders, M.H. (2014). Autophagy: detection, regulation and its role in cancer and therapy response. *International Journal of Radiation Biology*, ***90***, 628-635.

Wikipedia, Erişim: 20.01.2019, https://en.wikipedia.org/wiki/Paclitaxel)

Sigma Aldrich, Erişim: 20.01.2019, https://www.sigmaaldrich.com

https://www.drozdogan.com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec/

Huang, L., Zhanga, S., Zhoua, J., Li, X. (2019). Effect of resveratrol on drug resistance in colon cancer chemotherapy. *RSC Advances*, ***9***, 2572-2580.

Igney, F.H., Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, ***2***, 277-288.

Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., Eskelinen, E.L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal Cell Science*, ***15***, 117(Pt 20):4837-4848.

Jaiswal, S., Ramesh, K., Kapusetti, G., Ray, A.K., Ray, B., Misra, N. (2015). Mangiferin as chain transfer agent: effect on the molecular weight of poly (methyl methacrylate) and polystyrene. *Polymer Bulletin*, ***72***, 1407-1416.

Jiang, Q., Yang, M., Qu, Z., Zhou, J., Zhang, Q. (2017). Resveratrol enhances anticancer effects of paclitaxel in HepG2 human liver cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, ***17***, 477.

Johansen, T., Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, ***7***, 279–296.

Jordan, M.A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W.B., Copp, H., Wilson, L. (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research*, ***56***, 816-825.

Juhász, G., Hill, J.H., Yan, Y., Sass, M., Baehrecke, E.H., Backer, J.M., Neufeld, T.P. (2008). The Class III Pi(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not tor signaling in drosophila. *The Journal of Cell Biology*, ***181***, 655–666.

Jung, J.S., Jung, K., Kim, D.H., Kim, H.S. (2012). Selective inhibition of MMP-9 gene expression by mangiferin in PMA-stimulated human astroglioma cells: involvement of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Pharmacological Research*, ***66***, 95-103.

Juríková, M., Danihel, Ľ., Polák, Š., & Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochemica*, ***118***, 544–552.

Kadioglu, O., Seo, E.J., Efferth, T. (2013). Targeting angiogenesis by phytochemicals. *Medicinal and Aromatic Plants*, ***2***, 134.

Kaleoğlu, Ö., İşli, N. (1977). Ehrlich-Lettre Asit Tümörü, *Tıp Fakültesi Mecmuası*, ***40***, 978-984.

Kammalla, A.K., Ramasamy, M.K., Inampudi, J., Dubey, G.P., Agrawal, A., Kaliappan, I. (2015). Comparative Pharmacokinetic Study of Mangiferin After Oral Administration of Pure Mangiferin and US Patented Polyherbal Formulation to Rats, *The American Association of Pharmaceutical Scientists*, ***16***, 250-258.

Karadağ, A. (2016). Otofaji: Programlı Hücre Ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, ***15***. 19-26.

Kerr, J.F., Winterford, C.M., Harmon, B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, ***73***, 2013-2026.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, ***26***, 239-257.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, ***13***, 132–141.

Kim, M.S., Song, S.Y., Lee, J.Y., Yoo, N.J., Lee, S.H. (2011). Expressional and mutational analyses of ATG5 gene in prostate cancers. *APMIS (Acta Patologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica)*, 119, 802-807.

Kitamura, H., Torigoe, T., Asanuma, H., Hisasue, S.I., Suzuki, K., Tsukamoto, T., Satoh, M., Sato, N. (2006). Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology*, ***48***, 157-161.

Klein, G. (1951). Comparative studies of mouse tumors with respect to their capacity for growth as ‘’Ascites Tumors’’ and their average nucleic acid content per cell. *Experimental Cell Research*, ***2***, 518-573

Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., Yamamoto, M. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature Cell Biology*, ***12***, 213-223.

Köse, Ö., Erkekoğlu, P., Özyurt, B., Koçer Gümüşel, B. (2017). Endoplazmik retikülum stresi ve obezite ilişkisine genel bir bakış. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, ***6***, 77-93.

Krenn, L., Paper, D.H. (2009). Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (Trifolium pratense L.). *Phytomedicine*, ***16***, 1083-1088.

Kroemer, G., Marino, G., Levine, B. (2010). Autophagy and integrated stress response. *Molecular Cell*, ***40***, 280-293.

Kue, C.S., Tan, K.Y., Lam, M.L., Lee, H.B. (2015). Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. *Experimental Animals*, ***64***, 129–138.

Kutluk, T., Kars, A. (1994). Kanser Konusunda Genel Bilgiler. Baskı. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları.

Lazebnik, Y.A., Medvedeva, D.N., Zenin, V.V. (1991). Reversible G2 block in the cell cycle of ehrlich ascites carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, ***195***, 247-254.

