T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLAVONOİDLERİN KANSER HÜCRELERİNE ETKİSİ

Gülsüm TEKİN YALÇIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

KONYA–2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLAVONOİDLERİN KANSER HÜCRELERİNE ETKİSİ

Gülsüm TEKİN YALÇIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 12202011 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA–2013

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Bahadır Öztürk yönetiminde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle yönlendiren sayın hocam, Yrd. Doç. Dr. Bahadır Öztürk'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışmamda katkı ve ilgisini esirgemeyen, S. Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ali Ünlü hocama; hayatım boyunca maddi ve manevi desteğiyle yanımda olan ve tezin istatistik analizinde ve yazımında da yaptığı yardımlarından ötürü babam, S. Ü. Veteriner Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Emin Tekin'e çok teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Emine Nedime Korucu'ya, sonuçların değerlendirilmesinde yardımcı olan Uzman Dr. Sedat Abuşoğlu'na ve çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Abdullah Sivrikaya'ya çok teşekkür ederim.

Son olarak; her zaman olduğu gibi, bu süreçte de zor zamanları çabuk atlatmamda yardımcı olan başta annem olmak üzere kardeşlerim ve eşim Mehmet Yalçın'a da çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGE ve KISALTMALAR	iv
ÇİZELGE ve ŞEKİL DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	3
1.2. Hücre Siklusu	4
1.2.1. Hücre Siklusunun Fazları	5
1.3. Apopitozis	6
1.4. Onkogenler	7
1.5. Tümör Baskılayıcı Genler	8
1.6. Meme Kanseri	8
1.6.1. Meme Kanseri ve Onkogenler-Baskılayıcılar	9
1.6.1.1. Büyüme Faktörü Reseptörleri	9
1.6.1.2. Sinyal İletimi ile İlişkili Genler	10
1.6.1.3. Steroid Reseptörleri	10
1.6.1.4. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler	10
1.6.1.5. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri	11
1.6.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri	11
1.6.3. Klinikte Meme Kanseri	12
1.6.4. Meme Kanseri Tedavisi	13
1.7. Flavonoidler	14
1.7.1. Flavonoidlerin Yapısı	14
1.7.2. Flavonoidlerin Metabolizması ve Biyoyararlanımı	16
1.7.3. Flavonoid Takviyesi	19
1.7.4. Flavonoidlerin Etkileri	20
1.7.5. Hesperetin	22
1.7.6. Kuersetin	25
1.8. Kanser Hücrelerinin Enerji Metabolizması	29

2. GEREÇ veYÖNTEM 33
2.1. Gereçler 33
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar 33
2.1.2. Cihazlar ve Laboratuar gereçleri 34
2.2. Yöntem 35
2.2.1. Hücre Kültürü 35
2.2.2. Toksisite Değerlendirme Metotları ve Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi 36
2.2.3. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi 38
2.2.4. Hesperetinin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi 39
2.2.5. Kuersetinin MCF-7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi 39
2.2.6. Hücrelerin ATP, ADP VE AMP Ölçümüne Hazırlanması 40
2.2.7. Hücrelerin Protein Analizi 40
2.2.8. Hücrelerin Enerji Düzeylerinin Ölçülmesi 41
2.3. İstatistik Analizleri 42
3. BULGULAR 43
3.1. Çalışılacak Hücre Sayısının Optimizasyonu 43
3.2. Hesperetinin MCF–7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi 44
3.3. Kuersetinin MCF–7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi 47
3.4. Hücrelerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi 50
3.5. Hücrelerin Protein Analizi Sonuçları 51
3.6. Hücrelerin ATP, ADP, AMP Ölçümü Sonuçları 52
4. TARTIŞMA 56
5. SONUÇ 61
6. ÖZET 62
7. SUMMARY 63
8. KAYNAKLAR 64
9. EKLER 72
10. ÖZGEÇMİŞ 73

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
ADP	Adenozin difosfat
AEC	Adenilat enerji şarjı
Akt/PKB	Protein kinaz B
AMP	Adenozin monofosfat
ASCL1	Achaete-plak kompleks homolog 1
ASCT2	Amino asit taşıyıcısı
ATP	Adenozin trifosfat
β	Beta
Bax	Proapoptotik gen
BCl-2	Antiapoptotik gen
BGC-823	İnsan mide karsinoma hücre hattı
BRCA1	Meme kanserine yatkınlık geni
BSA	Sığır serum albumini
CAD	Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CerbB–2 (HER2/Neu)	Büyüme faktörü reseptörü
c-fos	Onkogen
c-jun	Onkogen
CgA	Koryonik gonadotropin alfa
CO_2	Karbondioksit
COO-	Karboksil grubu
$CuSO_4.5\ H_2O$	Bakır sülfat penta hidrat
DCIS	İn situ duktal karsinom
2-DG	2-deoksi-D-glukoz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMH	1,2-dimetil hidrazin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü

E-NTPDaz	Ekto-nükleozid trifosfat difosfohidrolaz
ER	Östrojen reseptörü
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
γ	Gama
GRAS	Genellikle güvenli kabul edilen
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GTPaz	Guanozin 3 fosfataz
GTP9	Guanozin 3 fosfat
HCC1937	İnsan meme kanseri hücre hattı
HeLa	Servik kanser hücre hattı
Hep G2	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HL60	Lösemi hücre hattı
HMG-CoA redüktaz	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA redüktaz
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ICAD	Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü
IC_{50}	Hücrelerin yarısını öldüren madde miktarı
IDC	İnvaziv duktal karsinom
IGF-1R	İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1
ILC	İnvaziv lobüler karsinom
KCl	Potasyum klorür
KG	Ketoglutarat
KH_2PO_4	Potasyum fosfat
KOH	Potasyum hidroksit
LCIS	İn situ lobüler karsinom
MAPK	Mitojen aktive eden protein kinaz
MCF-7	İnsan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-453	İnsan meme kanseri hücre hattı
μM	Mikromolar
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MST	Toksisite analiz yöntemi

MTT	Toksisite analiz yöntemi
Myc	Onkogen
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
NB4	Lösemi hücre hattı
nm	Dalga boyu
PBS	Fosfat tuzu tamponu
PI3K	Fosfo inositid-3 kinaz
PR	Progesteron reseptörü
PSG	Penisilin streptomisin glutamin
PTEN	Tümör supressör geni
R	Alkil grubu
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
T24	Mesane kanseri hücre hattı
TCA	Trikarboksilik asit
THP-1	Lösemi hücre hattı
U937	Lösemi hücre hattı
U138MG	İnsan glioblastoma hücre hattı
USDA	Ulusal Besin Veritabanı için Standart Referans
WST	Toksisite analiz yöntemi
XTT	Toksisite analiz yöntemi

ÇİZELGE ve ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Protein ölçümünde uygulanan 1. İşlem 41

Çizelge 2.2. Protein ölçümünde uygulanan 2. İşlem 41

Çizelge 2.3. ATP-ADP-AMP çalışması için HPLC sistemine ait çalışma koşulları ve sistem parametreleri 42

Çizelge 3.1. Hesperetin doz gruplarının zamanlar arası karşılaştırılması 46

Çizelge 3.2. Hesperetinin her zaman diliminde dozlar arası karşılaştırılması 46

Çizelge 3.3. Kuersetin doz gruplarının zamanlar arası karşılaştırılması 49

Çizelge 3.4. Kuersetinin her zaman diliminde dozlar arası karşılaştırılması 49

Şekil 1.1. Hücre siklusu 5

Şekil1.2. Flavonoid iskeleti 14

Şekil 1.3. Flavonoidlerin sınıflandırılması ve diyetteki yeri 16

Şekil 1.4. Hesperetinin molekül yapısı 22

Şekil 1.5. Hesperidinin molekül yapısı 22

Şekil 1.6. Rutinosid hesperidin ve aglikon hesperetinin bağırsak içine alımı (Brand ve ark 2008). 23

Şekil 1.7. Kuersetinin molekül yapısı 25

Şekil 1.8. R=OH: Kuersetin 3-O-glukuronid 25

Şekil 1.9. Kuersetin 3'-O-sülfat 26

Şekil 1.10. Kuersetinin biyosentezi 27

Şekil 3.1. Farklı sayılardaki MCF–7 hücrelerinin 196 saatlik büyüme eğrileri 43

Şekil 3.2. Hesperetinin MCF-7 hücrelerine 168 saat boyunca etkisi 44

Şekil 3.3. Kuersetinin MCF-7 hücrelerine ilk 182 saat boyunca etkisi 47

Şekil 3.4. Hesperetin için IC50 değerinin belirlenmesi 50

Şekil 3.5. Kuersetin için IC50 değerinin belirlenmesi 51

Şekil 3.6. Protein standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi 51

Şekil 3.7. ATP ‘nin kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi 52

Şekil 3.8. ADP ‘nin kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi 53

Şekil 3.9. AMP ‘nin kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi 53

Şekil 3.10. 100 μM ATP, ADP ve AMP mix standardının kromotogramı 54

Şekil 3.11. Kontrol, hesperetin ve kuersetin gruplarının ATP düzeyi 54

Şekil 3.12. Kontrol, hesperetin ve kuersetin gruplarının ADP düzeyi 55

Şekil 3.13. Kontrol, hesperetin ve kuersetin gruplarının AMP düzeyi 55

1. GİRİŞ

Meme kanseri, gelişen ve gelişmekte olan ülkelerde, kadınlarda çok yaygın görülen bir kanser türüdür. Kanserden ölüm sebeplerinin de başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre meme kanserinde 2000 yılında tahmini 999 000 yeni vaka ve 375 000 meme kanserinden ölüme rastlanmıştır. Bunun yanında DSÖ'ye bağlı bir kuruluş olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) 2008 yılındaki araştırmasına göre yaklaşık 1,38 milyon yeni vaka ve 458 000 meme kanserinden ölüm saptanmıştır.

Coğrafi bölgeler arasında meme kanseri verilerinin karşılaştırılmasıyla, düşük ve yüksek riskli alanlarda, insidans ve mortalite oranlarında farklılıklar gösterilmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda meme kanseri etiyolojisinde; yaş, vücut ağırlığı, kilo değişiklikleri, laktasyon zamanı ve sayısı, eksojen ve endojen hormon konsantrasyonu ile metabolizması, benign meme hastalığı öyküsü, radyasyona maruziyet, alkol kullanımı ve ailede meme kanseri öyküsü tanımlanmıştır. Meme kanseri insidansı oranlarındaki çarpıcı coğrafi farklılıklar, popülasyonlar arasındaki genetik farklılıklardan ve yaşam tarzı ya da beslenme gibi çevresel faktörlerden etkilenir (Moorman ve Terry 2004).

Epidemiyolojik çalışmalar, düşük oranda yağ ve yüksek oranda lif içeren tam tahıllı ürünler ile sebze ve meyve tüketiminin meme, akciğer, kolon ve prostat gibi birçok kanser tipine yakalanma riskiyle ters ilişkili olduğunu göstermektedir (IARC 2003, Beliveau ve Gingras 2007, Guha 2009).

İnsan diyetinde yer alan ve bitkilerde çok yaygın bulunan flavonoidler doğal polifenoller olarak bilinmektedir. Doğada 5000'den fazla flavonoid belirlenmiştir. Flavonoidler, genelde flavon, izoflavon, flavanon, flavanol (kateşin), flavonol ve antosiyanidin olmak üzere altı ana grupta toplanmıştır. Flavonoidler; antioksidan, antimutajenik, antiproliferatif, antitümör, antiviral ve antienflamatuar gibi özellikleriyle dikkat çekmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser riskini düşürmesi yönüyle flavonoid bileşiklerinin önemini göstermiştir (Garcia-Lafuente 2009, Wang ve ark 2009). Hücre kültürü çalışmalarında da flavonoidlerin, kinaz aktivitesiyle apoptosiz indüksiyonu ve proliferasyon inhibisyonu gibi çeşitli antikanser etkileri ortaya konmaya çalışılmıştır (Wang ve ark 2009).

Antiproliferatif ve antioksidan olan, apoptozu indüklemesi yönüyle dikkat çeken hesperetin, ülkemizde çok tüketilen narenciye türlerinde bulunan ve flavonoid grubu bileşiklerinden olan bir flavanondur (Choi 2007, Lee ve ark 2011, Sghaiera ve ark 2011). Hücre aktivasyonunda narenciye flavonoidlerinin birçok farmakolojik özellikleri tirozin kinaz gibi enzimleri inhibe etmesiyle ilişkilendirilebilir. Antikanser etkilerini; apoptoz, seçici sitotoksisite ve antiproliferatif eylemler aracılığıyla sergilemektedir (Manthey 2001). Yapılan çalışmalarda kolon (Li ve ark 2011, Nalini ve ark 2012), meme (Choi 2007, Yang ve ark 2011, Nalini ve ark 2012), gastrointestinal karsinoid (Zarebczan ve ark 2011) hücre döngüsünü durdurarak hücreleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Michaud-Levesque ve ark 2012).

Özellikle serbest radikal yakalama özelliğiyle dikkat çeken kuersetin ise flavonoidlerin flavanoller grubundandır (Chen ve ark 2008). Tümör hücrelerine proapoptotik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bunun yanında kuersetinin, hücre farklılaşması, apoptoz, hücre adezyon ve etkileşimi ve hücre döngüsüyle ilişkili birçok gen ve protein ekspresyonunda etkisi görülmektedir (Staedler ve ark 2011). Kuersetinin, karsinogenezde önemli bir rol oynayan metabolik yolaklarda, protein kinaz C, PI3K, MAPK, CDK gibi çeşitli tip kinazlara doğrudan etki ettiği vurgulanmaktadır (Borska ve ark 2010). Bu bileşiklerin; meme (Gulatı ve ark 2006, Choi ve ark 2008, Chouve ark 2010), akciğer (Grenado-Serrano ve ark 2006), mide (Wang ve ark 2012), mesane (Rockenbach ve ark 2011) kanseri hücrelerini doz ve zamana bağlı olarak, hücre döngüsünü durdurarak ve apoptozisi indükleyerek inhibe ettiği, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Shen ve ark 2003, van Erk ve ark 2005).

Bu çalışmanın amacı; literatürde in vitro ve in vivo çalışmalarda, antiproliferatif, antitümör ve antioksidan etkinliği gösterdiği söylenen, fakat henüz moleküler etki mekanizmaları net olmayan flavonoid bileşiklerinin, insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna etkisinin araştırılmasıdır. Çalışmada, hücre kültüründe MCF-7 hücrelerinde, hesperetin ve kuersetinin farklı konsantrasyon ve sürelerde meme kanseri hücrelerinin proliferasyonuna etkisinin, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle hücre canlılığının belirlenmesi ve bu hücrelerin ATP, ADP ve AMP düzeylerinin tespit edilerek enerji metabolizmasının araştırılması amaçlandı.

Hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksisite için pek çok manipülasyonları içeren, end-point ölçüm yapan ve optik tabanlı analiz yöntemleri olduğu için de bileşik girişimine sebep veren birçok metot vardır. Dolayısıyla bunların elimine edilmesi için kolay manipülasyonları içeren, gerçek zamanlı ve sürekli monitörizasyonla hücrelerin kinetik kontrolünün yapılmasını sağlayan, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi geliştirilmiştir. Çalışmada flavonoidlerin etkilerinin görülmesi açısından gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemi kullanıldı.

Meyve ve sebzelerin flavonoid açısından zengin oldukları ve özellikle kansere yakalanma riskine karşı faydalı olabileceği söylenen flavonoidlerin, bu açıdan beslenmeye katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, flavonoidlerin ortaya konulmuş olumlu etkilerini desteklerse, kanser hastalarında diğer tedavilerin yanında destek tedavi olarak önemi vurgulanacaktır. Sonuçların daha sonraki çalışmalara doz ve zaman bağımlılığı açısından yön vermesi ve ışık tutması beklenmektedir.

1.1 Kanser

Kanser, iç ve dış etkilerle hücre veya hücre topluluklarının DNA'larının hasarı sonucu kontrol dışı veya anormal bir şekilde prolife olması, büyümesi, bulundukları yerden başka bölgelere kan veya lenf damarlarıyla taşınarak oralarda da büyümeye devam etmesini içeren bir olgudur. Hücrelerin anormal olarak büyümesi ve çoğalması normal mekanizmada gerçekleşen apopitozis dengeli hücre kaybı olayının gerçekleşememesinden kaynaklanmaktadır. Hücreler kontrol mekanizmasını kaybederek sürekli çoğalırlar ve invazyon yaparak organizma organlarına zarar verirler. Gittikleri yerlerde hücreler büyüdükçe tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanserin gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına (metastaz) neden olur. Metastaz oluşumu tesadüften çok, kanser hücrelerinin bazı organlara kolay yerleşmelerini sağlayan özelliklerine bağlıdır (www.iuonkolojienstitüsü.org).

Tümörler bening (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olabilirler. Benign tümörler vücudun diğer kısımlarına yayılamaz ve primer alanlarında kalmaya devam ederler. Malign tümörler ise genelde doğrudan yayılma, lenfatik ve kan dolaşım sistemleri yoluyla metastaz kabiliyetlerinden dolayı kötü bir prognoza sahiptirler.

Tümör hücreleri normal hücrelerden farklı olarak kendi büyüme hormonlarını sentezler ve kendi proliferasyonlarını uyarırlar. Büyüyebilmek için hücre dışı yüzeyle etkileşime ihtiyaç duymazlar, daha az yapışkan olup, üst üste ya da alt alta büyürler. Ayrıca normal hücrelerde, hücre belirli bir yoğunluğa ulaşınca proliferasyon durur, tümör hücrelerinde ise devam eder (Dalay 2000).

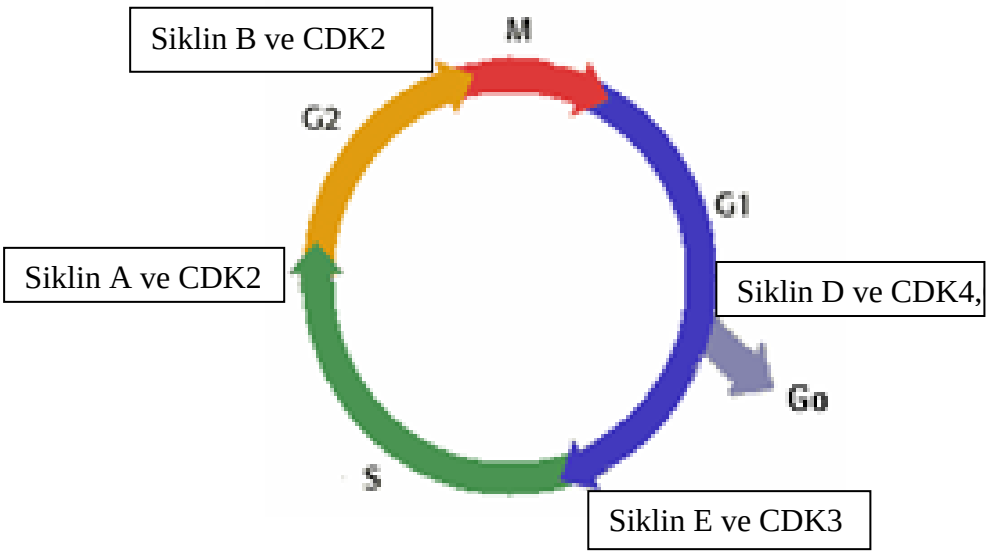
1.2. Hücre Siklusu

Hücre siklusu, hücre büyümesi ve proliferasyonu programıdır; G1, S, M, G2 olmak üzere 4 temel fazdan oluşur (Şekil 1.1). Siklus, bir takım iç ve dış büyüme faktörlerince düzenlenir. Dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan siklusta, hücre içeriğini iki katına çıkararak kendine eş iki hücre çoğaltır. Hücre siklusu süresince bazı onkogen ve hücre siklusuna özgü proteinler eş zamanlı olarak aktifleşip, inaktifleşirler (Lowitz ve Casciato 2012).

Hücre çoğalması ve hücre siklusunun ilerlemesi, büyümenin kontrolünde rolü olan genlerin sayesinde gerçekleşir. Hücre siklusunda, hücre ya Go fazındadır ya da hücre uyarılır ve büyüme meydana gelir. G1-S geçişinde, G2-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde siklin (düzenleyici alt birim) ve siklin bağımlı kinazlar (katalitik alt birim), kontrol noktaları olarak bulunmaktadır. Siklinler, siklin-bağımlı kinazlarla (tirozin kinazlar) birleşirler ve onları aktifleştirip, etkilerini düzenlerler ve hücre siklusunun çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinler olarak görev yaparlar. Siklinler hücre siklusu boyunca sentezlenir ve miktarları eş zamanlı olarak artıp, azalır (Cabadak 2008, Lowitz ve Casciato 2012).

Hücre homeostazisi hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptozis ile sağlanmaktadır. Hücre siklusunu düzenleyen ve kontrol eden çok sayıda etkileşim vardır ve bu etkileşimler oldukça komplekstir. Hücre siklusu kontrol noktalarındaki değişimler ile hücre siklusunun düzenlenmesinde oluşan hatalar sonucu hücre

bölünmesi kontrolü sağlanamaz. Dolayısıyla bu hatalar kanser gelişimine neden olabilir (Cabadak 2008).



Şekil 1.1. Hücre siklusu
(http://www.belgeci.com/mitoz-bolunme.html)

1.2.1. Hücre Siklusunun Fazları

Hücreler, interfaz boyunca sabit bir hızla büyür. Bölünen hücrelerin iki katına çıkma süresi iki mitoz arasında geçen süreyle aynıdır.

G1 fazında (ara faz, interfaz), hücre metabolik olarak aktiftir ve sürekli büyür, spesifik hücre fonksiyonları için gerekli proteinleri ve RNA'yı sentezler. Ayrıca, DNA sentezi için gereken birçok protein ve enzimleri sentezler, fakat DNA'sının sentezini yapamaz.

S fazında (sentez fazı), DNA replikasyonu gerçekleşir, hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır.

G2 fazında DNA sentezinin tamamlanması gerçekleşir ve hücre bu esnada büyümeye devam ederek mitoz için gerekli olan proteinleri ve RNA'yı sentezlemeye devam eder.

M fazında (mitoz fazı) protein ve RNA sentezi yavaşlar, genetik materyal, oluşan iki yeni hücreye dağılır. Bu fazdan sonra oluşan yeni hücreler ya G0 ya da G1 fazına girerler.

G0 fazında (istirahat fazı), hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar (Lowitz ve Casciato 2012).

Meme kanserlerinde siklin-D1 (PRAD1) ve siklin-E'nin %30 oranında aşırı üretimi saptanmıştır ve prognostik faktör olabilecekleri ileri sürülmüştür (Kemomars ve ark 1995, Zukerberg ve ark 1995).

1.3. Apopitozis

Apopitozis, hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (www.istanbul.edu.tr/fen/notları).

Apopitozis, programlanmış hücre ölümüdür. Fizyolojik hücre ölümünü ifade eder (Altunkaynak ve Özbek 2008). Çeşitli hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerce aktive edilen ve hücre tarafından programlanmış bir mekanizmayla hücre ölümünü kontrol eden bir işlemdir (Altunkaynak ve Özbek 2008). Hücre ölümü hücre intiharı ya da hücre kaybı şeklinde olur. Apopitozis, belirli bir moleküler işlemler sırasının sonunda hücrenin ölümünü sağlar ve aynı zamanda organizmanın yaşam döngüsü için gerekli ve yararlıdır.

Apopitozis intrensek (hücre içi sinyaller) ve ekstrensek (hücre dışı sinyaller) yollarla uyarılır. Mitokondrilerin apopitozis sürecinde önemli bir görevi vardır. Proapoptotik ve antiapoptotik üyeleri olan BCl-2 ailesi, sitokrom C'nin sitoplazmaya salınmasını sağlayarak apopitozisin başlamasını ya da sitokrom C'nin sitoplazmaya salınımını engelleyerek apopitozisin durdurulması şeklinde mitokondriyi aktifleştirirler. Dolayısıyla sitokrom C'nin sitoplazmaya salınımı apopitozis sürecinde önemlidir (www.istanbul.edu.tr/fen/notları).

Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücresel ve şekilsel değişimler, kaspazların rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişir (Hotchkiss ve Nicholson 2006). Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü

(ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'ın bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir. Bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna neden olur (www.istanbul.edu.tr/fen/notları).

Hücre ölümünün diğer bir şekli ise nekrozdur. Nekroz hücre içi gerçekleşen olaylardan ziyade dış etkenlerle, olumsuz şartlarda meydana gelir. Hücrenin enzimatik sindirimi ve protein denatürasyonlarının eş zamanlı olarak oluşmasından kaynaklanır.

1.4. Onkogenler

Hücrelerin apoptoz için aldıkları iletileri hücre membranından, çekirdeğe kadar sürdürdükleri sinyal ileti mekanizmasında işlev gören birçok proteinin ekspresyonundan sorumlu olan genler, protoonkogenlerdir (Lowitz ve Casciato 2012). Protoonkogenler normal hücrelerde proliferasyon ve diferansiyasyonu düzenleyen proteinleri kodlar. Bunlar herhangi bir nedenle mutasyona uğradıklarında veya aşırı eksprese olduklarında, normal hücrenin kanser hücresine çevrilmesini kolaylaştıran genler de onkogen olarak adlandırılmaktadır (www.genbilim.com).

Ras geni; Ras proteinleri, monomerik Guanozin 3 fosfat (GTP9) bağlayan, genelde inaktif ve sinyal iletiminde önemli bir araç olan (Kolch 2000, Öztürk 2006) GTPaz'dır (Aslan Koşar ve ark 2012). Ras genindeki mutasyonlar, insan kanserlerindeki onkogenlerin en yaygın anormalliklerindendir ve nokta mutasyonu ile aktivasyonun en iyi örneğini oluştururlar (Öztürk 2006, Dönmez ve ark 2009).

Fosfoinositid-3 kinaz (PI-3K) geni: Büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu olan bu protein, onkogenik Ras ile aktifleşir ve apoptoz baskılanır (McCormick 1999).

1.5. Tümör Baskılayıcı Genler

Hücresel onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, tümör gelişimi ile ilgili iki temel genetik değişikliktir. Tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılarlar.

Rb. Retinoblastoma geni aktif olduğunda tümör gelişmez (Tuncer 2012). Büyüme faktörleri tirozin kinaz reseptörüne bağlanır ve intrasellüler uçlar aktifleşir. Bu uçlara bağlanan proteinlerin başlattığı sinyal yolakları da nükleus içindeki siklinleri aktifleştirir. Siklinler, CDK'ları, CDK'lar da Rb'yi aktive eder. Rb, histon bağlarını parçalayan enzimleri bağlayıp DNA'nın replikasyonuna engel olur (Arıcan 2010).

P53 geni: Bir transkripsiyon faktörü olan, hücre siklusunu düzenleyen ve kanserde en sık bozulan gendir. DNA'da oluşan hasarları ortadan kaldırmak üzere aktifleşir. Hasar düzeltilemez ise hücre apopitozise yönlendirilir. Bu genin bozulması durumunda yaklaşık %50-55 insan kanserlerinin oluşum etkenidir. p53 orta bölgesinden DNA'ya bağlanır. Gen, hücreyi DNA hasarına karşı korur ve hasar oluştuğu zaman hücre çoğalmasını G1/S sınırında durdurarak DNA onarımını başlatır, onarımın gerçekleşmesini sağlar (Aydemir 2007).

1.6. Meme Kanseri

Meme kanseri, dünya ülkelerinde kadınlar arasında en sık karşılaşılan kanser türü olarak değerlendirilmektedir (Salih ve Fentiman 2001, Sasco 2001). Ayrıca sadece kadınlarda en çok görülen kanser olarak değil, birçok ülkede kanser ölümlerinin başında gelen kanser türü olarak da nitelendirilmektedir (Enein 2003). Bunun yanı sıra literatürlerde, Amerika ve Avrupa ülkelerinde ortalama her dokuz kadından birinin bu hastalığa yakalanma riskinin bulunduğu (Günal ve Günal 2000), Türkiye'ye bakıldığında da Sağlık Bakanlığı istatistiklerine göre hastalığın görülme oranının %24 olduğu ve meme kanserinin kadınlarda görülen en yaygın kanser türü olduğu belirtilmektedir (Somunoğlu 2009).

Meme kanseri meme hücrelerinde başlayan kötü huylu bir tümördür. Bu hastalık tamamıyla kadınlarda ortaya çıkar. Fakat; erkeklerde de görülebilir (www.cancerbacup.org.uk).

Meme, süt bezleri ve üretilen sütü meme başına taşıyan kanallardan oluşur. Meme kanseri, lobüllerin ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrol dışı çoğalmaları ile gelişmektedir (Canadian Cancer Society 2012). Süt kanallarından kaynaklanan kansere duktal karsinom, lobüllerden kaynaklanan kansere de lobüler karsinom adı verilmektedir. Meme kanseri en çok kanal hücrelerinde başlamasına rağmen, lobullerde de başlayabilir.

1.6.1. Meme Kanseri ve Onkogenler-Baskılayıcılar

Meme kanserinin ortaya çıkışı ve metastazı birçok faktör varlığında görülmektedir. Meme karsinomu gelişiminde özellikle progresyon aşamasında rol oynayan özel onkogen ve tümör baskılayıcı genler vardır. Hem normal hem de kanserli meme dokularında en fazla görülen ve etkili olduğu düşünülen bu onkogenler Ras, Myc ve CerbB-2 olarak sıralanabilir (Klijn 1992). Tümör baskılayıcı olarak ise en çok p53 geninin üstünde durulmaktadır (Erhan 1995).

1.6.1.1.Büyüme Faktörü Reseptörleri

CerbB–2 (HER2/Neu): CerbB–2 protein ürünü, hücre bölünmesi ve farklılaşmasına katılır. Meme kanseri için önemli bir prognostik belirteç olarak değerlendirilen bu genin amplifikasyonun klinik önemi; gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyon nedeniyle kanser patogenezine katılmasından ileri gelmektedir (Yamamoto 1986, Erhan 1995)

EGFR: Hücre yüzey reseptörü ve tirozin kinaz aktivitesine sahip olan EGFR, ekstrasellüler protein ligandlarından olan epidermal büyüme faktörü ailesi üyelerindendir (Herbst 2004). EGFR ailesi; HER2, HER3 ve HER4 alt gruplardan oluşur. EGF'nin reseptörüne bağlanmasıyla EGF hücre içine alınır, aynı zamanda EGFR'nin otofosforilasyonu ve diğer hücre içi substratların fosforilasyonu gerçekleşir. Bu yolla nukleusta transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu artar, hücre bölünmesi uyarılır. Bu yolak boyunca ortaya çıkan onkogenik mutasyonlar devamlı olarak mitozu aktifleyen sinyallerin taşınmasında rol alırlar (Öztürk 2006).

1.6.1.2. Sinyal İletimi ile İlişkili Genler

Meme kanserinde c-myc, c-fos ve c-jun ile östrojen ve progesteron proto-onkogenlerinin aktifleştikleri gösterilmiştir (van Der Burg ve ark 1992).

c-Myc: Hücre proliferasyonun regülasyonunda etkili nükleer bir proteini kodlar. c-myc'in 17. gen amplifikasyonu, hücre döngüsünün bozulmasına neden olur ve p53'e bağlı yoldan hücrenin apoptoza gönderilmesinde rol oynar. C-myc geninin aşırı üretimi veya gen yapısındaki değişiklikler meme kanserine neden olmaktadır. Prognostik değeri netlik kazanmamıştır (Öztürk 2006).

1.6.1.3. Steroid Reseptörleri

Östrojen reseptörü (ER) ve Progesteron reseptörü (PR): Gen regülasyonunda iş gören reseptörlerdir. Östrojen iki spesifik hücre içi reseptörü (ERα-β) yoluyla fonksiyonlarını gösterir. Bunlar farklı proteinler ile kompleks oluşturarak ER aktifleşir. ER yolağı insan meme kanseri patofizyolojisinde kritik bir rol oynar. ER α'nın aşırı üretimi meme kanserli hastalarda prognostik ve prediktif faktördür. ER β'nin ise yeterince prognostik değeri tanımlanamamıştır (Esteva ve ark 2004). PR geni ise meme dokusunda 3 farklı izoformu kodlar. ER yolağının işlevsel olarak ne durumda olduğunu gösterir.

1.6.1.4. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler

Bcl-2 - Apoptoz genleri: Bcl-2 geni, ilk kez insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. 20 üyesi olan Bcl-2 ailesi apoptoz sürecini düzenleyen proteinler olup, bazıları antiapoptotik, bazıları ise proapoptotik genler olarak tanımlanır. Genelde Bcl-2 ekspresyonu ER varlığı ile yakın ilişki gösterirken, EGFR ve p53 ekspresyonu ile ilişkisi yoktur. Bcl-2 ekspresyonunun prognostik faktör olduğu hala tartışmalıdır (Sierra 2000).

Telomeraz: Meme ve diğer birçok kanser türü ile ilişkili bulunan, telomerleri sentezleyen ve koruyan bir ters transkriptaz enzimdir. Telomerazlar malign tümör fenotiplerin ortaya çıkmasında rol oynarlar. Telomer aktivitesini kontrolünün nasıl sağlanması gerektiği konusunda net bir bilgi yoktur (Gelmann 1998).

1.6.1.5. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri

Meme kanserinin oluşumunda %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel yatkınlık ortaya çıkmaktadır. Kalıtsal meme kanserinde nadir gözlenen yatkınlık genleri BRCA1 ve BRCA2 genleridir.

BRCA1 ve BRCA2 genleri: BRCA1 geni, kromozom 17q21'e, BRCA2 ise kromozom 13q12'ye yerleşik bir gendir (Öztürk 2006). Bu genlerdeki germ hücre soyu mutasyonlarını içeren kadınların yaşamlarının bir döneminde meme kanseri geliştirme riski %50-80 arasında değişmektedir (Polyak 2002). Meme kanserli hastalarda 17. kromozomun BRCA1 geninin bulunduğu q12-q21 bölgesinde allel kayıpları gözlenmiştir. Bu proteinin ekspresyonunda artışın yüksek metastaz potansiyeli ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Tandon ve ark 1990). Meme kanseri risk tespitinde mutasyon analizlerinin yapılmasında ön sırada yer almaktadır.

1.6.2 Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserinin hangi nedenlerle ortaya çıktığı net olarak bilinmemekle beraber, yapılan araştırmalara göre bazı kriterlere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Campbell 2002, Canadian Cancer Society 2012). Meme kanserinin görülme sıklığı, risk faktörleri olarak adlandırılan bazı kriterlerin azalıp, artmasına göre değişkenlik göstermektedir (Manjer ve ark 2000). Kadınlarda meme kanseri görülme riskini yükselten faktörler şöyledir;

- ✓ Yaş
- ✓ Kişisel meme kanseri öyküsü
- ✓ Adet dönemi
- ✓ Ailevi meme kanseri öyküsü
- ✓ Daha önce memede kansere yönelik bir lezyonun bulunmuş olması
- ✓ Doğurganlık öyküsü
- ✓ Östrojen tedavisi

- ✓ Oral kontraseptiflerin kullanılması
- ✓ Alkol, sigara kullanımı ve diyet
- ✓ Meme kanseri gelişimine yatkın genleri taşımak
- ✓ Mamografi taramaları
- ✓ Over ya da uterus kanseri öyküsü
- ✓ Elektromanyetik alanlara ve radyasyona maruz kalma

1.6.3. Klinikte Meme Kanseri

Meme kanserleri in situ (invazif olmayan) ve invaziv karsinomlar olarak iki ana grupta toplanmaktadır. İn situ karsinomda kanser hücreleri meme içinde belirli bir bölgede olup yayılma göstermezler. Mesela, İn situ duktal karsinom (DCIS), süt kanalları içinde sınırlıyken, İn situ lobüler karsinom (LCIS), süt bezleri içindedir. İnvaziv karsinom ise meme kanseri, süt bezleri veya süt kanallarına yayılmış ve vücudun diğer bölümlerine de yayılma potansiyeli olan kanserlerdir. İnvaziv duktal karsinom (IDC), süt kanallarından başlar ve çoğalarak yakındaki tüm meme dokularına yayılır. İnvaziv lobüler karsinom (ILC), Süt bezlerinden başlar ve çevre dokulara yayılır. Bu nedenle invaziv karsinomlar, lenfatik ve kan damarlarını invaze ederek bölgesel lenf düğümlerine ve diğer organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir (İlvan 2006).

Lenf nodları metastazı (N), tümör çapı (T), metastazın varlığı (M), histolojik tip ve histolojik sınıf meme karsinomunda prognostik faktörler olarak değerlendirilmektedir. Bunun yanı sıra steroid hormon reseptörleri (östrojen ve progesteron reseptörü), onkogenler (HER-2/neu), tümör baskılayıcı genler (p53), anjiogenez ve proteazlar da meme karsinomu prognozu üzerine etkilidir (İlvan 2006).

1.6.4. Meme Kanseri Tedavisi

Son yıllarda meme kanserinde önemli tedavi olanakları ortaya çıkmıştır ve hastalığın saptandığı safhaya göre bu olanaklar değişmektedir. Meme kanseri tedavisi, günümüzde, cerrah, onkolog, radyasyon onkoloğu, radyolog, patolog, psikolog, plastik cerrah, fizyoterapist gibi farklı alanlardan gelen uzmanlarca yapılmaktadır.

Cerrahi operasyon: Günümüzde meme kanseri tedavisinde, cerrahi girişimin birkaç farklı uygulaması vardır. Bu uygulamalar temel olarak, memenin alınmadan korunmasına (cerrahi müdahele) yönelik olanlar ve memenin tümünün çıkartılmasına (mastektomi) yönelik olanlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır.

Kemoterapi: Kanser hücrelerini öldürücü ilaçların kombine halde ağızdan veya damardan verildikten sonra kan dolaşımına girerek tüm vücuda dağılmasını ve böylece diğer organlara yayılan tümörlerin yok edilmesini içeren bir tedavidir. Meme kanseri genellikle kemoterapiye iyi cevap verir.

Hormon tedavisi: Bazı meme kanseri hücreleri, içerdikleri hormon reseptörleri aracılığı ile östrojene duyarlı olmaktadır. Hormonal tedavi, hormon reseptörü-pozitif meme kanserlerine etkilidir. Hormon tedavisinde amaç, bu şekilde östrojen reseptörü içeren ve bu hormona duyarlı olan kanser tiplerinde, östrojen etkisini bloklayarak, kanser hücrelerinin çoğalmasını önlemektir.

Radyoterapi: Işın tedavisi, meme bölgesine ve koltuk altına yüksek enerjili x, gama ışınları ya da radyoaktif çekirdeklerin yerleştirilmesiyle, cerrahi girişimden sonra kalma olasılığı olan kanser hücrelerinin imha edilmesini sağlamak amacı ile yapılır. Radyoterapinin sağ kalım oranını artırdığı yönünde çalışmalar devam etmektedir.

Biyolojik tedavi: Metastatik meme kanseri olan bazı kadınlar hedefe yönelik tedavi görürler. Yani EGFR ailesinden olan HER2 proteinin aşırı ekspresyonu sebebiyle meme tümörüne sahip kadınlarda uygulanan bir tedavidir. HER2'ye karşı geliştirilmiş olan monoklonal antikor (trastuzumab) HER2'yi bloke ederek, kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlatabilir ya da durdurabilir.

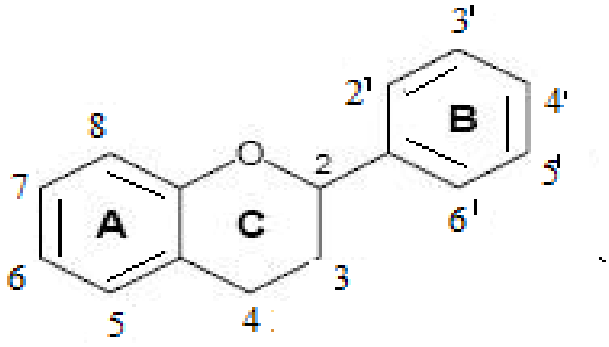
1.7. Flavonoidler

1.7.1. Flavonoidlerin Yapısı

Flavonoidler, insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan ve bitkilerde bulunan düşük molekül ağırlıklı doğal bileşiklerdir (Felicia ve ark 1997, Sghaiera ve ark 2011). Doğal biyolojik bileşikler olduklarından biyoflavonoidler olarak da adlandırılmaktadır.

Flavonoidlerin uzun ve geniş bir tarihi vardır. Flavonoidler ilk kez 1936 yılının başlarında, insanların kalp sağlığını koruma ve genel huzurunu artırma açısından dikkat çekmiştir. Bu yıllarda ilk narenciye türündeki besinlerde bulunan flavonoidlerin metabolizması araştırılmış, daha sonra diğer bitkisel besinlerdeki flavonoidler de araştırmaya dâhil olmuştur (naturelremedies.org). Dolayısıyla flavonoidler bitki polifenolleridir ve diyette önemli miktarda bulunmaktadır (Cooray ve ark 2004).