Lee, Y., Na, J., Lee, M.S., Cha, E.Y., Sul, J.Y., Park, J.B., Lee, J.S. (2018). Combination of pristimerin and paclitaxel additively induces autophagy in human breast cancer cells via ERK1/2 regulation. *Molecular Medicine Reports*, ***18***, 4281–4288.

Leng, T., Miller, J.M., Bilbao, V., Palanker, D.V., Huie, P., Blumenkranz, M.S. (2004). The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Retina*, ***24***, 427-434.

Levine, B. and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, ***132***, 27-42.

Li, H., Huang, J., Yang, B., Xiang, T., Yin, X., Peng, W., Cheng, W., Wan, J., Luo, F., Li, H., Ren, G. (2013). Mangiferin exerts antitumor activity in breast cancer cells by

regulating matrix metalloproteinases, epithelial to mesenchymal transition, and β-catenin signaling pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, ***272***, 180–190.

Li, H., Huang, J., Yang, B., Xiang, T., Yin, X., Peng, W., Cheng, W., Wan, J., Luo, F., Li, H., Ren, G. (2013). Mangiferin exerts antitumor activity in breast cancer cells by regulating matrix metalloproteinases, epithelial to mesenchymal transition, and β-catenin signaling pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, ***272***, 180-190.

Li, M., Ma, H., Yang, L., Li, P. (2016). Mangiferin inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells is correlated with downregulation of B-cell lymphoma-2 and upregulation of microRNA-182. *Oncology Letters*, ***11***, 817-822.

Li, Z., Sheng, M. (2012). Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain*, ***5***, 15.

Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, ***402***, 672-676.

Liu, F., Gao, S., Yang, Y., Zhao, X., Fan, Y., Ma, W., Yang, D., Yang, A., Yu, Y. (2018). Antitumor activity of curcumin by modulation of apoptosis and autophagy in human lung cancer A549 cells through inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncology Reports*, ***39***, 1523-1531.

Loewenthal, H., Jahn, G. (1932). Übertragung-suersuche mit carcinomatöser mause-asciteslussigleit und hr verhalten gegen physikalische und chemische einwirkungen. *Zeitschrift für Krebsforschung*, ***37***, 439.

Lokman, N.A., Elder, A.S., Ricciardelli, C., Oehler, M.K. (2012). Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, ***13***, 9959–9970.

Longley, D.B., Harkin, D.P., & Johnston, P.G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, ***3***, 330–338.

Lopez, J., Hesling, C., Prudent, J., Popgeorgiev, N., Gadet, R., Mikaelian, I., Rimokh, R., Gillet, G., Gonzalo, P. (2012). Src tyrosine kinase inhibits apoptosis through the Erk1/2-dependent degradation of the death accelerator Bik. *Cell Death and Differentiation*, ***19***, 1459–1469.

Louisa, M., Soediro, T.M., Suyatna, F.D. (2014). In vitro modulation of P-glycoprotein, MRP-1 and BCRP expression by mangiferin in doxorubicin-treated MCF-7 cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, ***15***, 1639-1642.

Maehara, Y., Anai, H., Tamada, R., Sugimachi, K. (1987). The ATP assay is more sensitive than the succinate-dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *European Journal of Cancer Clinical Oncology*, ***23***, 273–276.

Manfredi, J. J., & Horwitz, S. B. (1984). Taxol: an antimitotic agent with new mechanism of action. *Pharmacology and Therapeutics*, ***25***, 83-125.

Manso, C., Sugiura, K., Wroblewski, F. (1958). Glutathione reductase and lactic dehydrogenase activities of tissues of rodents with transplanted tumors. *Cancer Research*, ***18***, 682-687.

Marzella, L., Ahlberg, J., Glaumann, H. (1981). Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*, ***36***, 219–234.

Massey, A.C., Kaushik, S., Sovak, G., Kiffin, R., Cuervo, A.M. (2006). Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, ***103***, 5905-5910.

Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., Codogno, P. (2010). Overwiew of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research*, ***20***, 748-762.

Melendez, A. and Levine, B. (2009). Autophagy in C. elegans. *WormBook*, p. 1-26.

Melkonian, G., Munoz, N., Chung, J., Tong, C., Marr, R., Talbot, P. (2002). Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by cytochalasin D and suramin. *Journal of Experimental Zoology*, ***292***, 241-254.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, ***451***, 1069-1075.

Mizushima, N., Yoshimori, T.,Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, ***27***, 107-132.

Molinari, F., Frattini, M. (2013). Functions and regulation of the PTEN gene in colorectal cancer, *Frontiers in Oncology*, ***3***, 326.

Moscat, J, Diaz-Meco, M.T. (2009). p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*, ***137***, 1001-1004.

Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M. (2004). Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of Biomolecular Screening*, ***9***, 506–515.

Nabekura, T. (2010). Overcoming multidrug resistance in human cancer cells by natural compounds. *Toxins*, ***2***, 1207-1224.

Nathan, C, Ding, A. (2011). Nonresolving inflammation. *Cell*, ***140***, 871-882.

National Cancer Institute. (2018). Paclitaxel. https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/paclitaxel).

Němcová-Fürstová, V., Kopperová, D., Balušíková, K., Ehrlichová, M., Brynychová, V., Václavíková, R., Daniel, P., Souček, P., Kovář, J. (2016). Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, ***310***, 215-228.

Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, ***70***, 461-477.

Nihira, K., Miki, Y., Ono, K., Suzuki, T., Sasano, H. (2014). An inhibition of p62/SQSTM1 caused autophagic cell death of several human carcinoma cells. *Cancer Science*, ***105***, 568-575.

Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*, ***2***, 213-219.

Norbury, C.J., Hickson, I.D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, ***41***, 367–401.

Nurgali, K., Jagoe, R.T., Abalo, R. (2018). Editorial: adverse effects of cancer chemotherapy: anything new to ımprove tolerance and reduce sequelae. *Frontiers in Pharmacology*, ***9***, 245.

Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, ***2***, 211-216.

Ozaslan, M., Karagöz, I. D., Kılıç, İ. H., Güldür, M. E. (2011). Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology*, ***10***, 2375-2378.

Paper, D.H. (1998). Natural products as angiogenesis inhibitors. *Planta Medica*, ***64***, 686-695.

Pazarbaşı, A., Kasap, M., Kasap, H. (2011). Kanser Yolakları. Dergipark , Cilt: 20 Sayı: 4. Erişim 10.04.2019, http://dergipark.gov.tr/download/article-file/25366;

Peacock, J.W., Palmer, J., Fink, D., Ip, S., Pietras, E.M., Mui, A.L., Chung, S.W., Gleave, M.E., Cox, M.E., Parsons, R., Peter, M.E., Ong, C.J. (2009). PTEN loss promotes mitochondrially dependent type II Fas-induced apoptosis via PEA-15. *Molecular and Cellular Biology*, ***29***, 1222-1234.

Perego, P., Cossa, G., Zuco, V., Zunino, F. (2010). Modulation of cell sensitivity toantitumor agents by targeting survival pathways. *Biochemical Pharmacology*, ***80***, 1459-1465.

Rajendran, P., Ekambaram, G., Sakthisekaran, D. (2008a). Effect of mangiferin on benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in experimental Swiss albino mice. *Natural Product Research*, ***22***, 672-680.

Rajendran, P., Ekambaram, G., Sakthisekaran, D. (2008b). Protective role of mangiferin against Benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in experimental animals. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, ***31***,1053-1058.

Rajendran, P., Rengarajan, T., Nandakumar, N., Divya, H., Nishigaki, I. (2015b). Mangiferin in cancer chemoprevention and treatment: pharmacokinetics and molecular targets. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, ***35***, 76-84.

Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. *Journal of Biological Chemistry*, ***276***, 33869-33874.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D.C., Menzies, F.M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F.H., Underwood, B.R., Winslow, A.R., Rubinsztein, D.C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, ***90***, 1383-1435.

Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Burri, P.H., Djonov, V. (2001). Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *The Anatomical Record*, ***264***, 317-324.

Riedl, S.J., Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, ***8***, 405-413.

Roca, H., Varsos, Z.S., Mizutani, K., Pienta, K.J. (2008). CCL2, survivin and autophagy: new links with implications in human cancer. *Autophagy*, ***4***, 969-971.

Rolland, P., Madjd, Z., Durrant, L., Ellis, I.O., Layfield, R., Spendlove, I. (2007). The ubiquitin-binding protein p62 is expressed in breast cancers showing features of aggressive disease. *Endocrine-Related Cancer*, ***14***, 73-80.

Romanov, J., Walczak, M., Ibiricu, I., Schuchner, S., Ogris, E., Kraft, C., Martens, S. (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *The EMBO Journal*, ***31***, 4304–4317.

Sadhukhan, P., Saha, S., Dutta, S., Sil, P.C. (2018). Mangiferin Ameliorates Cisplatin Induced Acute Kidney Injury by Upregulating Nrf-2 via the Activation of PI3K and Exhibits Synergistic Anticancer Activity With Cisplatin. *Frontiers in Pharmacology*, ***9***, 638.

Safa, A.R. (2013). Roles of c-FLIP in Apoptosis, Necroptosis, and Autophagy. J *Carcinogenesis and Mutagenesis*. (Suppl) ***6***, 1-19.