Flavonoid bileşikleri, benzo-γ-piron türevlerinden meydana gelen geniş heterojen grupları içeren polifenollerdir (Gibellini ve ark 2011). Flavonoid iskeleti (Şekil 1.2) heterosiklik (C) bir halde bulunan 3 karbonlu bir zincirle bağlanmış iki fenolik (A,B) halkadan oluşur. Bazen bu üç karbonlu zincir açık olabilir.



Şekil 1.2. Flavonoid iskeleti

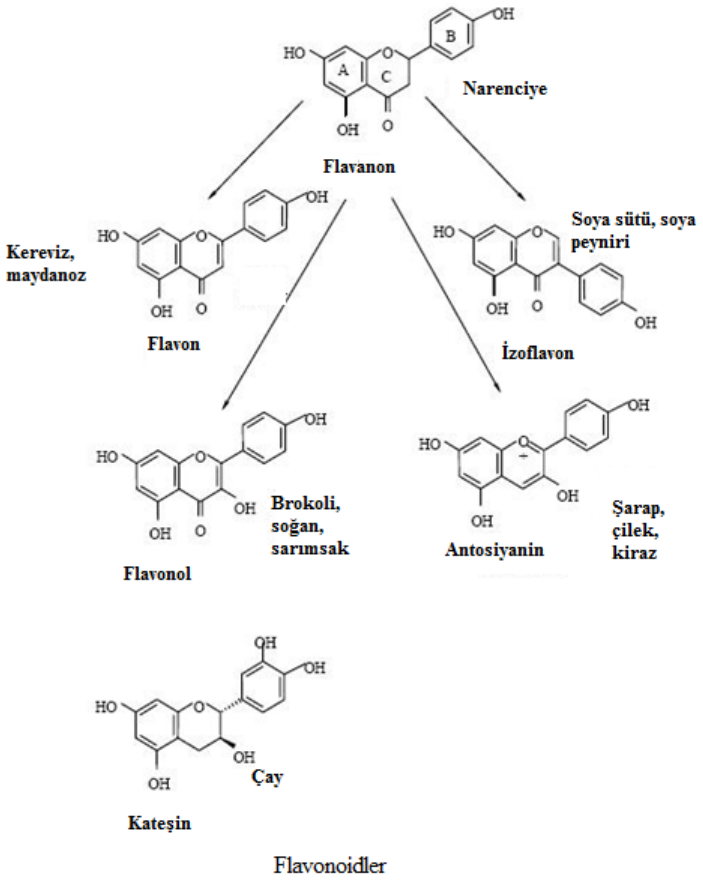
Flavonoidlerin karakteristik özelliklerini bu heterosiklik halka belirler (Kocabaş 2008). Doğada, 5000'den fazla flavonoid belirlenmiştir (Cutler ve ark 2008)

ki bunlar 10'dan fazla alt grup içerirler (Wang ve ark 2009), ama moleküler yapılarına göre esasen 6 sınıfta toplanırlar (Cutler ve ark 2008, Wang ve ark 2009, Gibellini ve ark 2011);

1. Flavon
2. Flavanon
3. Flavonol
4. İzoflavon (USDA'ya göre izoflavonlar sınıflandırmaya dahil değildir)
5. Antosiyanidin
6. Flavanol (Kateşin)

Flavonoidler çoğunlukla meyve, sebze, tıbbi ve aromatik bitkilerle, fındık, fıstık gibi sert kabuklular, kırmızı şarap, çay (Coorayve ark 2004, Gibellini ve ark 2011) ve bitkilerin kök, gövde, yaprak gibi kısımlarında bulunan bileşiklerdir (Kızılkeçili 2007).

Flavonoidlerin ana diyet kaynakları geniş ve birbirinden farklı grupları içerirler (Şekil 1.3). Flavonol; (kuersetin, mirisetin, kaemferol) bitkisel besinlerin büyük miktarında bulunur ve sebze yapraklarında, elma, soğan, brokoli ve böğürtlen, ahududularda bulunur. Flavonlar; (apigenin ve luteolin) ve antosiyanidinler tahıllarda, otlarda ve sebze yapraklarında da az miktarda bulunurlar. Kateşinler; (epikateşin, kateşin) çay, elma, üzüm, çikolata ve kırmızı şarapta çok yaygındır. Flavononlar; (naringenin ve hesperetin) turunçgillerde ve bu meyvelerin suyunda çok fazla bulunur. İzoflavonlar; (daidzein ve genistein) soya bazlı besinler ve soya fasulyesinde çokça bulunur (Wang ve ark 2009).



Şekil 1.3. Flavonoidlerin sınıflandırılması ve diyetteki yeri (Peterson ve Dwyer 1998, modifiye edilmiştir)

Flavonoidleri P vitamini olarak kabul eden görüşler de bulunmaktadır (Kahraman ve ark 2002, Shimoda ve ark 2008, Nalini ve ark 2012). Fakat bu tabirin daha çok narenciye flavonoidleri olan flavononlar için kullanıldığı söylenmektedir.

1.7.2. Flavonoidlerin Metabolizması ve Biyoyararlanımı

Flavonoidlerle ilgili ilk çalışma 1936 yılında Rusznyak ve Szent-Gyorgyi tarafından yapılmıştır (Çapanoğlu Güven ve ark 2010). Bu çalışmada flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri sorgulanmıştır (Çapanoğlu Güven ve ark 2010). İlk zamanlarda bitkilerdeki renk, tat ve bitki fizyolojisindeki etkileriyle ortaya çıkan flavonoidler, son yıllarda özellikle sağlık üzerine olumlu etkilerinin ortaya çıkmasıyla önem kazanmıştır. Antioksidan ve serbest radikal yakalama fonksiyonlarıyla, koroner kalp

hastalıkları ve çeşitli kanser türlerinin engellenmesinde rol oynadığı birçok çalışmayla gösterilmiştir (Chen ve ark 1996, Serafini ve ark 2006).

Flavonoidler aglikon veya glikozitler şeklinde bulunmaktadır. Aglikonun farklı hidroksil gruplarına en az 8 ayrı monosakkarit veya bunların birleşmesi ile oluşan di-,tri-sakkaritlerin bağlanması sonucu glikozit formlar meydana gelmektedir (Erlund ve ark 2003). Flavonoid glikozitleri bağırsağa girmeden önce şeker kısmından ayrılmakta, aglikonları ise hücre membranlarından serbestçe geçebilmektedir (De Pascual-Teresa ve ark 2007, Viskupicova ve ark 2007).

Biyoyararlanımı hakkında çok az bilgi olmasına rağmen, son çalışmalar çözünebilir flavonoidlerin emilimini miselleşmenin artırabileceğini söylemektedir (Perez-Jimenez ve ark 2009). Eğer diyet flavonoidlerine ince barsak enzimlerince erişilemiyor ve flavonoidler hidrolize uğrayamıyorsa daha sonra bunlar, kolonik mikroflorada bozulma göstermektedir (Ortega ve ark 2009). Emilim sırasında ve sonrasında, flavonoid aglikonları karaciğerde faz II enzimleri tarafından konjugasyon ürünleri olan glukuronize, metoksilli ve sülfatlı bileşiklere dönüşür. Konjugat fenolik metabolitleri dolaşımda albumine bağlanır, fakat hücre ve dokularda alımı ve birikimi anlaşılamamıştır. Emilen flavonoidler ve metabolitleri esas olarak idrar ve safrayla atılır. Fakat duedonum yoluyla geri emilebilir (Corcoran ve ark 2012). Karaciğer esas flavonoid metabolizmasının gerçekleştiği doku gibi görünse de bağırsak mukozası ve böbrekler de konjugatif enzimler içermektedir (Hackett 1986). Kolon mikroflora tarafından flavonoidlerin, bağırsak biyotransformasyonu, dehidroksilasyon, redüksiyon, C-halkası bölünmesi ve demetilasyon gibi metabolik faaliyetler gerçekleştirilebilir. Oluşan bu metabolitler de hem bağırsakta hem de sistemde biyoaktif yararlı bileşikler olarak rol oynayabilir. Birçok flavonoid metabolitleri faz II antioksidan ve detoksifikasyonla ilgili S-transferaz, UDP-glukuronoziltransferaz, NAD (P) H, kinon oksidoredüktaz 1 ve epoksit hidrolaz gibi enzimleri indükler. Flavonoidlerin biyoaktivitesi yapısına ve hedef dokuya bağlıdır (Corcoran ve ark 2012).

Flavonoidlerin metabolize formlarının kanda bulunması, doğal bileşiklerinin bulunmasından farklıdır ve yaklaşık 50 mg aglikon alımı ile plazma konsantrasyonunda 0-4 μM kadar flavonoid bulunmaktadır (Gibellini ve ark 2011).

Batı diyetinde flavonoidlerin toplam alımına bakıldığında günlük 0,2g-1g olarak değişmektedir (Zhang ve ark 2004).

Günümüzde flavonoidlerin biyoyararlanımı ve mekanizması hakkında yapılan çalışma sayısı çok azdır. Dolayısıyla flavonoidlerin insanlardaki metabolik dönüşümlerinin göz ardı edilmesinden ötürü sağlık üzerine olan etkileri de net değildir. Yapılan çalışmalarda da flavonoidlerin, in vitro ve in vivo olarak biyoaktiviteleri arasında önemli farklılıkların olduğu yönünde sonuçlara varılmıştır (Gibellini ve ark 2011). Dolayısıyla flavonoidlerin emilimi, biyoyararlılığı ve metabolizmasının net olması çok önemlidir (Viskupicova ve ark 2008). Biyoyararlılık çalışmalarında emilimin etkinliği ve alınan besinlerin metabolik kullanımı da dikkate alınması gereken kriterlerdendir (Gregory ve ark 2005).

Flavonoidlerin tüketim miktarlarının belirlenmesi de henüz netleşmemiştir (Gibellini ve ark 2011). Bunun sebepleri arasında ışık, bitki genetiği, çevresel koşullar, çimlenme, olgunluk derecesi, işleme ve depolama, cins-varyete gibi bitkideki flavonoid oluşumunu etkileyen çok sayıda faktörün varlığı ile ilişkili olmasıdır (Ross ve Kasum 2002). Ayrıca flavonoid bileşiklerinin analizi için referans metotların olmaması, analitik metotların standardizasyon eksikliği (Gibellini ve ark 2011) ve buna bağlı olarak bitkisel gıdalardaki flavonoid miktarına ilişkin verilerin yetersiz ya da çelişkili olması da durumu zorlaştırmaktadır (Çapanoğlu ve ark 2010).

Aglikonun kimyasal yapısı ve glikozit formun tipi, biyoyararlılığı etkileyen en önemli etkenler arasında gösterilmektedir. Aynı aglikonun farklı şeker gruplarıyla bağlanarak oluşturduğu farklı glikozit formlarının biyoyararlılıkları değişkenlik göstermektedir (Erlund ve ark 2006).

Emilim aynı zamanda flavonoidlerin dozu, alım şekli, beslenme, cinsiyet farklılıkları, bireylerin genetik özellikleri ve kolondaki mikrobiyal populasyondan da etkilenmektedir (Viskupicova ve ark 2008). Diğer taraftan gıda kaynaklı flavonoidlerin emiliminin birlikte tüketildiği matriksten etkilendiği de açıktır. Farklı gıda gruplarında emilimin farklı olmasının nedeni, flavan çekirdeği üzerindeki sakkaritlerin yanı sıra diğer fonksiyonel grupların da farklılığı ile ilişkilidir (Heim ve ark 2002).

Amerika Birleşik Devletleri'nde günlük flavonoid alımı mevsime bağlı olarak 1,0-1,1 g/gün aralığında değişmektedir (Kuhnau 1976). Ancak bu çalışmada kullanılan analitik metotların günümüz koşullarına uygun olmadığı açıktır (Ross ve Kasum 2002). Sampson ve ark. (Sampson ve ark 2002), çalışmalarında ABD'deki günlük flavonol ve flavon alım miktarını, kadınlar ve erkekler için sırasıyla 20 ve 22 mg/gün olarak belirlemişlerdir. Hertog ve ark. (Hertog ve ark 1993) tarafından yapılan çalışmada ise Hollanda'daki flavonol ve flavon alımının 23 mg/gün olduğu belirtilmiştir. Danimarka için belirlenen flavonol, flavon ve flavonon alım miktarı 28 mg/gün olarak rapor edilmiştir (Leth ve Justesen 1998). Bir diğer çalışmada, Finlandiya için belirlenen flavanon alım miktarının 36,6 mg/gün (28,3 mg/gün hesperetin ve 8,3 mg/gün naringenin) olduğu belirtilmiş, ancak büyük ölçüde turunçgillerde ve daha az miktarlarda aromatik bitkilerde bulunan flavanonların alım miktarının kişisel beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak önemli derecede farklılık gösterebileceği de vurgulanmıştır (De Pascual-Teresa ve ark 2007).

1.7.3. Flavonoid Takviyesi

Flavonoid takviyeleri marketlerde geniş ölçüde satılmaktadır (Tribolo ve ark 2008). Bu kimyasal bileşikleri tüketenlerin, günlük alımına dikkat etmeleri gerekmektedir. Bazen bu takviyeler günlük olarak, normal bir flavonoid içeren besinden daha çok tüketilmektedir. Mesela, kuersetin içeren tabletler günlük 1 g ve üstü şeklinde tüketilmektedir (Harwood ve ark 2007). Oysaki kuersetinin günlük alımı 10–100 mg arasında değişmektedir (Scalbert ve Williamson 2000, Erdman ve ark 2007). Başka bir örnek, çok fazla tüketilen izoflavon bazlı nutrasötikler (örneğin, haplar, tabletler, özler) takviye olarak alınmaktadır (Espin ve ark 2007). İzoflavonların bildirilen içeriği değişkendir (örneğin 50, 135 ve 500 mg) ve günlük farklı dozlar önerilmektedir. Fakat günümüzde izoflavonlar için spesifik bir doz belirlenememiştir (Espin ve ark 2007). Bu takviyelerin yan etki gösterip göstermedikleri ise hala bir soru işaretidir. Bunun yanı sıra bu takviyeler geleneksel ilaç olarak görülmektedir. "Supra-beslenme" flavonoid dozlarının konvansiyonel ilaçlarla birlikte alımı flavonoid-ilaç etkileşimlerine neden olabilmektedir (Cermak 2008). Bunların da ne kadar güvenli kullanılabileceği hakkında endişe duyulmaktadır.

California Üniversitesi'nde uzmanlar, flavonoid takviyelerinin insan sağlığı üzerindeki endişesini dile getirmişlerdir. Meyve ve sebzelerin sağlığa yararlı etkilerinin olduğunu fakat bunların kimyasal bileşiklerinin özellikle de yüksek konsantrasyon ve dozlarda sağlığı tehdit ettiğini öne sürmektedirler. Bu kimyasal bileşikleri tüketmektense, meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin daha çok faydalı olabileceği yönündeki fikirlerini söylemişlerdir.

1.7.4. Flavonoidlerin Etkileri

Flavonoidler çok güçlü antitümör ajanlardır, antioksidan ve antiproliferatif fonksiyonlarından ötürü apoptozisi indükleme, hücre farklılaşmasını ve hücre döngüsünü modüle edebilme özelliklerine sahiptirler (Choi 2007, Lee ve ark 2008, Sghaiera ve ark 2011). Teroöpatik etkileri olan bu bileşikler (Egert ve Rimbach 2011), kimyasal önleyiciler olarak adlandırılırlar (Gibellini ve ark 2011). Çalışmaların çoğunda flavonoidlerin biyolojik karakterleri analiz edilmiştir ve bu bileşiklerin antioksidan antimikrobiyal antiproliferatif ve proapoptotik etkilerinin olduğu bulunmuştur (Gibellini ve ark 2011). Ayrıca antiviral, antiinflamatuar (Seyitoğlu 2008) olduğu da söylenmektedir. Oksidasyon sisteminde bulunan (5-lipoksigenaz, siklooksijenaz, monooksijenaz, ksantin oksidaz) enzimlerin birçoğunu inhibe ettiği (Hertog ve ark 1993, Formica ve Regelson 1995, Sghaiera ve ark 2011) ve lipit peroksidasyonunu önlemek suretiyle de aterosklerotik plakların büyümesini önlediği söylenmektedir. Aynca antitrombotik etkisi nedeniyle aterosklerozisten korumaktadırlar (Hertog ve ark 1993, Regelson 1995). Flavonoidlerin reaktif oksijen türlerini yakalaması aşağıdaki mekanizmayla gerçekleşmektedir.

$$\text{Flavonoid (OH)} + R^{\cdot} \longrightarrow \text{Flavonoid (O}^{\cdot}\text{)} + RH$$

Homosisteinin indüklediği oksidatif stres üzerinde flavonollerden olan kuersetinin koruyucu etkisine dair bir çalışmada (Kocabaş 2008) kuersetinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) toksik etkilerini ve kısmen de olsa oksidatif hasarı azaltan antioksidan özelliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarla yüksek oranda flavonoid içeren meyve ve sebze tüketimi ile daha düşük kanser riski arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Flavonoidce zengin diyetle beslenen ve sigara içen-içmeyen postmenopozal kadınlarda gıda sıklığı anketi yapılarak yürütülen bir çalışmada akciğer kanserine

yakalanma riskinin flavonoid bazlı besinlerin tüketimi ile azaldığı ortaya konmuştur (Sghaiera ve ark 2011).

Proantosiyanidinler ve diğer flavonoidlerin pankreas kanseri ile ilişkisini anlatan bir çalışmada, her gün proantosiyanidince zengin meyve tüketimi yapan bireylerde, proantosiyanidinin pankreas kanserine yakalanma riskini % 25 oranında düşürdüğü anlaşılmıştır (Rossi ve ark 2012).

Bunun yanında, orta yaşlı kadınlarda flavonoidce zengin besinlerin tüketilmesi ve kanser riski arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada (Wang ve ark 2009) flavonoidlerin, kansere yakalanma riskini azaltıcı etkisinin kayda değer bir öneminin olmadığı gözlemlenmiştir.

Birçok epidemiyolojik çalışma, antioksidan olan flavonoidlerin kardiyovasküler hastalık ve kanser gelişim riskini düşürdüğünü savunmuştur. Raporların temelinde in vitro ortamda kanser hücresi üzerinde flavonoidlerin çeşitli antikanser etkileri bulunmuştur. Mesela hücre proliferasyonunu ve kinaz aktivitesini inhibe etme ile apoptosisi indükleme gibi (Choi 2007). Bu polifenollerin, kültür ortamındaki insan meme kanser hücresinde proliferasyonu inhibe ettikleri gözlemlenmiştir. Bu gözlemlere göre flavonoidler apopitozisi uyarırlar ve hücre döngüsünü inhibe ederler. Fakat buna rağmen potansiyel antikanser olan flavonoidlerin bazı mekanizmaları halen anlaşılamamıştır (Choi 2007).

Bir izoflavon olan genisteinin, meme kanseri hücrelerine olan etkisine dair bir araştırmada, IGF-1R (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü 1) ekspresyonuna potansiyel engelleyici etkisi ve bu etkide belirli sinyal yollarının rolleri incelenmiştir. Genisteinin meme kanseri hücrelerinde IGF-1R ekspresyonunu inhibe ettiği görülmüştür (Aydemir 2007).

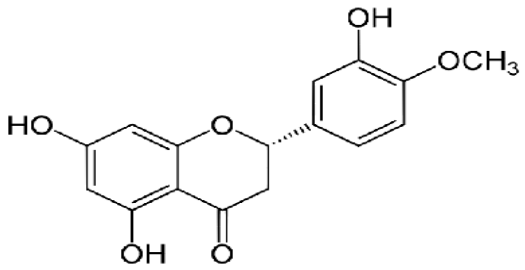
Yapılan bir çalışmada da flavonoidlerin fare venograft modelinde kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri gözlenmiştir. Kanser hücrelerine flavonoid bazlı sitotoksik tedavi uygulamasıyla, flavonoidlerin sitotoksisitesi farklı mekanizmalarla bulunmuştur (Sghaiera ve ark 2011).

Flavonoidlerin bu sitotoksik aktivitesi, hidroksil sayısına ve hidroksil grubunun bulunduğu konuma bağlıdır. B halkasındaki orto hidroksilasyon ve 4-COO- grubunun olması, C_2-C_3 arasında çift bağ bulunması sitotoksisiteyi artırır.