Saftig, P., Beertsen, W., Eskelinen, E.L. (2008). LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*, ***4***, 510-512.

Saha, S., Sadhukhan, P., Sil, P.C. (2016). Mangiferin: A xanthonoid with multipotent anti-inflammatory potential. *Biofactors*, ***42***, 459-474.

Saito, H., Inazawa, J., Saito, S., Kasumi, F., Koi, S., Sagae, S., Kudo, R., Saito, J., Noda, K., Nakamura, Y. (1993). Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors. *Cancer Research*, ***53***, 3382-3385.

Samaras, V, Rafailidis, P.I., Mourtzoukou, E.G., Peppas, G., Falagas, M.E. (2010). Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review. *Journal of Infection in Developing Countries*, ***4***, 267-281.

Sanugul, K., Akao, T., Li, Y., Kakiuchi, N., Nakamura, N., Hattori, M. (2005). Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, ***28***, 1672–1678.

Sasco, A. J., Secretan, M. B., & Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer a brief review of recent epidemiological evidence, *Lung Cancer*, ***2***, 3–9.

Schiff, P.B., Fant J., Horwitz S.B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, ***277***, 665-667.

Searle, J, Kerr, J.F.R., Bishop, C.J. (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathology Annual*, ***17***, 229-259.

Senturk, L.M., Seli, E., Gutierrez, L.S., Mor, G., Zeyneloglu, H.B., Arici, A. (1999). Monocyte chemotactic protein-1 expression in human corpus luteum. *Molecular Human Reproduction*, ***5***, 697-702.

Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M.S., Samadi, N. (2014). Roles of the Bcl 2/Bax ratio, caspase-8 and 9 in resistance of breast cancer cells to paclitaxel. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, ***15***, 8617-8622.

Shi, W., Deng, J., Tong, R., Yang, Y., He, X., Lv, J., Wang, H., Deng, S., Qi, P., Zhang, D., Wang, Y. (2016). Molecular mechanisms underlying mangiferin-induced apoptosis and cell cycle arrest in A549 human lung carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports*, ***13***, 3423–3432.

Shintani, T., Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, ***306***, 990.

Shoji, K., Tsubaki, M., Yamazoe, Y., Satou, T., Itoh, T., Kidera, Y., Tanimori, Y., Yanae, M., Matsuda, H., Taga, A., Nakamura, H., Nishida, S. (2011). Mangiferin induces apoptosis by suppressing Bcl-xL and XIAP expressions and nuclear entry of NF-κB in HL-60 cells. *Archives of Pharmacal Research*, ***34***, 469-475.

Shpilka, T., Weidberg, H., Pietrokovski, S., Elazar, Z. (2011). Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biology*, ***12***, 226.

Singh, M., Chaudhry, P., Fabi, F., Asselin, E. (2013). Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: a potential mechanism of chemoresistance, *BMC Cancer*, ***13***, 233.

Spierings, D., McStay, G., Saleh, M., Bender, C., Chipuk, J., Maurer, U., Green, D.R. (2005). Connected to death: The (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science*, ***310***, 66-67.

Stiffness, M., Wall, M.E. (1995). Discovery and development of taxol, in Suffness M (ed.), Taxol: Science and Applications, CRC Press, Boca Raton, Florida, 3-25.

Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer & Science Theraphy*, ***1***, 1–4.

Suh, Y. (2002). Cell signaling in aging and apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development*, ***123***, 881-890.

Sugiura, K. (1962). Tumor Transplantation. *American Cancer Society*, Chapter 3.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, ***397***, 441-446.

Taskin, E.I., Kapucu, A., Akgün-Dar, K., Yagcı, A., Caner, M., Fırat, U.B., Fırat, I., Dogruman, H. (2008). Effects of an oral treatment with concentrated grape juice (ENT) on cell NOS (eNOS and iNOS) expression and proliferation in experimentally induced carcinoma in mice. *Revue de Médecine Vétérinaire*, ***159***, 123-129.

Taşkın, E.İ. (2002). Ehrlich ascites tümörü ile Balb-C farelerde oluşturulmuş solid tümör modelinde curcuminin apoptoz üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Taşkin E.I., Akgün-Dar, K., Kapucu, A., Osanç, E., Doğruman, H., Eraltan, H., Ulukaya, E., (2009). Apoptosis-inducing effects of Morinda citrifolia L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice. *Cell Biochemistry and Function*, ***27***, 542-546.

Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, ***9***, 231-41.

Thompson, H.G., Harris, J.W., Wold, B.J., Lin, F., Brody, J.P. (2003). p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene*, ***22***, 2322–2333.

Ulukaya, E. (2003). Apoptozis ders notları. Erişim 12 Mayıs 2015 http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf-(

Ulukaya, E., Acilan, C., Ari, F., Ikitimur, E.I., Yilmaz, Y.K. (2011). A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry)*, ***36***, 261-269.

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe-Oral, A., Demirci, M. (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*, ***22***, 232–239.

Valdes, T.I., Kreutzer, D., Moussy, F. (2002). The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B.*, ***62***, 273–282.

Villa, L.L. (2013). Viral carcinogenesis: virus implicated in cancer, *BMC Proceddings*, ***7***, DOI: 10.1186/1753-6561-7-S2-K11.

Vinatier, D., Dufour, P., Subtil, D. (1996). Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, ***67***, 85-102.

Vinay, K., Abbas, A., Fauston, N. (2004). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. New York, Saunders, 623-625.).

Vleugel, M.M., Greijer, A.E., Bos, R., van der Wall, E., van Diest, P.J. (2006). c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Human Pathology*, ***37***, 668-674.).

Wang, B., Shen, J., Wang, Z., Liu, J., Ning, Z., Hu, M. (2018). Isomangiferin, a novel potent vascular endothelial growth factor receptor 2 kinase ınhibitor, suppresses breast cancer growth, metastasis and angiogenesis. *Journal of Breast Cancer*, ***21***, 11–20.

Wang, F., Cao, Y., Liu, H.Y., Xu, S.F., Han, R. (2003). Anti-invasion and anti-angiogenesis effect of taxol and camptothecin on melanoma cells. *Journal of Asian Natural Products Research, **5***, 121-129.

Wang, H., Zhu, Y.Y., Wang, L., Teng, T., Zhou, M., Wang, S.G., Tian, Y.Z., Du, L., Yin, X.X., Sun, Y. (2017). Mangiferin ameliorates fatty liver via modulation of autophagy and inflammation in high-fat-diet induced mice. *Biomedicine and Pharmacotheraphy*, ***96***, 328-335.

Wang, L.1, Yao, L., Zheng, Y.Z., Xu, Q., Liu, X.P., Hu, X., Wang, P., Shao, Z.M. (2015). Expression of autophagy-related proteins ATG5 and FIP200 predicts favorable disease-free survival in patients with breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, ***458***, 816–822.

Wang, R., Xiao, X., Wang, PY., Wang, L., Guan, Q., Du, C., Wang, X.J. (2014). Stimulation of autophagic activity in human glioma cells by anti-proliferative ardipusillosidei isolated from Ardisiapusilla. *Life Sciences*, ***110***, 15–22.

Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes and Development, **15***, 2922-2933.

Wang, X., Gao, L., Lin, H., Song, J., Wang, J., Yin, Y., Zhao, J., Xu, X., Li, Z., Li, L. (2018). Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression and protects podocyte function via autophagy in diabetic rat glomeruli. *Euroepan Journal of Pharmacology, **824***, 170-178.

Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. *Journal of American Chemical Society, **93***, 2325-2327.

Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal*, ***29***, 1792-1802.

Wong, R.S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, ***30***, 87.

World Health Organization, http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer).

Xi, G., Hu, X., Wu, B., Jiang, H., Young, C.Y., Pang, Y., Yuan, H. (2011). Autophagy inhibition promotes paclitaxel-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Letters*, ***307***, 141-148.

Xie, Z., Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptaion. *Nature Cell Biology*, ***9***, 1102-1109.

Yang, Y.P., Liang, Z., Gu, Z., Qin, Z. (2005). Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*, ***26***, 1421-1434.

Yoo, S.Y., Kwon, S.M. (2013). Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators of Inflammation*, ***2013***, Article ID 127170.

Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., Simon, H.U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology*, ***8***, 1124-1132.

Yu, Y.F., Hu, P.C., Wang, Y., Xu, X.L., Rushworth, G.M., Zhang, Z., Wei, L., Zhang, J.W. (2017). Paclitaxel induces autophagy in gastric cancer BGC823 cells. *Ultrastructural Pathology*, ***41***, 284–290.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***100***, 15077-15082.

Zeybek, Ş.Ü. (2003). Deneysel Kanser Modelleri. Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu. 283-310.

Zeybek, Ü. (2013). Kanser araştırmaları ve deneysel modelleri, *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, ***3***, 1-12.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, ***87***, 619–628.

Zhang, J.H., Zhang, Y., Herman, B. (2003). Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Research Reviews*, ***2***, 357-366.

Zou, B., Wang, H., Liu, Y., Qi, P., Lei, T., Sun, M., Wang, Y. (2017). Mangiferin induces apoptosis in human ovarian adenocarcinoma OVCAR3 cells via the regulation of Notch3. *Oncology Reports*, ***38***, 1431–1441.