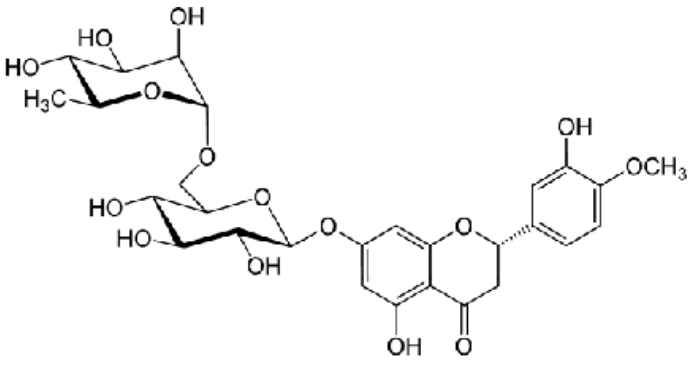
Ayrıca ortometilasyon ve glukuronidasyon da flavonoidin sitotoksisitesini artırır (Sghaiera ve ark 2011).

1.7.5. Hesperetin

Hesperetin (Şekil 1.4) (3',5,7-trihidroksi-4'-metoksiflavon) flavonoidlerin bir alt grubu olan flavanon bileşiklerindendir ve genel olarak narenciye türlerinde bulunur. Hesperetin, doğada glikozid formu olan hesperidin (Şekil 1.5) (hesperetin-7-*O*-rutinosit) olarak bulunmaktadır (Choi 2007, Nalini ve ark 2012). Hesperetin, biyoaktif bir flavonoid (vitamin P) olup, Çin'de tıbbi ilaç olarak kullanılmaktadır (Shimoda ve ark 2008, Nalini ve ark 2012).

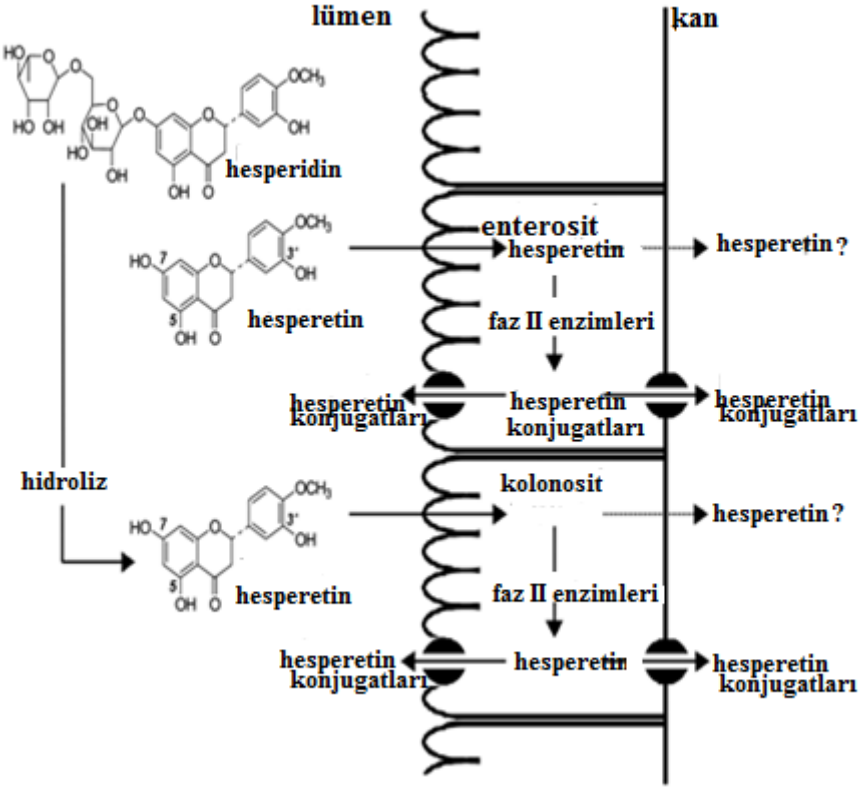


Şekil 1.4. Hesperetinin molekül yapısı
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hesperetin_structure.svg)



Şekil 1.5. Hesperidinin molekül yapısı
(http://sr.wikipedia.org/wiki/Hesperidin)

Diyet hesperidini önce barsak bakterilerince emilerek hesperitine deglikolize edilir ve hücre membranından kolayca geçer. Emilen hesperetin karaciğere taşınır ve çeşitli metabolik reaksiyonlarla konjugasyon formuna dönüşür (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Rutinosid hesperidin ve aglikon hesperetinin bağırsak içine alımı (Brand ve ark 2008, modifiye edilmiştir).

Hesperidinin günlük alımının, beslenme alışkanlıklarına önemli derecede bağlı olduğu söylenmektedir. Genel olarak hesperidinin miktarı, total flavonoid alımının önemli bir parçasını oluşturur ve alınması gereken miktar 15 mg/gün olarak tahmin edilmektedir (Brand ve ark 2008).

Deney hayvanlarıyla yapılan bir çalışmada hesperetin, biyoyararlanım ve farmokinetik açıdan değerlendirilmiş ve hayvanların plazma, idrar ve safralarında hesperetine yüksek oranda rastlanmamıştır. Yine çalışmalar hesperetinin biyolojik yararlarını açıklamış, fakat hesperetinin vücutta bulunmaması sebebiyle bu çalışmalar olumsuzlukla sonuçlanmıştır (Choi 2007). Yapılan başka bir çalışmada ise hayvanların plazmasında, portakal ve türevlerinin sindiriminden sonra yüksek konsantrasyonda hesperetine rastlanmıştır (Erlund ve ark 2001). Yine bir çalışmada insan plazmasında da portakal ve türevlerinin sindiriminden sonra yüksek konsantrasyonda hesperetine rastlanmıştır ve hesperetin alımının biyoyararlanım açısından önemli olduğu savunulmuştur (Erlund ve ark 2001).

Çalışmalara bakıldığında hesperetinin, diyet alışkanlıklarına bağlı olması ve etki mekanizmasının da tam anlaşılamaması sebebiyle biyoyararlanımı da çelişkili sonuçlar vermektedir.

Hesperetin çok güçlü bir radikal yakalayıcısı, antioksidan, antimutajenik ve enzim aktivitesinde savunma sistemine sahip bir bileşiktir (Erlund ve ark 2001, Kım ve ark 2004, Choi 2007, Shimoda ve ark 2008). Ayrıca yağ çözücü, kolestrol düşürücü (Chiba ve ark 2003) etkileri vardır. Fosfolipaz A2, lipoksigenaz, HMG-CoA redüktaz enzimlerini engelleyebilir. Histamin salgılanmasını durdurarak alerjik reaksiyonlara ve ateşe karşı etkili olur (Kobayashı ve Tanabe 2006).

Hiroshige Chiba ve ark. (Chiba ve ark 2003) tarafından yumurtalıkları alınmış fareler üzerinde yapılan bir çalışma, diyetlerine hesperidin eklenen farelerin yağ ve kolestrol oranlarının düştüğünü, ayrıca hesperidinin kemik yıkımından sorumlu osteoklast miktarını düşürerek kemik erimesini durdurduğunu göstermiştir.

Hesperetinin B halkası, C halkasındaki karbonil grubu ile konjuge değildir. Bu özelliğinden dolayı biyolojik ve farmakolojik özellikleri, diğer flavonoidlerle karşılaştırıldığında farklıdır. Son çalışmalar hesperetinin B halkasındaki fenolik OH grubunun, onun antianjiyojenik potansiyelinin göstergesi olduğunu savunmaktadır (Nalini ve ark 2012).

Yapılan çalışmalar hesperetinin, kolon (Nalini ve ark 2012), meme (Choi 2007, Ye ve ark 2011), gastrointestinal (Zarebczan ve ark 2011) gibi çeşitli kanser türlerine karşı koruduğu gözlemlenmiştir.

Choi'nin yaptığı bir çalışmada hesperetin verilen farelerde, hesperetinin farelerin embriyonik kök hücrelerindeki damar yapı formatını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etki bunun prooksidan etkisinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla hesperetin antikanser bir ajandır (Choi 2007).

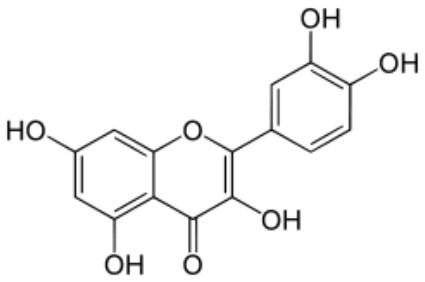
Hesperetin indüklenmiş hücre döngüsü progresyonunda, hücre büyüme inhibisyonu, hücrelerin farklı dozlardaki hesperetine maruz bırakılmasıyla gözlemlenmiştir (Zarebczan ve ark 2011).

Aromataz enzimi, östrojen sentezinden sorumlu ve östrojen reseptör pozitif meme kanseri tedavisinde de başlıca enzimdir. Daha önceleri in vitro çalışmalar, hesperetin, naringenin ve apigenin gibi flavonoidlerin en güçlü doğal aromataz

inhibitörleri olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmada meme karsinogenezinde, özellikle hesperetin aromataz inhibisyonunu gerçekleştirmede potansiyel bir kemopreventif ajan olarak gösterilmiştir (Ye ve ark 2011).

1.7.6. Kuersetin

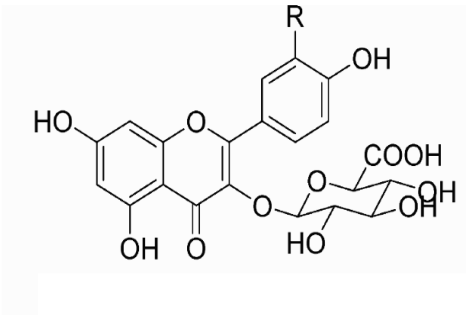
Kuersetin (Şekil 1.7) (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon), polifenolik flavonoid bileşiklerinin geniş bir sınıfına aittir (Kocabaş 2008).



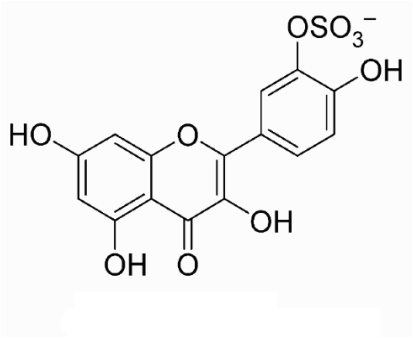
Şekil 1.7. Kuersetinin molekül yapısı
(http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin)

Meyve ve sebzelerde çokça bulunan kuersetin, suda az çözünebilen flavonoidlerdendir (Kızılkeçili 2007). Elma ve soğan başta olmak üzere, kırmızı şarap, greyfurt, siyah çay, ahududu, yaban mersini, kiraz, brokoli gibi yeşil sebzelerde çokça bulunur (Kızılkeçili 2007, Gibellini ve ark 2011).

Kuersetin, çoğunlukla hidroliz reaksiyonuyla 4. karbondaki hidroksil grubunun hidrojeni ile bir sakkaritin yer değiştirmesi sonucu oluşan glikozitler halinde bulunur (Şekil 1.8).

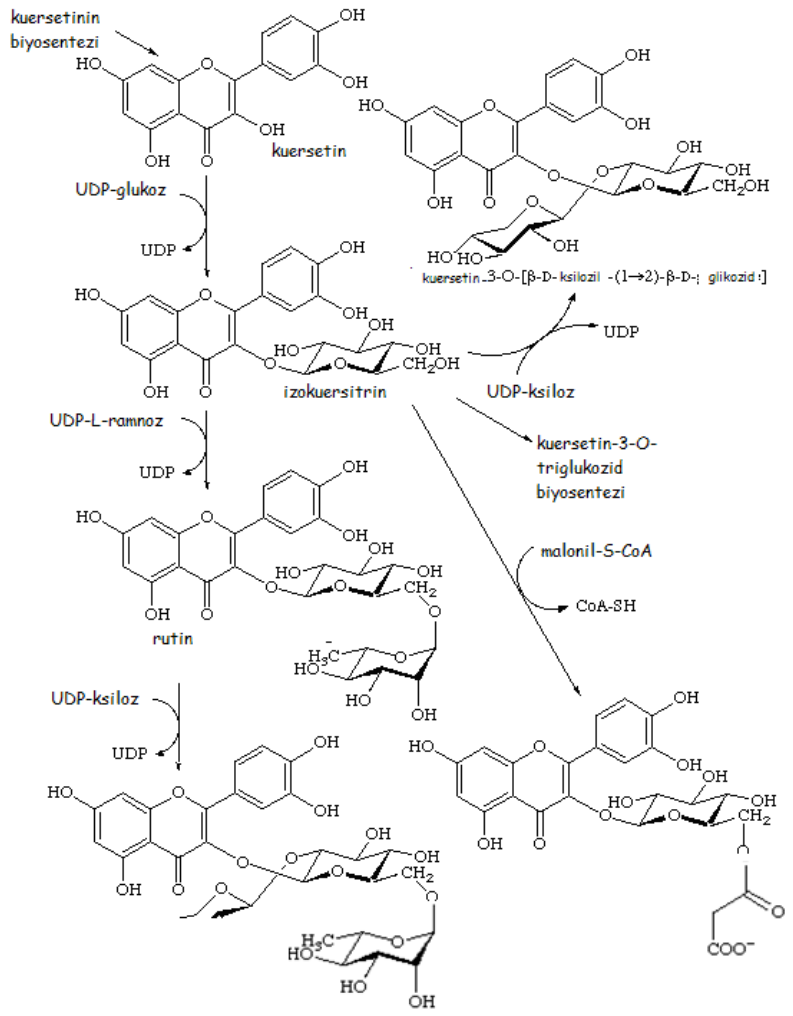


Şekil 1.8. R=OH: Kuersetin 3-O-glukuronid
(http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin_3-O-glucuronide)



Şekil 1.9. Kuersetin 3'-O-sülfat
(http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin_3-O-sulfate)

Kuersetinin yararlı etkileri, diğer flavonoidlerde de olduğu gibi alımına, emilimine metabolizmasına ve atılımına bağlı olarak değişmektedir (Şekil 1.10). Bunun üzerine gerek laboratuar gerekse insan üzerinde yapılan çalışmalar halen devam etmektedir. İlk çalışmalar kuersetinin biyoyararlanımının sınırlı olduğunu gösterse bile son çalışmalarda bunun aksini iddia etmektedir. Yapılan bir çalışmada alınan saf kuersetinin sindiriminden 15–30 dk sonra plazmada 250–500 mg civarında kuersetin bulunduğu saptanmıştır. Bu konsantrasyon 120–180. dk'larda en yüksek değerine ulaşmakta ve 24 saat sonra tekrar başlangıç seviyesine düşmektedir. Kuersetin (genellikle güvenli olarak tanınan) ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) (Harwood ve ark 2007, Utesch ve ark 2008) tarafından belirlenmiş kriterlere göre GRAS (güvenli kabul edilen) statüsüne sahiptir.



Şekil 1.10. Kuersetinin biyosentezi
(http://www.enzyme-database.org/reaction/phenol/querc3gly.html)

Flavonoid metabolitleri, karaciğerde hidroksilasyon ve metilasyon gibi modifikasyonlarla gerçekleşir (Hackett 1986). Ayrıca glukuronik ve sülfat asit moleküleri (Şekil 1.8 ve şekil 1.9) gibi konjugat türevleri de meydana gelmektedir. Dolayısıyla kuersetin ve rutinden zengin bir diyetle beslenen ratların plazmasında çeşitli konjugat türevleri bulunur (Manach ve ark 1995, Manach ve ark 1997,). Bu konjugat türevleri de idrar ve safrayla atılır.

Yapılan bir çalışmada bakteriyel metabolizmaya rağmen, %0,2 kuersetin içeren bir diyetle beslenen ratların besini sindirdikten sonra kan plazmalarında 100 µmol/l kadar kuersetin birikimi olmuştur (Gerwirtz 1991). İnsanlarda da kuersetin glikozitlerini içeren kızarmış soğan halkalarının (yaklaşık 64 mg kuersetin aglikonu

içerir) alımından 3 saat sonra, plazmada 650 nmol/l olduğu görülmüştür ve kuersetinin en fazla birikebileceği konsantrasyondur. Hollman ve ark. yaptığı bir çalışmada saf kuersetinin glikozile kuersetine göre daha az emiliminin gerçekleştiği gösterilmiştir (Hollman ve ark 1995).

Bir başka çalışmada soğan tüketiminin, plazmada kuersetin düzeylerinin lenfosit DNA'sında kırılganlık direncini artırdığı ve idrarda oksidatif metabolitlerinin azaldığı gösterilmiştir (Le Marchand ve ark 2000).

Kuersetinin birçok biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri açıklanmıştır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2012). Lösemi, kolon, meme, akciğer, hepatoma ve prostat dahil olmak üzere birçok insan kanser hücresi hatlarında antikanser faaliyetlere sahip olduğu söylenmektedir (Liu ve ark 2012). Kuersetinin potansiyel kemopreventif etkileri, antioksidatif **(**Gibellini ve ark 2011) aktivitesinin yanı sıra karsinojenleri aktive eden enzimleri inhibe etme, hücre reseptörleri ve diğer proteinleri regüle etme gibi çeşitli mekanizmalarla anlatılmıştır (Michaud-Levesque ve ark 2012). Bunun yanında kuersetinin pulmoner ve kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riskini azalttığını göstermiştir (Caoa ve ark 2010).

Kuersetinin sahip olduğu tüm özellikler, yapısındaki üç aktif kimyasal grubun varlığından kaynaklanır. Bu gruplar B halkasındaki o- OH (katekol) yapısı, 4-oxo fonksiyonu ile konjugasyondaki 2,3 çift bağ ve her iki 3- ve 5-OH gruplarıdır (Kocabaş 2008).

Antimutajenik ve antikanserojen etkileri nedeniyle kuersetin, birkaç kanser modelinde kimyasal önleyici ajan olarak çalışılmıştır (Morand ve ark 1998). Kuersetin serbest radikalleri yakalamada rol oynayabilmekte, iki değerlikli katyonların şelasyonunu engelleyebilmekte, bazı enzimleri inhibe edebilmekte ve DNA hasarına karşı koruyucu olabilmektedir Bu nedenle, kuersetin çeşitli hastalıkların önlenmesi için etkili bir zayıflatma faktörü olarak kabul edilebilir (Mi ve ark 2009).

Reaktif oksijen türlerini yakalama özelliğiyle de kuersetinin yararlı etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Caoa ve ark 2010). Ayrıca kötü kolesterolün okside olmasını önleyebilir, hücrelerin kansere dönüşmesini geciktirebilir, kolesterolü düşürüp kalp ve akciğer hastalıkları engelleyebilir ve akciğerleri koruyabilir şeklinde

düşünülmektedir. Kuersetin, antihistaminik etkisinden ötürü alerji ve astım tedavisi için genellikle tavsiye edilmektedir **(**Silva ve ark 2008**).**

Meme kanseri hücreleri, içerdikleri hormon reseptörleri aracılığı ile östrojene duyarlı olabilir. Kuersetin, serbest radikal yakalayıcısı olarak hareket etme özellikleriyle, DNA hasarlarını önleyerek östrojen agonisti ya da antagonisti olarak davranırlar. Yapılan çalışmalara göre besinlerde bulunan östrojenik flavonoidlerden olan kuersetin, meme kanserinin doza bağlı olarak ilerlemesini etkileyebilir. Buna göre kuersetin, östrojen reseptörü pozitif insan meme kanseri hücresi (MCF–7) üzerine etkisi bifaziktir (Maggiolini ve ark 2001).

Diyet açısından kuersetin değerlendirilecek olursa kuersetinden zengin elma ekstrelerinin, in vitro olarak tümör hücre çoğalmasını baskıladığı söylenmektedir. Kabuklu 50 mg elma (yaş) tümör hücresi çoğalmasını %42, kabuksuz 50 mg elma (yaş) tümör hücresi çoğalmasını ise %23 oranında baskılayabilmektedir (Liu 2003).

Antioksidan aktivitesi dışında, kuersetinin C ve E vitaminleri gibi etkili antioksidanlar olabileceği, apoptosizin indüklenmesi gibi çeşitli aktivitelerinin olduğu söylenmektedir (Kocabaş 2008). Kuersetinin, hidroksil, peroksil radikalleri ve süperoksit anyonuna karşı diğer flavonoidlere kıyasla en yüksek seviyede antiradikal etki gösterdiği vurgulanmaktadır (Kocabaş 2008).