Zou, C.F., Jia, L., Jin, H., Yao, M., Zhao, N., Huan, J., Lu, Z., Bast, R.C. Jr, Feng, Y., Yu, Y. (2011). Re-expression of ARHI (DIRAS3) induces autophagy in breast cancer cells and enhances the inhibitory effect of paclitaxel. *BMC Cancer*, ***11***, 22.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 12/04/2017-141199

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

Sayı :35980450-050.01.04-
Konu :Doç.Dr. Elif İlkay ARMUTAK'ait
Etik Kurul Onayı

Sayın Doç. Dr. Elif İlkay ARMUTAK

İlgi :24.03.2016 tarihli proje başvurunuz.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Araş. Gör.Ayça ÜVEZ'e ait **"Mangiferin ve Paklitaksel Kombinasyonun Ehrlich Ascites Carcinoma Üzerine Etkisinin İn Vitro ve İn Vivo Yöntemlerle İncelenmesi"** başlıklı projeniz Etik Kurul'umuzun 30.03.2017 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, Etik Kurul Onayı ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Fatma Alev KAYMAZ
Başkan

Doğrulamak İçin:http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BEZPNLT7H

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Canan SÖNMEZTÜRK
İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu oda Avcılar/İSTANBUL
Tel : (212) 473 7070 Fax : 2124400377
e-posta : hadyek@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Doç. Dr. Elif İlkay ARMUTAK
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Başvuru : 24.03.2017

Toplantı Tarihi : 30.03.2017

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen, **Araş. Gör Ayça ÜVEZ**'e ait "Mangiferin ve Paklitaksel Kombinasyonunun Ehrlich Ascites Carcinoma Üzerine Etkisinin İn Vitro ve İn Vivo Yöntemlerle İncelenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Fare
	Cinsiyeti	Dişi
	Sayısı	78
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		01.06.2017/ 01.06.2019

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Ülkü ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. İlhan İLKILIÇ
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye

Yard. Doç. Dr Altan ARMUTAK
Üye

Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇEVİK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Yük. Müh
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MANGİFERİN VE PAKLİTAKSEL KOMBİNASYONUNUN EHRLİCH ASCİTES CARCİNOMA ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO VE İN VİVO YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%13	%7	%5	%9
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Hong Kong Polytechnic University Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
5	adumilas.adu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Jawaharlal Nehru Technological University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayça	**Soyadı**	ÜVEZ
Doğ.Yeri	İstanbul Üsküdar	**Doğ.Tar.**	11.05.1989
Uyruğu	TC	**TC Kim No**	17756322508
Email	ayca.uvez@istanbul.edu.tr	**Tel**	05323458813

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2012
Lise	Kartal Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2016-halen
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(YDS) Puanı**
İngilizce	İyi	İyi	İyi		68,75

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	70,78		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

SCI, SSCI, AHCI Indekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Gürel Gürevin E., Tuba Kiyan H., Esener O.B.B., Aydinlik S., Üvez A., Ulukaya E., et al.,"Chloroquine used in combination with chemotherapy synergistically suppresses

growth and angiogenesis in vitro and in vivo", ANTICANCER RESEARCH, vol.38, pp.4011-4020, 2018.

2. Evecen M., Demir K., Arici R., Yağcioğlu S., Ersoy N., Coşkun N., et al.,"Effects of Ovary Transport and Storage Temperature on In Vitro Maturation and Cumulus Cell Apoptosis Rates in Cat Oocytes", KAFKAS UNIVERSITESI VETERINER FAKULTESI DERGISI, vol.24, pp.301-306, 2018
3. Esener O.B.B., Balkan B., Armutak E.İ., Üvez A., Yildiz G., Hafızoğlu M., et al.,"Donkey milk kefir induces apoptosis and suppresses proliferation of Ehrlich ascites carcinoma by decreasing iNOS in mice.", BIOTECHNIC & HISTOCHEMISTRY, vol.-, pp.1-8, 2018
4. Cevatemre B., Erkısa M., Aztopal N., Karakas D., Alper P., Tsimplouli C., et al.,"A promising natural product, pristimerin, results in cytotoxicity against breast cancer stem cells in vitro and xenografts in vivo through apoptosis and an incomplete autopaghy in breast cancer.", PHARMACOLOGICAL RESEARCH, vol.129, pp.500-514, 2018.
5. Atalla H., Demir K., Yagcioglu S., Arici R., Ersoy N., Eser A., et al.,"The effect of swim up and Percoll gradient separation on ram sperm parameters, DNA integrity and embryo development", REVUE DE MEDECINE VETERINAIRE, vol.170, pp.87-94, 2019.