1.8. Kanser Hücrelerinin Enerji Metabolizması

ATP, ADP, AMP ve nükleozid türevi adenozin gibi nükleotidler, tüm hayvan organ sistemlerinde bulunan, hücre içi ve hücre dışı mekanizmalarda rolü olan moleküllerdir (Frasson ve ark 2012). Hücre dışında, ATP ve adenozinin, merkezi sinir sistemi de dahil olmak üzere tüm vücutta yer alır, spesifik hücre yüzey purinerjik ve adenosin reseptörleri aracılığı ile sinaptik etkinliği modüle etme rolü vardır (Bhatt ve ark 2012). Ekstraselüler ATP, plazma membranında purinoseptörlere bağlanır ve hücre içi sinyal kaskadları başlatır (Graff RD ve ark 2000). Ekstrasellüler nükleotidler ve nükleosidler çeşitli biyolojik ve patolojik süreçlerde yer alır (Bhatt ve ark 2012) ve bunların etkileri bir dizi selektif purinerjik tip 1 ve tip 2 reseptörleri (Burnstock 2007) aracılığıyla yönlendirilir (Frasson ve ark 2012). Adenin nükleotidleri, nükleik asit biyosentezinden sorumludur ve birçok çeşitli sinyal iletim

yollarında metabolik reaksiyonların aktivasyonu için gerekli enzimlerin allosterik düzenleyicileridir ve kofaktörler gibi davranırlar **(**Bhatt ve ark 2012). DNA ve RNA için yapı taşları olarak görev yaparlar. Yükseltgenmiş ve indirgenmiş piridin nükleotidlerin yanı sıra, hücresel adenin nükleotidleri (ATP, ADP, AMP) hücre içi redoks tepkimelerini ve enerji düzeyini (enerji transferini) düzenler. Buna ek olarak fosfat vericileri olarak görev yaparlar. Piridin nükleotidleri hücresel savunma sisteminde önemli rol oynamaktadır ve sinyal indükleyicileri olarak çalışır. Okside piridin nükleotidleri düzenleyici yolaklarda önemli unsurlardır (Bornhorst ve ark 2012).

Bir hücre veya dokunun enerjik durumunu tanımlamak için adenilat enerji şarjı (AEC) tabiri kullanılmaktadır. AEC hesaplaması bu formüle göre yapılmaktadır [ATP + (0,5 x ADP)]/(AMP + ADP + ATP)]. Ancak, in vitro hücre kültürü modellerinde mevcut metodoloji kullanılırken, doğrudan ADP, AMP ve adenozin düzeylerini ölçmek için bu hesabın yeterli tekrarlanabilirliği sağlamadığı düşünülmektedir (Bhatt ve ark 2012).

Yeryüzündeki tüm organizmalar enerji kaynağı olarak glikolizden yararlanırlar. Atmosferik oksijenin artması ile hücreler enerji üretmek için oksidatif fosforilasyon yapar ve böylece glikolitik yolda metabolit başına daha fazla ATP üretilir. Aslında, glikoliz ve oksidatif fosforilasyon, moleküler ara çevirim sisteminde beraber hareket ederler. Glikoliz, sitoplâzmada gerçekleşir ve sadece iki mol ATP üretilir. Glikolizin son ürünü piruvat, oksidatif fosforilasyon için bir yakıttır. Aerobik koşullarda pirüvat, mitokondriye asetil CoA'yı okside etmek için girer ve oksaloasetat birleşerek oksidatif fosforilasyonu başlatır ve 36 ATP üretilir. Anaerobik koşullar altında, sitoplâzmada piruvat, laktat dehidrojenaz ile laktata indirgenir. Sonra laktat, monokarboksilat taşıyıcıları ile hücre dışına atılır.

Enerji üretimi hücrede enerji talebinin bir yanıtı olduğundan, ATP verimi hücresel koşullara ve hücre çevresine bağlı olarak değişir. Memeli hücreleri ATP üretmek için hem glikoliz hem de oksidatif fosforilasyon'dan yararlanır. Normal koşullarda, hücre metabolizması oksidatif fosforilasyon'dan sağladığı enerjinin %70'ini tüketir. Eğer oksidatif fosforilasyon fonksiyonu normal olursa, bu enerji dengesini korumak için farklı yollar aracılığıyla glikolitik aktivite düzenlenir.

Normal hücrelerin tersine, çoğu kanser hücreleri normoksi veya hipokside enerji üretim aracı olarak aerobik glikolizi kullanır (Koppenol ve ark 2011).

Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı bir enerji metabolizmasına sahiptir ve aerobik glikoliz için yüksek oranda glukoz ve glutamin tüketirler. Bununla beraber kanser, son derece heterojendir ve her bir kanser dokusu, hedef doku ve metabolik fenotipi yönünden farklılık göstermektedir. Kanser hücreleri, çevrelerindeki değişikliklere uyum sağlamak için metabolik fenotipini değiştirebilir. Tüm kanser hücreleri, farklılaşmaları nedeniyle öncelikle enerji için glikolizden yararlanmazlar. Zaten buradan toplamda %1-64 oranında ATP üretilir (Zu ve Guppy 2004). Örneğin, Suganuma ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada, dört lösemi hücre hattında enerji metabolizması için glikoliz inhibitörü 2-deoksi-D-glukoz (2-DG) ve oksidatif fosforilasyon inhibitörü kullanılmış ve NB4 hücrelerinin diğer üç hücre hattına göre 2-DG'e daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Dolayısıyla NB4 bir glikolitik lösemi hücre hattı olarak kabul edilmiştir. THP-1 hücreleri de 2-DG'e daha dirençli ve oligomisine duyarlı olduğundan, bir oksidatif fosforilasyon lösemi hücre hattı olarak kabul edilmiştir. Bu sonuçlar çeşitli kanserlerde enerji metabolik yollarının farklı olduğunu göstermektedir (Zheng 2012).

Toplam ATP üretimi için glikolitik katkı genellikle %50-60'ı (Zu ve Guppy 2004) aşmaz. Oksidatif fosforilasyon hala önemli ölçüde tümör hücrelerinde ATP üretimine katkıda bulunur. Dört insan malign tümör hücre hattı (HL60, HeLa, 143bve U937) hücre büyümesinde oksidatif fosforilasyondan destek almasına rağmen, bu fenotip hipoksi altında değişir. Örneğin, toplam ATP üretimi için oksidatif fosforilasyonun serviks kanseri HeLa hücreleri ve meme kanseri MCF-7 hücrelerine katkısı normalde, sırasıyla %79-91'dir. Bu katkı, hipokside %29 ve %36'ya düşer. Glikolitik fenotip, kanser hücrelerinde hipoksi sebebiyle olur. Moreno-Sánchez ve ark. glikoliz kanser enerji metabolizmasında önemli bir rol oynamasına rağmen, kanser hücrelerinin enerji üretimi için önemli bir miktarda oksidatif fosforilasyonu kullandığını söylemektedir. Bazı durumlarda, kanser hücrelerinde oksidatif fosforilasyon fonksiyonu komşu stromal hücrelerden bile daha yüksektir. Singapurlu araştırmacılar, son zamanlarda, insan over ve periton kanseri dokularından mitokondriyi tüm olarak izole edip, süksinat, malat ve glutamin dehidrogenazların spesifik aktivitesini ve oksidatif fosforilasyon kapasitesini

araştırdılar. Hücrelerin ATP ürettiğini, ancak insan iskelet kasından daha düşük miktarlarda bu üretimin gerçekleştiğini görüldü **(** Zheng 2012).

Kanser hücreleri daha çabuk büyüyüp çoğaldığı için aerobik glikolizi tercih etmektedir. Kanser hücrelerinin çoğalması normal hücrelere göre daha hızlı olduğundan dolayı, sadece enerji ihtiyacı için değil, aynı zamanda metabolik faaliyetlerde TCA döngüsü, nükleik asitler, proteinler ve yağlar gibi makro moleküllerin biyosentezi için de glikolizi kullanır **(**Zheng 2012).

Çoğu kanser hücresi enerji yakıtı olarak glukozu kullansa bile bazısı glutamin de kullanabilir. Glutaminolizis enerji üretimi için bazı kanser hücrelerinde alternatif bir yoldur. 1979 yılında, Reitzer ve arkadaşları, glutaminin, HeLa hücreleri (Reitzer 1979) için önemli bir enerji kaynağı olduğunu rapor etmişlerdir. O zamandan beri, çeşitli raporlar glutamini kanser hücreleri (Guppy ve ark 2002) için enerji yakıt olarak kullanılabileceği göstermiştir. Glikozun yanısıra, bir enerji yakıtı olarak kabul edilen glutamin, glikoz yetersizliğini telafi etmek için yalnızca birkaç kanser hücre hattında (Sandulache ve ark 2011) kullanılmaktadır. Glutamin, membran transport ASCT2 aracılığıyla hücrelere girdikten sonra, glutaminazla glutamat ve amonyağa hidrolize olur. Oluşan glutamat tüm insan hücrelerinde bulunan indirgenmiş glutatyon (GSH) haldedir. Glutamat da α-ketoglutarat dönüştürülebilir (α-KG) ve bu TCA döngüsü girer. Bu işlem, izositrat eksikliğinde pasif TCA için yakıt sağlar. Glutamin, sadece belirli kanser hücrelerinde enerji sağlamaz, aynı zamanda lipid sentezi için sitrat gibi prekürsörleri de sağlar. Bu glutamin tüketiminin yükselmesi, kanser hücrelerinde Myc aktivasyonu ile yakından ilgilidir. Bazı kanıtlar, tümörogenezdeki birçok onkogen ve tümör baskılayıcılarındaki değişiklikler kanserin aerobik glikolizinde önemli bir rol oynadığını söylemektedir **(**Zheng 2012).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- Hesperetin: Sigma-Aldrich H4125-10g (min % 95 HPLC)
- Kuersetin dihidrat: Calbiochem 551600-100mg
- DMSO: Dimetil Sülfoksit Sigma-Aldrich D2650-100ml
- ATP: Sigma-Aldrich A7699-1g
- ADP: Sigma-Aldrich A2754-100mg
- AMP: Sigma-Aldrich A1752-5g
- KH_2PO_4: Merck A0047373 923
- KOH: Merck B0201933 811
- KCl: Sigma-Aldrich 12636-1Kg
- Sodyum Sitrat: Sigma-Aldrich W302600-1Kg
- Na_2CO_3: Sigma-Aldrich S7795-500g
- $CuSO_4 . 5\ H_2O$: Merck A897690 739
- Folinciocalteu's fenol: Merck HC140610
- NaOH: Sigma-Aldrich S8045-500g
- BSA (Bovin Serum Albumin): Sigma-Aldrich A2153-10g
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) : Biological Industries Kibutz Haemek Israel cat no:01-1A
- Penisilin-Streptomisin: Penicillin-Strptomycin Solution 10,000 units/ml Penicil (BIO-IND,BI03-031-1C) (20 ml)
- Glutamin-L-glutamin Solution, 29.2 mg/ml in Saline) (200 mmol)(BIO. IND,BI03-020-1B) (100 ml)

- Fetal Bovin Serum (FBS): Foetal Bovine Serum (FBS) European Grade Heat Inactivated (BIO-IND,BI04-127-1B) (100ml)

- Phosphate Buffered Saline (PBS): Biological Industries Kibutz Haemek Israel Cat No:02-1A

- Tripsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with Phenol (BIO. IND,BI03-053-1B) (100 ml)

2.1.2. Cihazlar ve Laboratuar gereçleri

- CO_2 inkübatörü: SANYO O2/CO2 INCUBATOR MCO-175M

- Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact

- Santrifüj: Sigma 3K30

- Işık mikroskobu: Leica Dmil Led (inverted microscope)

- Buzdolabı (+4 ˚C ve -20˚C): ALTUS AL 302

- -40˚C buzdolabı: SANYO MDF-U425

- -80˚C buzdolabı: SANYO MDF-U5186S

- Azot tankı: LS 750 Las Systems Taylor-Wharton

- xCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Cihazı: Roche Diagnostics GmbH, Penzbeerg, Germany

- E-PLATE 16: ACEA Biosciences, Inc. cat no: 05469813001

- Sıcak su banyosu: WiseBath fuzzy systems

- Thoma lamı: IsoLab, Tiefe depth profendeur 0,200mm

- Steril filtre: 0,45µm Lot No: N0403113103

- Flask: TC Flask, 75 cm^2, Canted Neck, Anti-Tip, Plug Seal, Sterile (CORNING,CC430720)

- Falcon tüp: 352098 Blue max™ 50ml polypropylene conical tube 30x115mm style
- Kriyo tüp: REF: Cl2ARBIPS
- Serolojik pipet: Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, bulk packed (5 ve 10 ml)
- Mikropipet (1000, 200, 10µl) : Gilson
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography): Agilent 1200
- Spektrofotometre: Perkin Emler Lambda 25 UV/Vis Spectrometer
- Kolon: Vertical VertiSep™ GES C18 HPLC column, 4,6x150 mm, 5 µm

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürü

Kuersetin ve hesperetinin meme kanseri hücresi proliferasyonundaki etkilerinin gözlemlenmesi açısından insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri, 1970 yılında 69 yaşındaki Kafkas bir beyaz kadın memesinden izole edilmiş meme kanseri hücre hattıdır. MCF-7 hücreleri epitelyal, östrojen reseptörü pozitif ve invaziftir. MCF-7 hücre serisi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Abdulkerim Bedir tarafından hediye edilmiştir.

MCF–7 hücreleri nemlendirilmiş, %5 CO_2 içeren ve 37˚C'lik atmosferde, %10 FBS ve %1 PSG içeren DMEM besi yerinde kültüre edilmiştir.

Hücrelerin pasajlanması 5-6 günde bir olacak şekilde, tripsin-edta ile kaldırılması ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 75 cm^2'lik flasklarda besi yerine alınması şeklinde yapılmıştır.

Hücre stoklanması ise tripsinle muamele edilen hücrelerin, santrifüjden sonra besi yerinin uzaklaştırılması, %10 DMSO ve %90 FBS içeren solüsyonla karıştırılması ve 1,5 ml'lik kriyo tüplerle -20˚C'ye alınması şeklinde

gerçekleştirilmiştir. Hücreler, -20˚C'de 1 gece bekledikten sonra -80˚C'ye alınmıştır. Bu şekilde depolanan hücreler gerektiğinde hızlıca 37˚C'de çözülüp, üzerine 3 ml besi yeri ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Süpernatan atılıp, hücre pelleti tekrar 1 ml besi yerinde çözülerek, Petri kabında taze besi yeriyle pasajlanmıştır. Pasajlanan hücreler, %70-80 konflüent olduğunda tekrar pasajlamak ya da deney kurmak için tripsinize edilip kaldırılmış ve hücre sayımı yapılmıştır.

Hücre sayımı için, tripsinle muamele edilen hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj olduktan sonra kalan hücre pelleti, 1-2 ml besi yerine alındı. Karıştırılarak 10'ar µl Thoma lamının alt ve üst kısımlarına aktarılmış, Thoma lamının alt ve üst hanelerinde bulunan 16 küçük karede hücre sayımı yapılmış ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

2.2.2. Toksisite Değerlendirme Metotları ve Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi

Hücre canlılığının ölçümü için birçok metot vardır. Bunlardan en yaygın olanları MTT, XTT ve WST metotlarıdır.

MTT (3-(4,5-Dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid), hücre enzimlerinin aktivitesini ölçmek için bir kolorimetrik tayindir. Bu metotta tetrazolyum boyası indirgenir ve mor renkli çözünmeyen formazan bileşiklerine dönüşür. Daha sonra çözünmeyen mor formazan ürününü çözmek için (dimetil sülfoksid, asitlendirilmiş bir etil alkol çözeltisi ya da seyreltilmiş hidroklorik asit içinde deterjan sodyum dodesil sülfat çözeltisi) çözücü eklenir. Bu renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometrede 500-600 nm'de ölçülür. Maksimum absorbans çözücünün bileşiği çözme kapasitesine bağlı olarak değişir.

XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid) de MTT'de olduğu gibi hücre enzimlerinin aktivitesini ölçmek için kullanılan kolorimetrik bir metottur. Ancak MTT'ye göre daha yüksek bir hassasiyetle çalışılan analiz metodu olarak değerlendirilmektedir. Oluşan formazan bileşikleri suda çözünebilirdir. Ayrıca bir çözücüye gerek yoktur.

Bir diğer metot ise MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofeni)-2H-tetrazolyum), fenazin methosulfate (PMS)

varlığında bir formazan üretir ve fosfat tamponu içinde 490-500 nm'de maksimum absorbans ölçümü yapar. MTS genellikle tek adım MTT olarak anılır. Çünkü MTT'deki adımlara gerek kalmadan reaktif ekleme yapılır. Fakat MTS metodunda absorbans okuma sırasında renk girişimleri olabilir.

WST ise suda çözünür formazan boyalarını içerir. Oluşan formazanlar farklı absorbsiyon yapma kabiliyetindedir. WST-1 ve özellikle WST-8 (2 - (2-metoksi-4-nitrofenil) -3 - (4-nitrofenil) -5 - (2,4-disülfofenil)-2H-tetrazoyium) MTT'ye göre fazla avantajlıdır. Son olarak, WST analizi MTT'ye göre daha etkili bir sinyal verir, hücrelerde daha az için toksik etki yaratır ve doğrudan ölçülebilir.

xCELLigence® (Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemi) sistem, hücre mönitörizasyonunun belirlenmesi için hassas, kantitatif, dinamik ve eş zamanlı çalışan bir sistemdir. Böylece diğer metotlara göre pek çok manipülasyon azaltılmış ve anlık veri alınabilen bu sistemde bileşik ya da renk girişimine sebep verebilecek şeylerden kaçınılmıştır. Elektrik empedans okuma yoluyla eş zamanlı olarak hücre canlılığı ölçümüne izin verir. Sistem; elektronik sensör analizörü, cihaz ve 16 ya da 96'lık e-platelerden (şekil 2.1) olmak üzere üç bileşeni kapsar.



Şekil 2.1. Elektronik sensör analizörü, cihaz ve E-plate 16
(http://www.aceabio.com/productlist2)

Plateler, kuyu tabanlarına gömülmüş uygun geometriye sahip mikro elektrotlardan oluşur. Bunun tersine diğer empedans sensörleri kuyunun yüzey alanının %80'ini kaplar. Bu sistem hücre sensör elektrot merkezli olarak geliştirilmiştir. İnkübatör içinde bulunan cihaza plateler yerleştirilir ve software kontrolü altında, sensör analizörü ölçüm için kuyuları otomatik olarak seçer. Bu sistem e-platelerdeki hücrelerin bulunduğu kuyuların altında, birleşik haldeki mikro

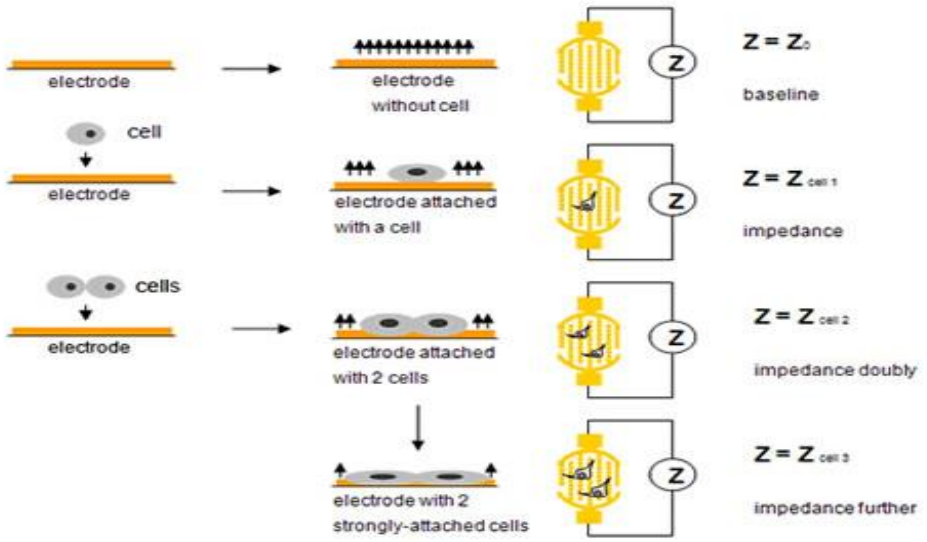
elektrotlar üzerindeki elektrik empedansını ölçer (şekil 2.2). Önce e-plateteki kuyular boşken sistemden geçen elektrik akımı, boş hücrenin empedansına eşit olur. Hücreler elektrotlara yerleşmeye başladığından itibaren ise sistemden geçen akım hücrelerin elektrik empedansına eşit olur. Sürekli olarak empedans ölçümü yapar. Empedans verisi bilgisayara gönderilir ve software tarafından analiz edilir.

$$CI = \max_{i=1\ldots N} \left(\frac{R(\text{hücre}(fi))}{Rb(fi)-1} \right)$$

N= empedansı ölçülen frekans noktalarının sayısıdır.

R(hücre)= hücrenin bulunduğu kuyunun hücre elektrot empedansıdır.

Rb = medyumun bulunduğu kuyunun arkaplan empedansıdır.



Şekil 2.2. Hücrelerin elektrik empedansının ölçümü (http://www.roche.com)

2.2.3. Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Hücre Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

Hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi deneyinde önce 100'er µl DMEM, 16 kuyulu e-platelerin (mikroelektrot içeren özel hücre kültürü kapları) her bir kuyusuna koyuldu ve DMEM'in yarım saat kuyulara yerleşmesi beklendi. Ardından hücre sayımı yapıldı ve farklı sayılarda (5 000, 10 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 40 000, 50 000) hücre karışımı hazırlandı. Farklı sayılardaki MCF-7 hücreleri, önceden

içine DMEM koyduğumuz kuyulara 100'er µl olacak şekilde eklendi. Hücrelerin besi yeri 72. saatte değiştirildi. Hücre sayısındaki değişiklikler, e-platelerde 196 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi. Buradan MCF–7 hücrelerinin prolife olduğu ideal hücre sayısını bulup sonraki deneyleri bu sayıyla çalıştık.

2.2.4. Hesperetinin MCF–7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi

Hesperetin, 10^{-3} M olacak şekilde %0,1'lik DMSO'da çözüldü, 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilerek -40˚C'de saklandı. Diğer dozlar hazırlamış olduğumuz bu hesperetinden dilüsyon yapılarak ayarlandı

Hücre büyüme eğrisinin belirlenmesinde yapıldığı gibi, 16 kuyulu e-platelere önce 100'er µl DMEM koyuldu, ardından hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 10 000 hücre olacak şekilde hücre eklendi. MCF–7 hücreleri, belirlenmiş olan hesperetinin doz grupları (10, 50, 100, 125, 150, 175 µM) ile 24 saat sonra muamele edildi ve bu işlem her 24 saatte bir tekrarlandı. Hücre sayısındaki değişiklikler, 168 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi.

2.2.5. Kuersetinin MCF–7 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama Sistemiyle Belirlenmesi

Kuersetin dihidrat, 2. 10^{-2} M olacak şekilde %0,1'lik DMSO'da çözüldü, 0,2 µm çaplı steril filtreden geçirilerek -40˚C'de saklandı. Diğer dozlar hazırlamış olduğumuz bu kuersetinden dilüsyon yapılarak ayarlandı.

Önce 16 kuyulu e-platelere 100'er µl DMEM koyuldu, ardından hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 10 000 hücre olacak şekilde hücre eklendi. MCF–7 hücreleri, belirlenmiş olan kuersetinin doz grupları (125, 150, 175, 200, 225, 250 µM) ile 48 saat sonra muamele edildi ve bu işlem her 48 saatte bir tekrarlandı. Hücre sayısındaki değişiklikler, 216 saat boyunca her 15 dk'da bir inkübatör içindeki xCELLigence® cihazı ile gözlemlendi.

2.2.6. Hücrelerin ATP, ADP ve AMP Ölçümüne Hazırlanması

Kuersetin ve hesperetin verilen hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiklerinden IC_{50} (hücrelerin %50'sini öldüren madde miktarı) değerleri belirlendi. IC_{50} değeri hücrelerin enerji düzeylerinin hesaplanmasında baz alındı. IC_{50} değeri hesperetin için 115 μM, kuersetin için 200 μM olarak hesaplandı.

Daha önce yapılan proliferasyon deneylerine göre inhibisyonun başladığı saatler, hesperetin ve kuersetin için ilk madde uygulamasından sonraki 72. saat itibariyle belirlendi. Buna göre; her grup için 5'er (0, 2, 4, 6 ve 8. saatler) adet 25 cm^2'lik Petri kabına, 100 000 hücre olacak şekilde ekildi. Hesperetin uygulanacak Petri kaplarındaki hücreler her 48 saatte bir 115 μM hesperetin ve kuersetin uygulanacak Petri kaplarındaki hücreler de yine her 48 saatte bir 200 μM kuersetinle muamele edildi. Kontrol grubunun ise sadece DMEM' i değiştirildi. Grupların, ilk maddeleri uygulamadan sonraki 72. saatte besiyeri değiştirildikten sonra, 72. saat 0. saat kabul edilerek, sırasıyla 0. 2. 4. 6. ve 8. saatlerde hücreler tripsinize edildi. Hücreler en son PBS'le yıkandı ve 1 ml filtreden geçirilmiş distile su eklenerek -80˚C'ye kaldırıldı.

Hücrelerin enerji düzeylerini ölçmeden önce ön işlemler yapıldı. -80˚C'den çıkarılan hücreler, sonikatörde 30 dk boyunca parçalandı. Parçalanan hücreler 30 dk santrifüjde çevrildi. Süpernatan alınıp filtreden geçirildi ve numuneler cihaza verilmeye uygun hale gelmiş oldu. Numuneler cihaza vermeden önce hücrelerin protein miktarı analiz edildi.

2.2.7. Hücrelerin Protein Analizi

Hücrelerin enerji düzeylerinin ölçümünden önce protein miktarları analiz edildi. Protein analizi Lowry metoduna göre yapıldı. Buna göre;

- ✓ A reaktifi; 0,5 gr $CuSO_4.5\ H_2O$ ve 1 gr sodyum sitrat 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.
- ✓ B reaktifi; 20 g Na_2CO_3, 0,1 M NaOH içinde çözülerek hazırlandı.
- ✓ C reaktifi; 50 ml B reaktifi içine 1ml A reaktifi eklenerek hazırlandı.

- ✓ Folin reaktifi; 1/1 oranında distile suyla dilüe edilerek hazırlandı.

Protein analizinde standart olarak BSA kullanıldı. BSA'nın stok çözeltisi 24 mg/ml olacak şekilde distile suyla hazırlandı. Diğer standartlar (12- 6- 3- 1,5 mg/ml) da, hazırlanan bu çözeltiden distile suyla seri dilüsyonlar yapılarak hazırlandı. Protein analizi aşağıda gösterile prosedüre göre yapıldı. Numuneler birinci işlemden sonra karıştırılarak 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı; ikinci işlemden sonra karıştırılarak 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından 700 nm'de distile suya karşı spektrofotometre cihazında ölçüldü.

Çizelge 2.1. Protein ölçümünde uygulanan 1. işlem.

	Numune	Kör	Standart
Distile su	490 µl	500 µl	490 µl
Numune	10 µl	-	-
Standart	-	-	10 µl
C reaktifi	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Çizelge 2.2. Protein ölçümünde uygulanan 2. işlem.

	Numune	Kör	Standart
Folin reaktifi	250 µl	250 µl	250 µl

2.2.8. Hücrelerin Enerji Düzeylerinin Ölçülmesi

Mobil faz, içinde 160 mM KH_2PO_4 ve 100 mM KCI içeren solüsyonun pH'sı doygun KOH ile 6,5'a ayarlanarak, 0.45 µm'lik selüloz asetat filtreden süzülüp degaze edilmesiyle hazırlandı.

ATP, ADP, AMP standartları, her birinden 6,5–12,5–25–50–100 µM konsantrasyonlarında hem tek standartlar şeklinde, hem de mix standartlar şeklinde distile suyla hazırlandı.

Ölçüme geçmeden önce HPLC cihazı ATP-ADP-AMP çalışma koşullarına ayarlandı (Uz 2011).

Çizelge 2.3. ATP-ADP-AMP çalışması için HPLC sistemine ait çalışma koşulları ve sistem parametreleri

Çalışma Koşulları	**Sistem Parametreleri**
HPLC modeli	AGILENT 1200
Dedektör	Diode Array Dedektör
Mobil faz	pH'sı 6,5 olan içinde 160 mM KH_2PO_4-100mM KCl içeren çözelti
Analitik kolon	GES C18 HPLC column, 4,6x150 mm, 5 µm
Dalga boyu	254,4 nm
Akım hızı	1ml/dk
Numune hacmi	70µL
Çalışma süresi	13 dk
Ayırım	Ters faz iyon değişimi

6,5–12,5–25–50–100 µM konsantrasyonlarda hazırlanan ATP, ADP ve AMP standartları HPLC sistemine verildikten sonra, piklerin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptandı. Standart çalışmalardan elde edilen pik alanları esas alınarak, ATP, ADP ve AMP standart eğrileri çizildi. Elde edilen standart değerlere göre, numunelerden elde edilen pik alanlarından ATP, ADP ve AMP konsantrasyonları hesaplandı. Önceden hazırlanan hücreler de standartların ardından cihaza verildi ve standartlara göre numunelerin pik alanları değerlendirildi.

2.3. İstatistik Analizleri

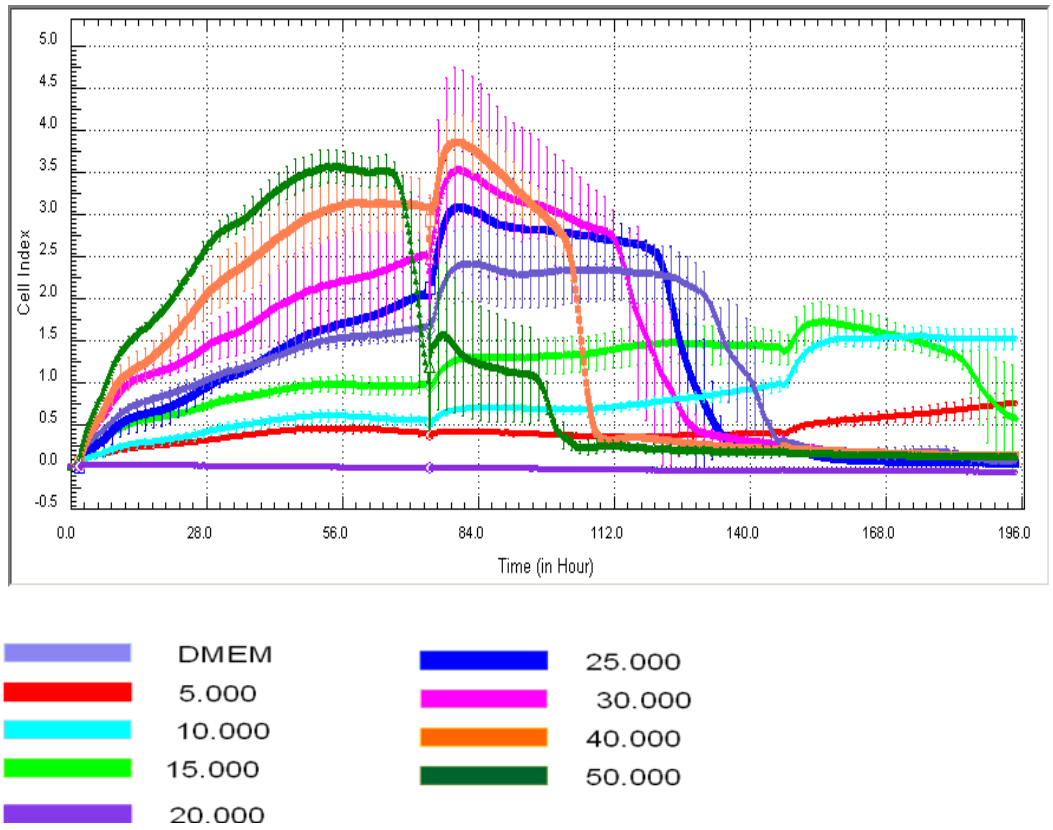
Hem hesperetin hem de kuersetin için elde edilen veriler, önce normal dağılım açısından incelenmiş ve normal dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun üzerine, doz grupları arasında ve zamanlar arasındaki farkların etkileşimli olarak incelenmesi için tekrarlı ölçümlerde varyans analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda doz grupları ile zaman arasında etkileşim önemli ($P = 0.000$) çıktığından sonraki analizler, her zamanda gruplar arası fark ayrı ayrı tek yönlü varyans analizi ve Duncan testi ile her gruptaki zamanlar arası fark da yine ayrı ayrı eşleştirilmiş t testi ile analiz edilmiştir. İstatistik analizler SPSS 20.0 paket programında yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Çalışılacak Hücre Sayısının Optimizasyonu

Şekil 3.1.'de, 5 000, 10 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 40 000, 50 000 gibi farklı sayılardaki MCF–7 hücrelerinin büyüme eğrileri görülmektedir. Hücrelerin besi yeri 72. saatte değiştirilmiştir. Grafikteki ani çıkış ve inişler hücrelerin besi yerinin değiştirilmesinden kaynaklanmaktadır.

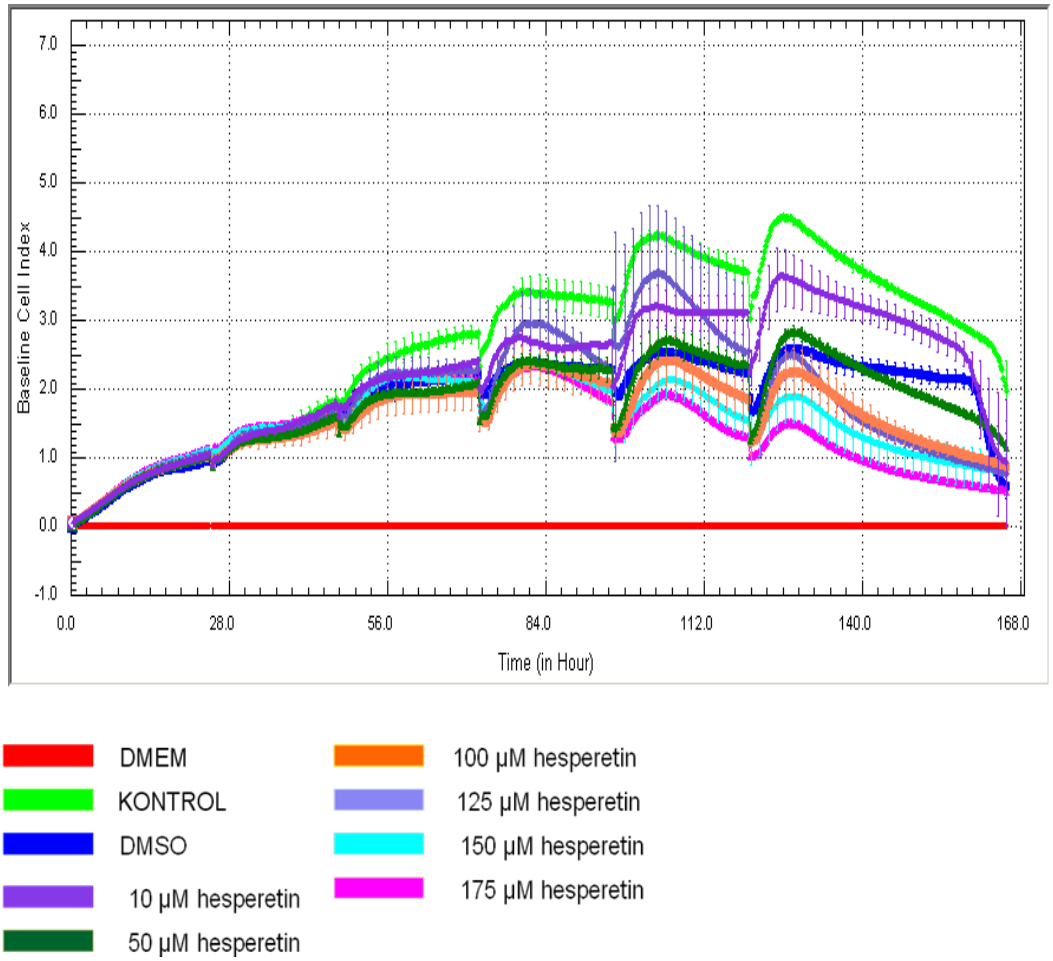
Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi 30 000 ve üstü sayıdaki hücrelerin, diğer sayıdaki hücrelere göre daha erken bir zaman diliminde ölmeye başladığı gözlemlendi. MCF–7 hücrelerinin proliferasyonunun devam ettiği hücre sayıları 10 000 ve 15 000 olarak tespit edildi. Yine uygulanacak maddelerin etkili olduğu doz aralığı tespit edilirken uygulanan maddelerin etkilerinin geç ortaya çıkması nedeniyle çalışmalar 10 000 hücre sayısıyla gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Farklı sayılardaki MCF–7 hücrelerinin 196 saatlik büyüme eğrileri

3.2. Hesperetinin MCF–7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Hesperetinin MCF–7 hücre büyümesine doz ve zaman bağımlı etkisi, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle analiz edildi. Hesperetinin 10, 50, 100, 125, 150, 175 µM konsantrasyonlarında hücre büyüme oranları, 168 saat boyunca izlendi. Şekil 3.2'de de anlaşıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hesperetinin, hücreleri doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği görüldü.



Şekil 3.2. Hesperetinin MCF-7 hücrelerine 168 saat boyunca etkisi

Hesperetinin MCF-7 hücrelerine etkisine ait istatistiksel sonuçlar; farklı zamanlarda dozlar arası karşılaştırması Çizelge 3.1'de, doz gruplarının zaman karşılaştırması ise Çizelge 3.2'de verilmiştir. Çizelge 3.1 incelendiğinde, ilk 48 ve 72. saatlerde, doz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır

(P>0,05). Doz grupları arasındaki fark, 96. saatte başlamak üzere giderek artan düzeylerde (P<0,05; P<0,001), sonraki zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 96. saatte doz grupları arasındaki farka bakıldığında, en yüksek değeri 2,90 ile kontrol grubu, en düşük değeri 1,54 ile 175 µM doz grubu göstermişlerdir. DMSO ve 10 µM grupları kontrol grubuna benzerken, diğer doz grupları kontrolden farklı bulunmuştur. Ayrıca, 175, 150, 125, 100 ve 50 µM doz grupları birbirine benzer bulunmuştur. Sonraki zaman dilimlerinde, istatistiksel anlamlılık yönünden benzer durum görülse de, zaman faktörü ile doz faktörü etkileşiminden dolayı, doz grupları arasındaki farklılıkların derecesi zamandan zamana değişmiştir.

Çizelge 3.2 incelendiğinde, her doz grubunun zamanlar arası değişiminin birbirinden farklı olduğu anlaşılmaktadır. Örneğin; s48-s72 karşılaştırılmasında "kontrol grubu da dahil" tüm doz gruplarında zamanlar arası fark anlamlı bulunmuştur. s48-s96 karşılaştırmasında 175 µM, s48-s120 karşılaştırmasında 125 ve 150 µM, s48-s144 karşılaştırmasında 100 µM ve s48-s168 karşılaştırmasında da 10, 50 µM ve kontrol gruplarında zamanlar arası fark anlamsız olup, diğer doz gruplarında fark anlamlıdır. Diğer zaman karşılaştırmalarında da benzer şekilde bazı doz gruplarında zamanlar arası fark önemliyken bazısında anlamsız olarak bulunmuştur.

Hesperetin ilk uygulamadan sonra 72. saate kadar, MCF–7 hücrelerinin proliferasyonunu etkilememiş olsa da, inhibitör etkisini 72. saatten sonra göstermeye başlamıştır. 150 µM hesperetin 72. saatten sonra, MCF–7 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık %42 oranında engellerken, 96. saatte %72,3 oranında engellemiştir. Yine 175 µM hesperetin 72. saatten sonra, MCF–7 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık %48,8 oranında engellerken (p=0,026), 96. saatte %80,8 oranında engellemiştir (p=0,000). Sonuçlara göre; hesperetin MCF-7 hücrelerini doz ve zaman bağımlı olarak inhibe etmiştir. Bunun yanında en düşük konsantrasyonlardaki 10 µM hesperetin uygulamasıyla anlamlı olarak inhibitör etki gözlemlenmemiştir.

Çizelge 3.1. Hesperetin doz gruplarının farklı zamanlarda karşılaştırılması.