Uluslararası Kongre Sözlü Sunum

1. Yildiz G, Balkan BM, Gurel-Gurevin E, Hafizoglu M, Esener OBB, Uvez A, Armutak EI. Apoptotic and Proliferative Effects of Donkey’s Milk and Donkey's Milk Kefir on Ehrlich Acid Carcinoma (EAC). 18th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, 26-28 April, 2016, Istanbul, TURKIYE.
2. Cevatemre B. , Erkisa M., Aztopal N., Karatas D. , Alper P., Tsimplouli C., et al.,"The Plant-Derıved Trıterpenoıd Prıstımerın Is A Potent Antıcancer Agent Due To Its Cytotoxıc Actıvıty On Breast Cancer In Vıtro And In Vıvo", 6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, KONYA, TÜRKIYE, 27-30 Ekim 2016, ss.50-51.
3. Kılıç Ş. , Duymaz E. , Üvez A., Gürel Gürevin E., Armutak E.İ., "The Miracle of Traditional Medicine; Thymoquinone", 19. International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 2-4 Mayıs 2017, pp.101-102.

4. Esener O.B.B., Balkan B., Armutak E.İ., Üvez A., Yıldız G., Hafızoğlu M., et al., "Donkey's Milk Kefir Increases Apoptosis and Supresses Proliferation by Modulating ENOS-INOS on Ehrlich Acid Carcinoma (EAC) in Mice", 4. International VET Istanbul Group Congress , Almaty, KAZAKISTAN, 11-13 Mayıs 2017, pp.19-19
5. Yılmaz G., Üvez A., Gürel Gürevin E., Armutak E.İ., "The Black Sea's Laz Cherry; Prunus laurocerasus", 19. International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 2-4 Mayıs 2017, pp.67-68
6. Yalcin E, E Boynukara, E Gurel-Gurevin, A Uvez, EI Armutak, N Yılmazer, G Turgay-Izzetoglu. “From Mulberry Leaves to Silk...” 18 th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress 56-57, İstanbul, Türkiye, 2016.
7. Mucan T. , Üvez A., Diren Siğirci B., Başaran Kahraman B., Armutak E.İ., Çelik B., "Antimicrobial Activity Of Mangifera indica L. Extracted From Mango", 20 th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 3-5 Mayıs 2018, pp.128-129
8. Karakuş D. , Üvez A., Esener O.B.B., Aydınlık Ş. , Armutak E.İ., "Antiangiogenic effect of resveratrol and doxorubicin combination in CAM (Chick Chorioallantoic Membrane) model ", 20th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 3-5 Mayıs 2018, pp.134-135
9. Konak M., Üvez A., Armutak A., "Folkloric Beliefs About Animals in Batman Region", 20th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 3-5 Mayıs 2018, pp.66-67.
10. Kiliç Ş., Üvez A., Esener O.B.B., Ünder D., Saltan F.Z. , Armutak E.İ., ""Investigation of the Synergistic Effect of Sumac (Rhus coriaria L.) seed’s Extracts and Tannic Acid Combination on Angiogenesis by CAM (ChickChorioallantoic Membrane) Assay", 21. INTERNATIONAL VETERINARY MEDICINE STUDENTS SCIENTIFIC RESEARCH CONGRESS APRIL 17-19, 2019 ISTANBUL, İSTANBUL, TÜRKIYE, 17-19 Nisan 2019, pp.1-1.

Uluslararası Kongre Poster Sunum

1. Ayça Uvez, Ebru Gurel-Gurevin, Elif Ilkay Armutak. Look from A Broad Perspective for Medicinal Properties of Mangiferin. 18th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, 26-28 April, 2016, Istanbul, TURKIYE**.**

2. Armutak-Ikitimur EI, Gurel-Gurevin E, Kiyan HT, Esener OBB, Aydinlik S, Uvez A, Dimas K, Ulukaya E. Chloroquine enhances the antiangiogenic effect of doxorubicin on the chorioallantoic membrane (CAM) in vivo. 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR24), 9-12 July 2016, Manchester, UK.

3. Armutak E.İ., Aydınlık Ş. , Üvez A., Arı F., Sönmez K., Esener O.B.B., et al.,"An In Vıtro And In Vıvo Evaluatıon Of The Effects Of Doxorubıcın And Chloroquıne Combınatıon Of Mıce Erlıch Ascıtes Carcınoma Eac)", 6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, KONYA, TÜRKIYE, 27-30 Ekim 2016, ss.210-211

4. Chumachenko I. , Hisar E., Üvez A., Gürel Gürevin E., Armutak E.İ., "Global Environmental Problem; Perfluorinated Compounds", 19. Internatıonal Veterınary Medicine Students Scientific Research Congress, İstanbul, Türkıye, 2 Mayıs - 4 Temmuz 2017, pp.249-250

5. Üvez A., Kiyan H.T., Esener O.B.B., Gürel Gürevin E., Öztürk N., Eroz Poyraz İ., et al., "Evaluation of Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Ecballium elaterium (L.) A. Rich. Fruit Juice", 19. International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 2-4 Mayıs 2017, pp.173-174

6. Menğcur Z.R., Üvez A., Esener O.B.B., Gürel Gürevin E., Armutak E.İ., "Promising Properties of Sanguinaria Canadensis in Veterinary Medicine", 20th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 3-5 Mayıs 2018, pp.388-389.