	Zamanlar											
	48. Saat		72. Saat		96. Saat		120. Saat		144. Saat		168. Saat	
Doz grupları	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
175 µM	1.40	0.321	1.81	0.501	1.54^{b}	0.429	1.10^{d}	0.262	0.56^{f}	0.146	0.39^{c}	0.096
150 µM	1.36	0.292	1.81	0.451	1.69^{b}	0.428	1.32^{cd}	0.354	0.82^{ef}	0.304	0.61^{bc}	0.276
125 µM	1.44	0.309	1.97	0.475	1.99^{b}	0.443	2.15^{bc}	1.014	0.98^{e}	0.144	0.65^{bc}	0.057
100 µM	1.28	0.309	1.71	0.431	1.81^{b}	0.444	1.65^{cd}	0.371	1.08^{e}	0.134	0.77^{bc}	0.057
50 µM	1.27	0.334	1.76	0.491	1.96^{b}	0.522	2.04^{bc}	0.470	1.69^{d}	0.216	1.12^{b}	0.189
10 µM	1.47	0.415	2.03	0.564	2.30^{ab}	0.580	2.68^{ab}	0.679	2.54^{b}	0.424	1.02^{b}	0.852
DMSO	1.56	0.230	2.14	0.210	2.21^{ab}	0.048	2.15^{bc}	0.113	2.11^{c}	0.142	0.50^{bc}	0.193
Kontrol	1.59	0.275	2.43	0.516	2.90^{a}	0.521	3.31^{a}	0.550	2.93^{a}	0.301	1.99^{a}	0.377
P	0.843		0.543		0.026		0.001		0.000		0.000	

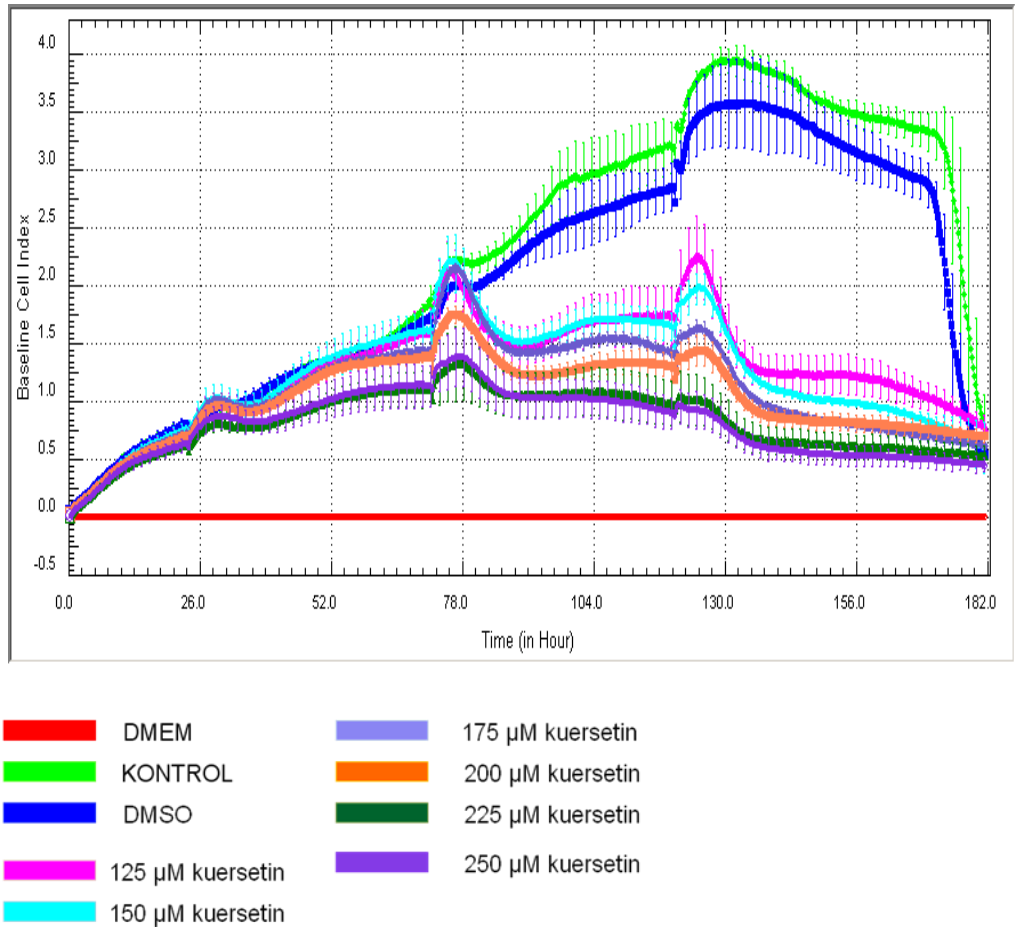
a, b, c: Her sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası fark anlamlıdır (P<0,05).

Çizelge 3.2. Hesperetinin her doz grubunda zamanlar arası karşılaştırılması.

	Doz grupları							
	175 µM	150 µM	125 µM	100 µM	50 µM	10 µM	DMSO	Kontroll
Zamanlar	P	P	P	P	P	P	P	P
s48 - s72	0.020	0.012	0.008	0.006	0.009	0.006	0.001	0.026
s48 - s96	0.094	0.028	0.008	0.006	0.009	0.004	0.025	0.011
s48 - s120	0.002	0.661	0.222	0.007	0.003	0.008	0.022	0.009
s48 - s144	0.002	0.015	0.011	0.133	0.010	0.003	0.030	0.001
s48 - s168	0.003	0.008	0.008	0.029	0.549	0.450	0.004	0.311
s72 - s96	0.010	0.064	0.808	0.069	0.050	0.006	0.509	0.008
s72 - s120	0.010	0.012	0.721	0.367	0.013	0.020	0.943	0.001
s72 - s144	0.006	0.007	0.009	0.027	0.690	0.036	0.711	0.060
s72 - s168	0.006	0.005	0.008	0.016	0.127	0.186	0.001	0.412
s96 - s120	0.013	0.006	0.762	0.040	0.075	0.036	0.278	0.011
s96 - s144	0.006	0.004	0.007	0.019	0.204	0.137	0.250	0.846
s96 - s168	0.006	0.004	0.006	0.013	0.079	0.131	0.003	0.156
s120 - s144	0.003	0.003	0.093	0.018	0.090	0.368	0.215	0.130
s120 - s168	0.003	0.003	0.057	0.012	0.053	0.101	0.001	0.097
s144 - s168	0.007	0.002	0.005	0.004	0.036	0.086	0.001	0.109

3.3. Kuersetinin MCF–7 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Kuersetinin MCF–7 hücre büyümesine doz ve zaman bağımlı etkisi, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle analiz edildi. Kuersetinin 125, 150, 175, 200, 225, 250 µM konsantrasyonlarında hücre proliferasyon oranları 182 saat boyunca izlendi. Şekil 3.3'te anlaşıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kuersetinin, doz ve zaman bağımlı olarak hücreleri inhibe ettiği görülmüştür.



Şekil 3.3. Kuersetinin MCF-7 hücrelerine ilk 182 saat boyunca etkisi

Kuersetinin MCF-7 hücrelerine etkisine ait istatistiksel sonuçlar; farklı zamanlarda dozlar arası karşılaştırması Çizelge 3.3'te, her doz grubunun zaman karşılaştırması ise Çizelge 3.4'te verilmiştir. Çizelge 3.3 incelendiğinde, doz grupları arasındaki fark 48. saatte başlamış ve sonraki zaman dilimlerinde istatistiksel olarak

anlamlı bulunmuştur (P<0,0001). 48. saatte doz grupları arasındaki farka bakıldığında, en yüksek değeri 1,171 ile kontrol grubu, en düşük değeri 0,914 ile 250 µM doz grubu göstermişlerdir. DMSO, 200, 175, 150 ve 125 µM grupları kontrol grubuna benzerken, 225 ve 250 µM doz grupları kontrolden farklı bulunmuştur. Ayrıca, 200, 175, 150 ve 125 µM doz grupları birbirine benzer bulunmuştur. Sonraki zaman dilimlerinde, istatistiksel anlamlılık yönünden benzer durum görülse de, zaman faktörü ile doz faktörü etkileşiminden dolayı, doz grupları arasındaki farklılıkların derecesi zamandan zamana değişmiştir.

Çizelge 3.4 incelendiğinde, her doz grubunun zamanlar arası değişiminin birbirinden farklı olduğu anlaşılmaktadır. Örneğin; s48-s72 karşılaştırılmasında 250 µM hariç, tüm doz gruplarında zamanlar arası fark anlamlı bulunmuştur. s48-s96 ve s48-s120 karşılaştırmasında 175, 125 µM ile DMSO ve kontrol gruplarında zamanlar arası fark anlamlı olup, diğer doz gruplarında fark anlamsızdır. s48-s144 karşılaştırmasında ise tüm doz gruplarında zamanlar arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Diğer zaman karşılaştırmalarında da benzer şekilde bazı doz gruplarında zamanlar arası fark önemliyken bazısında anlamsız olarak bulunmuştur.

Kuersetin ilk uygulamadan sonra 72. saate kadar kuersetin, MCF–7 hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı olarak etkilememiş olsa da, inhibitör etkisini 96. saatten sonra göstermeye başlamıştır. 200 µM kuersetin uygulamasıyla 72. saatten sonra, MCF–7 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık %51 oranında engellerken, 96. saatte %72,3 oranında engellemiştir. 250 µM kuersetin uygulamasıyla 72. saatten sonra, MCF–7 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık %63,4 oranında engellenirken (p=0,000), 96. saatten sonra %88,6 oranında engellenmiştir (p=0,000). Sonuçlara göre; kuersetin MCF-7 hücrelerini doz ve zaman bağımlı olarak inhibe etmiştir. Kuersetinin uygulanan tüm dozlarında MCF-7 hücrelerine inhibitör etki gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.3. Kuersetin doz gruplarının zamanlar arası karşılaştırılması.

	Zamanlar									
	48. Saat		72. Saat		96. Saat		120. Saat		144. Saat	
Doz grupları	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
250 µM	0.914[a]	0.1247	1.144[a]	0.2250	0.861[a]	0.1767	0.721[a]	0.2110	0.332[a]	0.1209
225 µM	0.888[a]	0.0694	1.153[a]	0.2210	0.957[ab]	0.1600	0.906[ab]	0.1899	0.476[ab]	0.0918
200 µM	1.110[b]	0.0721	1.520[a]	0.0649	1.152[abc]	0.0879	1.334[bc]	0.1979	0.682[abc]	0.0835
175 µM	1.191[b]	0.0676	1.790[bc]	0.0358	1.326[bc]	0.0547	1.467[bc]	0.0960	0.672[abc]	0.1076
150 µM	1.250[b]	0.1537	1.934[c]	0.2090	1.454[c]	0.1144	1.721[cd]	0.1466	0.803[bc]	0.0379
125 µM	1.252[b]	0.1315	1.977[c]	0.2840	1.541[c]	0.2470	2.146[d]	0.4670	1.089[c]	0.1705
DMSO	1.241[b]	0.0496	1.715[bc]	0.0115	2.346[d]	0.2230	3.075[e]	0.2880	2.882[d]	0.2240
Kontrol	1.171[b]	0.1769	1.705[bc]	0.4410	2.347[d]	0.6470	3.014[e]	0.7610	2.907[d]	0.6470
P	.000		.000		.000		.000		.000	

a, b, c: Her sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arası fark anlamlıdır (P<0.05).

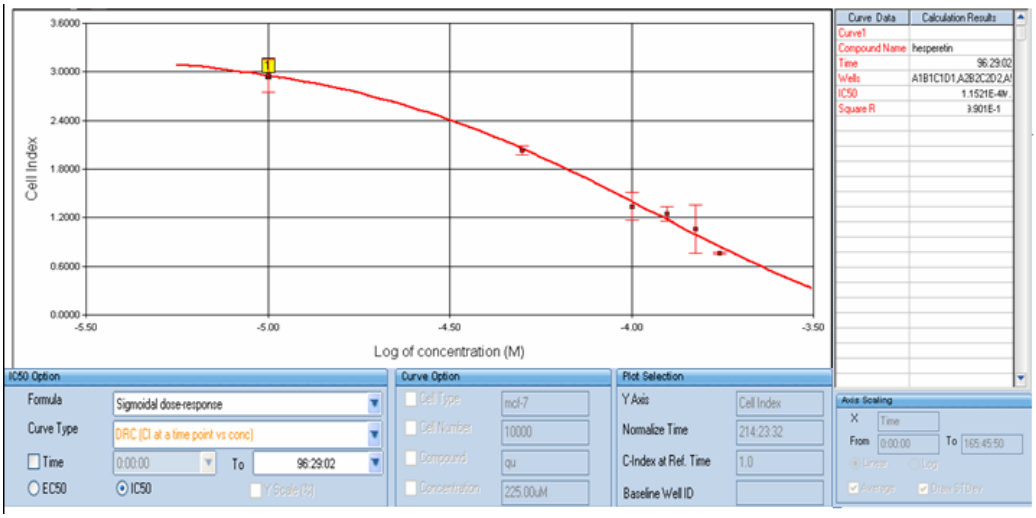
Çizelge 3.4. Kuersetinin her zaman diliminde dozlar arası karşılaştırılması.

	Doz grupları							
	250 µM	225 µM	200 µM	175 µM	150 µM	125µM	DMSO	Kontrol
Zamanlar	P	P	P	P	P	P	P	P
s48 - s72	0.080	0.041	0.003	0.000	0.001	0.003	0.004	0.034
s48 - s96	0.492	0.237	0.527	0.049	0.054	0.028	0.015	0.018
s48 - s120	0.135	0.801	0.142	0.008	0.019	0.015	0.008	0.008
s48 - s144	0.003	0.001	0.005	0.001	0.006	0.012	0.006	0.006
s72 - s96	0.002	0.008	0.001	0.000	0.004	0.002	0.035	0.009
s72 - s120	0.001	0.005	0.103	0.004	0.099	0.211	0.014	0.005
s72 - s144	0.001	0.003	0.000	0.000	0.001	0.001	0.011	0.002
s96 - s120	0.022	0.212	0.049	0.053	0.005	0.012	0.010	0.010
s96 - s144	0.001	0.002	0.000	0.002	0.001	0.003	0.020	0.007
s120 - s144	0.003	0.004	0.002	0.001	0.001	0.006	0.047	0.189

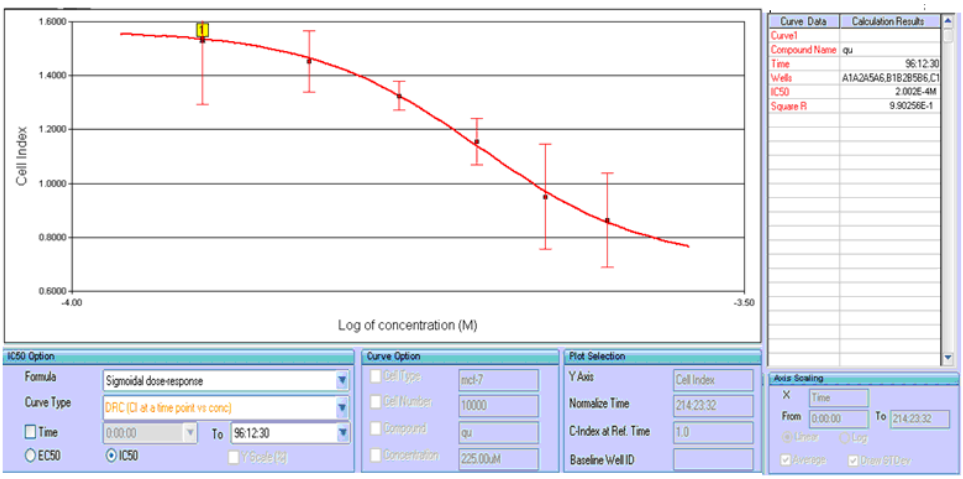
3.4. Hücrelerin IC_{50} Değerlerinin Belirlenmesi

Hesperetin ve kuersetinin doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif etki göstermesine karşın, bu etkinin moleküler etki mekanizması henüz tam anlaşılamamıştır.

Kuersetin ve hesperetin verilen hücrelerin proliferasyon eğrisi grafiklerinden IC_{50} değerleri şekil 3.4 ve şekil 3.5'te görüldüğü üzere hesperetin için 115 µM (r^2=0,99), kuersetin için 200 µM (r^2= 0,99) olarak hesaplanmıştır. Bu değerler cihaz tarafından, kontrol ve DMSO grupları hariç, uygulanan tüm doz gruplarının, 96.saatte logaritmalarının alınması ve bu değerlerle birlikte hücre indeks değerlerine karşı bir grafik çizilmesi şeklinde hesaplanmıştır. Bu grafik çizimlerine göre r^2 değerlerine de bakılarak, her iki flavonoid bileşiği için hücrelerin yarısını öldürmeye yetecek toksik değerler hesaplanmıştır.



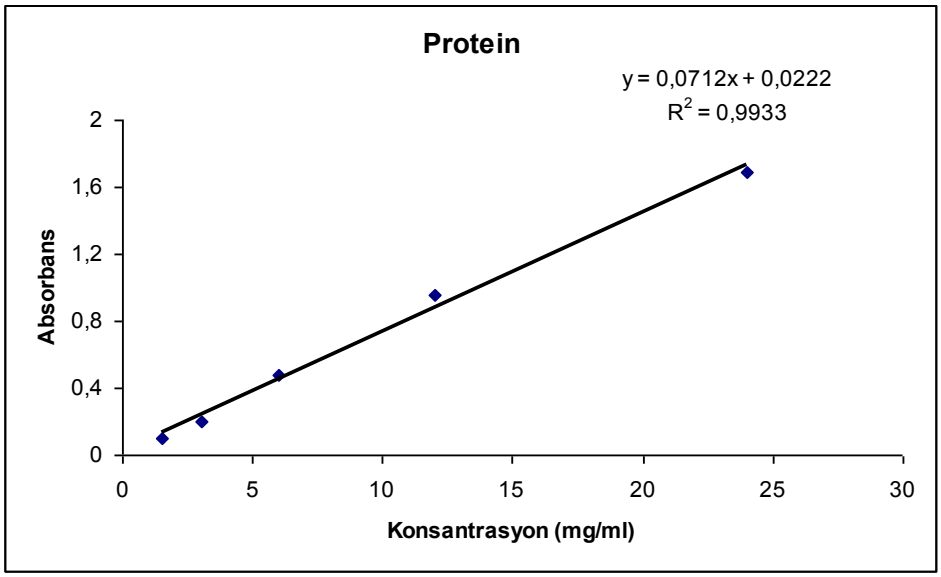
Şekil 3.4. Hesperetin için IC_{50} değerinin belirlenmesi



Şekil 3.5. Kuersetin için IC_{50} değerinin belirlenmesi

3.5. Hücrelerin Protein Analizi Sonuçları

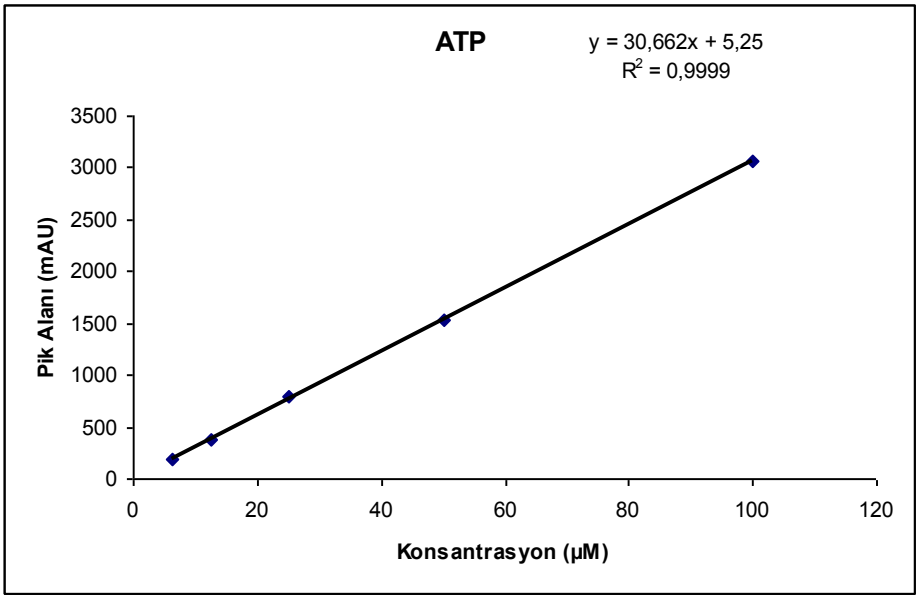
Hücrelerin proteini için farklı konsantrasyondaki standartlar kullanılarak, spektrofotometrede 700 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Protein standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi şekil 3.6.'da gösterilmektedir. Elde edilen bu standart eğriye göre hücrelerin protein miktarları bulunmuştur.



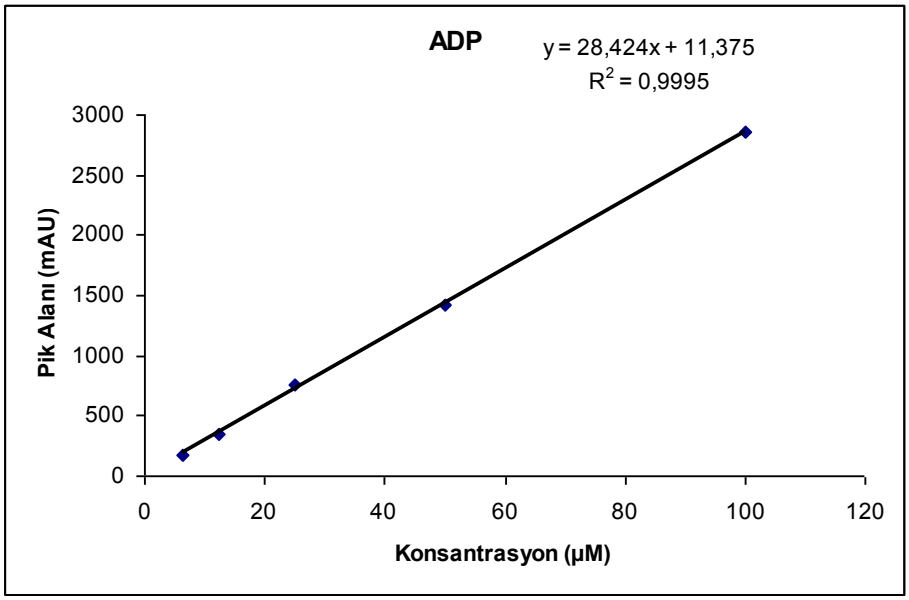
Şekil 3.6. Protein standartlarına ait standart eğri ve doğrusallık denklemi.