7. Çakar B., Üvez A., Esener O.B.B., Gürel Gürevin E., Armutak E.İ., "The Unknown About Walnut Tree; Juglone", 20th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 3-5 Mayıs 2018, pp.202-203.

8. Seyhan M., Pelit E.M., Çaylı E., Üvez A., Esener O.B.B., Gürel Gürevin E., et al.,"Recent Strategies Related to Curcumin Bioavailability", 20th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 3-5 Mayıs 2018, pp.306-307

9. Erol-Kutucu D., Üvez A., Armutak E.İ., Yılmazer N. , Gürel Gürevin E., "Miracle Plant: Rosmarinus officinalis (Rosemary)", 20th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 3-5 Mayıs 2018, pp.214-215.

10. Aydın A.İ., Üvez A., Esener O.B.B., Gürel Gürevin E., Armutak E.İ., "Healing From Nature; Mulberry", 20th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 3-5 Mayıs 2018, pp.172-173.

11. Demir H., Üvez A., Esener O.B.B., Armutak E.İ., "Alternative Approach To Cancer Treatment; High-Dose Intravenous Vitamin C", 21st International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 17-19 Nisan 2019, pp.218-219.

12. Çakar B. , Üvez A., Esener O.B.B., Armutak E.İ., "Miracle Secret of Chinese Medicine: Gecko Proteins", 21st International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İSTANBUL, TÜRKIYE, 17-19 Nisan 2019, pp.180-181.

13. Üvez A., Aydinlik S., Kiyan H.T., Gürel Gürevin E., Ulukaya E., Yılmaz V., et al., "The anti-angiogenic effect of the Palladium(ll) Complex-[PdCI(terpy)](sac).2H20] on HUVECs tube formation and in vivo CAM assay", 7. Multidisipliner Kanser Araştırma ve 1. Temel Onkoloji Kongresi, İZMİR, TÜRKIYE, 11-14 Ekim 2018, pp.201-201

Ödüller

1. Cevatemre Buse, M Erkısa, N Aztopal, D Karakaş, P Alper, C Tsimplouli, E Sereti, K Dimas, EI Ikitimur Armutak, E Gurel Gurevin, A Uvez, M Mori, S Berardozzi, C Ingallina, B Botta, E Ulukaya "The Plant-Derıved Triterpenoid Pristimerin Is A Potent Anticancer Agent Due To Its Cytotoxic Activity On Breast Cancer In Vitro And In Vivo", 6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 50-51, Konya, Türkiye, 2016, En iyi sözlü sunum 1. lik ödülü.

2. Ikitimur Armutak EI, S Aydinlik, A Uvez, F Ari, K Sonmez, OBB Esener, F Ustun Alkan, A Aktas, SU Zeybek, E Ulukaya, K Dimas, E Gurel Gurevin, "An In Vitro And In Vivo Evaluation Of The Effects Of Doxorubicin And Chloroquine Combination Of Mice Erhlich Ascites Carcinoma (Eac)", 6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, ss.210-211, Konya, Türkıye, 2016, En iyi poster 4.lük ödülü.

3. Kiliç Ş., Üvez A., Esener O.B.B., Ünder D., Saltan F.Z. , Armutak E.İ., ""Investigation of the Synergistic Effect of Sumac (Rhus coriaria L.) seed's Extracts and Tannic Acid Combination on Angiogenesis by CAM (ChickChorioallantoic Membrane) Assay", 21. INTERNATIONAL VETERINARY MEDICINE STUDENTS SCIENTIFIC RESEARCH CONGRESS APRIL 17-19, 2019 ISTANBUL, İSTANBUL, TÜRKIYE, 17-19 Nisan 2019, pp.1-1. Sözlü sunum 1.'lik ödülü.

Patent

1. Elif İlkay Armutak, Ebru Gürel-Gürevin, H. Tuba Kıyan, O. B. Burak Esener, Ayça Üvez, Engin Ulukaya, Şeyma Aydınlık. "Doksorubisin ve Klorokin Kombinasyonunun In Vivo Antianjiyogenik Etkisi". Patent Başvuru No: TR 2016/01859, Şubat 2016.

Sertifikalar

1. TC. İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Sertifika No: 4/2017