3.6. Hücrelerin ATP, ADP, AMP Ölçümü Sonuçları

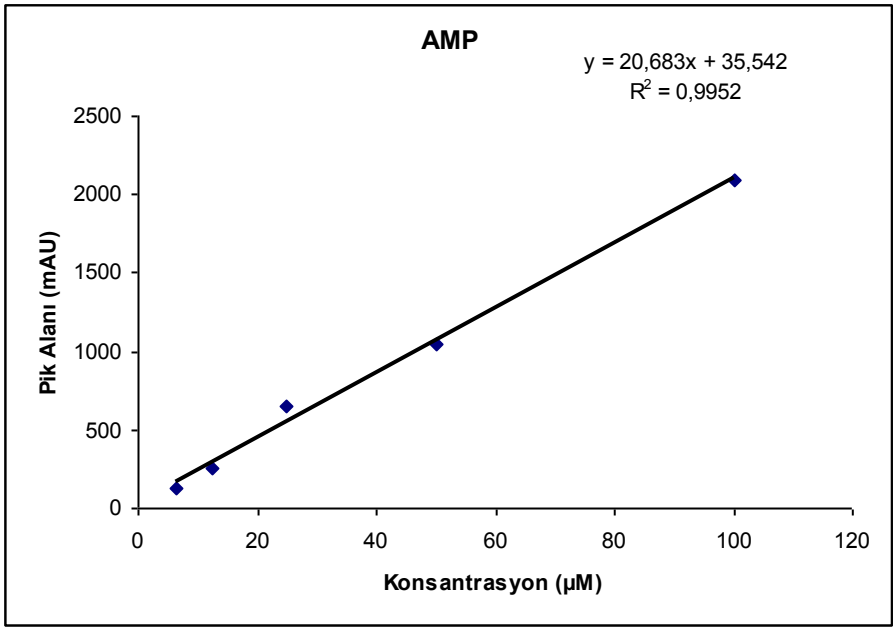
ATP, ADP ve AMP'ye ait kalibrasyon ve doğrusallık çalışmaları için 6,5-12,5-25-50-100 μM konsantrasyonlarındaki standartlara ait ATP, ADP ve AMP standart eğri ve doğrusallık denklemleri sırasıyla şekil 3.7, şekil 3.8 ve şekil 3.9'da gösterilmiştir. Şekil 3.10'da ATP, ADP ve AMP mix standartlarının kromotogramı görülmektedir. Hücrelerin ATP, ADP ve AMP değerleri HPLC'de ölçülmüş ve enerji hesabı, ATP, ADP ve AMP'nin tek tek protein sonuçlarına oranlanmasıyla bulunmuştur. Bulunan bu değerlere ait grafikler, şekil 3.11, şekil 3.12 ve şekil 3.13'de verilmiştir.



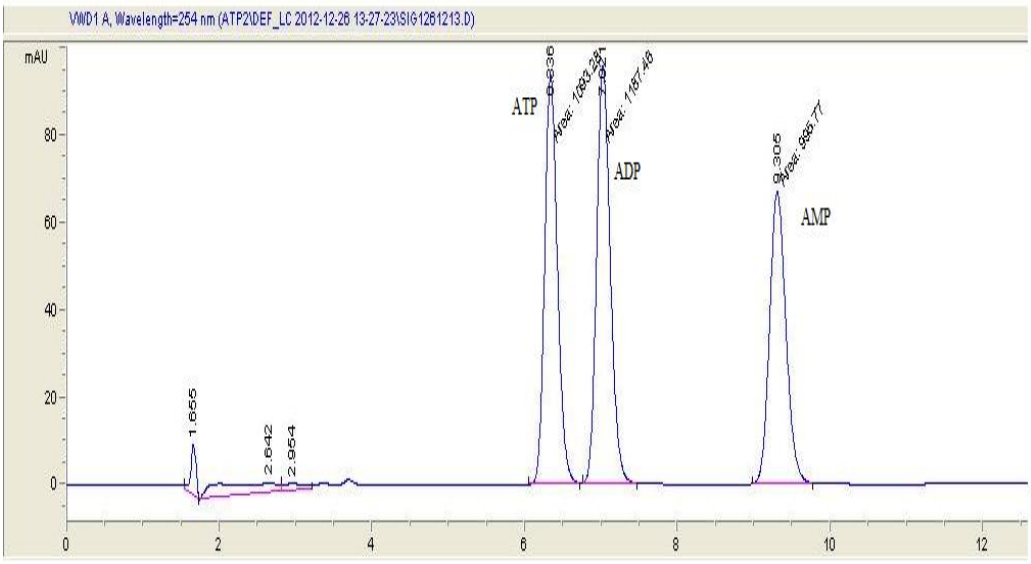
Şekil 3.7. ATP'nin kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi.



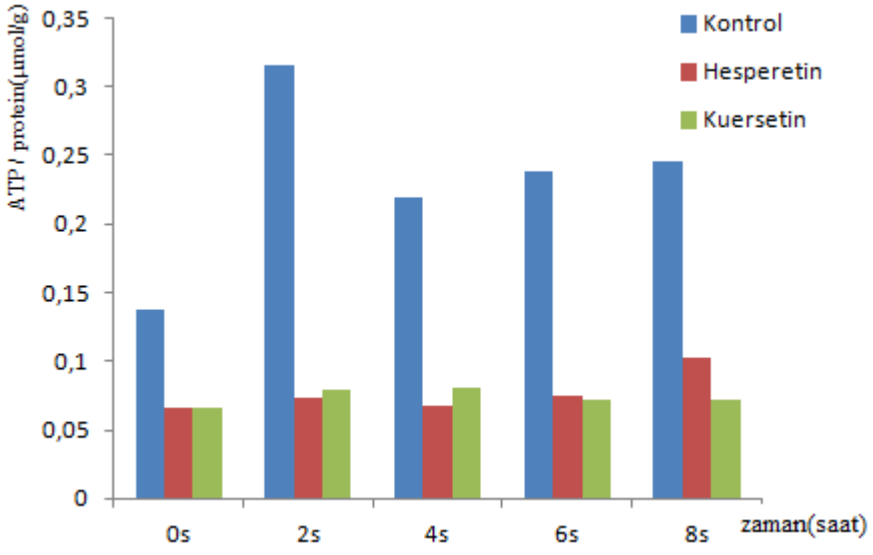
Şekil 3.8. ADP'nin kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi.



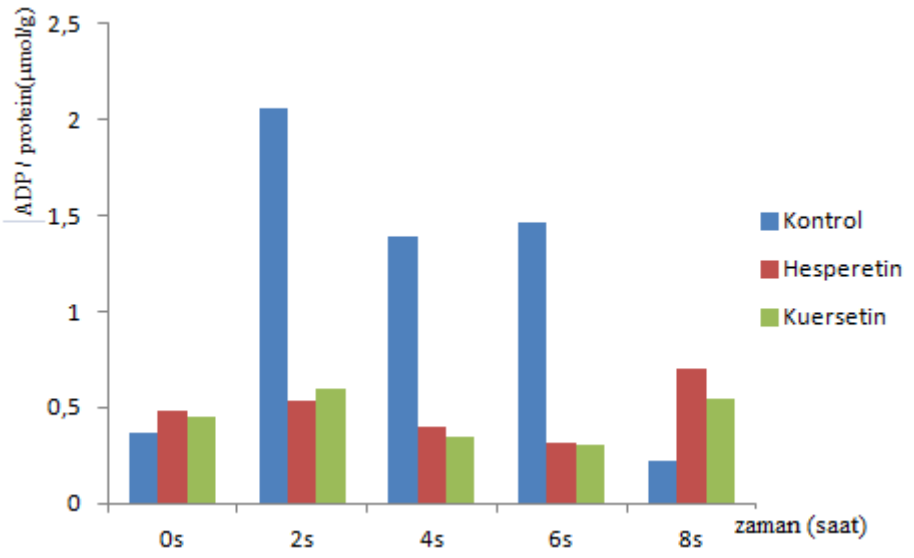
Şekil 3.9. AMP'nin kalibrasyon ve doğrusallık eğrisi.



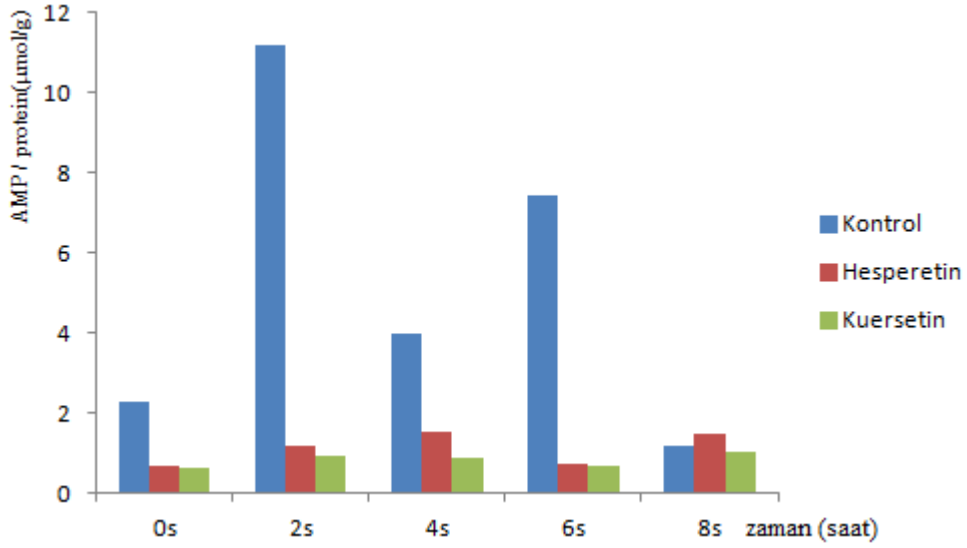
Şekil 3.10. 100 µM ATP, ADP ve AMP mix standardının kromotogramı



Şekil 3.11. Kontrol, hesperetin ve kuersetin gruplarının ATP düzeyi



Şekil 3.12. Kontrol, hesperetin ve kuersetin gruplarının ADP düzeyi



Şekil 3.13. Kontrol, hesperetin ve kuersetin gruplarının AMP düzeyi

4. TARTIŞMA

Flavonoidler, genel olarak bakıldığında hücre proliferasyon inhibitörleri olarak anılmaktadırlar. Pek çok çalışma flavonoid bileşiklerinin kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisini göstermiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar, antikanser ajanlar olan flavonoid bileşiklerini içeren diyetle beslenmenin, kansere yakalanma riskini düşürdüğü yönünde sonuçların olduğunu vurgulamaktadır (Rossi ve ark 2011, Sghaiera ve ark 2011). Flavonoidlerin kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkileri çeşitli mekanizmalarla anlatılmıştır. Bu bileşikler özellikle hücre siklusunun durdurulması ve apopitozisi indüklemesi yönüyle dikkat çekmektedir (Choi 2007, Sghaiera ve ark 2011).

Braganhol ve ark. yaptıkları bir çalışmada, kuersetinin, insan glioma hücresi U138MG hücresine etkisini araştırmışlardır. Hücreler, kuersetinin 10, 30, 50 ve 100 μM dozlarıyla muamele edilmiş ve kuersetinin etkisi uygulamadan sonraki 24, 48 ve 72. saatlerde analiz edilmiştir. Buna göre hücrelerin proliferasyon inhibisyonu 30 μM kuersetinle, bu saatlerde sırasıyla %22, 58, 74 oranında azalırken, 100 μM kuersetinle bu oranlar %31, 70, 76 olarak değişmektedir. Dolayısıyla kuersetin doz ve zaman bağımlı olarak U138MG hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca hücre siklusunda yer alan G2/M fazını durdurması ve kaspaz 3 ile kaspaz 7 aktivitesini artırması sebebiyle de, hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini sonucuna varmışlardır (Braganhol ve ark 2006).

Gulatı ve ark. ise kuersetinin, insan meme kanseri hücresi HCC1937 (PTEN homozigot delesyonu) proliferasyonuna etkisi araştırmasında Akt/PKB yolağını incelemişlerdir. Kuersetinin, HCC1937 kanser hücrelerinde yapısal olarak aktif Akt/PKB yolunu inhibe ettiğini bulmuşlardır (Gulatı ve ark 2006).

Choi ve ark. yaptığı bir başka çalışmada da kuersetin, MDA-MB-453 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmiştir. Bu inhibisyonun nasıl gerçekleştiğine dair bilgileri, apoptotik markırları ve hücre siklusu analizlerini yaparak elde etmişlerdir. Buna göre proapoptotik kaspaz 3, sitokrom C, Bax ve p53 proteinleri artmış, antiapoptotik Bcl2 proteini azalmıştır (Choi ve ark 2008).

İnsan osteosarkoma hücrelerinde ise kuersetinin etkisi Suh ve ark. tarafından incelenmiştir. Hücreler kuersetinin 10, 100, 200, 500 ve 1000 μM dozlarıyla

muamele edilmiş ve kuersetinin etkisi uygulamadan sonraki 24 ile 48. saatlerde incelenmiştir. Hücrelerin proliferasyon inhibisyonu 48. saatte, kuersetinin bu dozlarında sırasıyla %9;24;31,3;41,2;51,3 oranında gerçekleşmiştir. Ayrıca apoptotik kaspaz 3'ün kuersetin tarafından indüklenmesi ve hücre siklusunda G1/S fazının durdurulmasıyla hücrelerin birikmesi de, proliferasyon inhibisyonuna etken olarak gösterilmiştir (Suh ve ark 2010).

Chou ve ark. yaptığı bir çalışmada, insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücreleri kuersetinin 10, 50, 100, 150 ve 175 µM dozlarıyla muamele edilmiştir. Kuersetinin etkisi 24. ve 48. saatlerde analiz edilmiştir. Kuersetinin hücreleri doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca hücre siklusu da analiz edilmiş ve G0/G1 fazında hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Böylece S fazı da durdurulmuş olduğundan kuersetinin inhibitör etkisi gözlemlenmiştir (Chou ve ark 2010). Çalışmamızda da MCF-7 hücreleri kuersetinin 125, 150, 175, 200, 225 ve 250 µM dozlarıyla muamele edilmiştir. Chou ve ark. yaptığı çalışmada kuersetin inhibitör etkisini, 24. ve 48. saatlerde göstermesine rağmen, çalışmamızda daha yüksek konsantrasyonlarda uyguladığımız kuersetinin bu etkisi, ilk uygulamadan sonraki 72. saatte görülmüştür.

Wu ve ark. da hepatik stellat hücrelerinde 25, 50, 75 ve 100 µM dozlarında verilen kuersetinin etkisini analiz etmişlerdir. Kuersetinin hücre proliferayonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiğini, inhibisyonun en fazla 48. saatte ve 100 µM kuersetinin gerçekleştirdiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca apoptoz markırların analizi ve hücre siklusunun durdurulması yoluyla da proliferasyon inhibisyonuna etken olarak gösterilmiştir (Wu ve ark 2011).

Wang ve ark. insan mide karsinoma hücresi BGC-823 hücrelerinde kuersetinin etkisini araştırmışlardır. Buna göre kuersetinin apoptotik yolaktaki, proapoptotik kaspaz 3 ve Bax proteinlerini artırıp, antiapoptotik Bcl2 proteinini azalttığını, bununla beraber hücre siklusundaki S fazını durdurduğunu gözlemlemişlerdir. Dolayısıyla kuersetin BGC-823 hücreleri proliferasyonunu azaltmıştır (Wang ve ark 2012).

Grenado-Serrano ve ark. ise kuersetinin, akciğer kanseri hücresi Hep G2 hücrelerine etkisini incelemişlerdir. Hücreler kuersetinin 10, 25, 50, 75 ve 100 µM dozlarıyla muamele edilmiştir. Hücrelerin inhibisyon oranları, muameleden sonra

4.saatte sırasıyla %3,35;4,65;6,42;7,17 ve 10,18 iken, 18. saatte %7,18;12,96;15,57;3,69 ve 69,72 olarak belirlenmiştir. Kuersetin Hep G2 hücrelerini doz ve zaman bağımlı olarak inhibe etmiştir (Grenado-serrano ve ark 2006).

Rockenbach ve ark. yaptığı çalışmada, mesane kanseri T24 hücrelerine verilen kuersetinin antiproliferatif etkisi, nükleotidlerin ekstrasellüler katabolizmasına bakılarak araştırılmıştır. Hücreler, kuersetinin 10, 30, 50 ve 100 µM dozlarıyla muamele edilmiştir. Uygulamadan 24, 48 ve 72. saatlerde kuersetinin etkisi analiz edilmiş ve 72. saatte en fazla 100 µM kuersetin hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. Buna göre kuersetinin doz ve zaman bağımlı olarak T24 hücrelerini inhibe ettiği bulunmuştur. Kuersetin, insan mesane kanseri hücreleri T24'te ekstrasellüler pürin nükleotidlerinin katalizlediği E-NTPDazlar ve ekto-5-nükleotidaz/CD73 üzerindeki etkisi incelenmiştir. Kuersetin ADP hidrolizini artırmış ve ekto-5-nükleotidaz/CD73 aktivitesini inhibe etmeyi başarmış, fakat protein ekspresyonu üzerinde hiçbir etkisi gözlenmemiştir. Hücre proliferasyonunda adenozinin önemli bir etkisi bulunmayıp, kuersetinin etkisi de adenozin varlığında değişmemiştir. Nükleotitlerin ekstrasellüler katabolizmasında ki değişiklikler yoluyla kuersetinin antiproliferatif etkisi gözlenmiştir. Bu etki adenozin reseptörlerinin kuersetin tarafından engellenmesiyle ve dolayısıyla da ekto-5-nükleotidaz/CD73 inhibisyonuyla artan AMP' nin birikimi sebebiyle mümkündür (Rockenbach ve ark 2011).

Nalini ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada hesperetinin, 1,2-dimetil hidrazinle (DMH) indüklenmiş kolon kanserine karşı koruduğunu gözlemlemişlerdir Bu çalışmada proapoptotik ve antiapoptotik proteinler olan Bax ve Bcl2 genleri, kolorektal dokularda analiz edilmiştir ve DMH ile indüklenen kolonik mukozalarda Bax geni azalırken, Bcl2 geni artmıştır. Fakat hesperetin verilen grupta Bax geni artmış ve Bcl2 geni azalmıştır (Nalini ve ark 2012).

Choi ve ark. yaptığı bir başka bir çalışmada da antikanser etkisi olan hesperetinin, insan meme kanseri hücresi MCF–7 hücresi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hesperetinin, hücre siklusununda yer alan G1 fazını durdurması yoluyla hücre proliferasyonu inhibisyona uğramıştır. Ayrıca siklin bağımlı kinazlar da bu bağlamda incelenmiştir. MCF–7 hücrelerine 10, 50 ve 100 µM dozlarında

verilen hesperetinin etkisi 24, 48 ve 72. saatlerde analiz edilmiştir. Hesperetinin hücre proliferayonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiğini, inhibisyonun en fazla 72. saatte ve 100 μM hesperetinin gerçekleştirdiğini gözlemlemişlerdir (Choi ve ark 2007). Çalışmamızda MCF-7 hücreleri hesperetinin 10, 50, 100, 125, 150 ve 175 μM dozlarıyla muamele edilmiştir. Choi ve ark. yaptıkları bu çalışmaya göre hesperetin 48. ve 72. saatte inhibitör etkisini göstermesine rağmen, bizim çalışmamızda bu etki uygulamadan sonra 72. saat ve sonrasında görülmüştür. Bu çalışmaya benzer olarak kendi çalışmamızda 100 μM hesperetinin etkisi, 10 ve 50 μM hesperetine göre daha önce gözlemlenmiştir. Ayrıca uygulamış olduğumuz en yüksek konsantrasyondaki hesperetin (175 μM) de inhbitör etkisini yine 72. saatte göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçlarıyla kendi sonuçlarımız uyumlu olarak, hesperetinin MCF-7 hücrelerini doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği görülmüştür.

Zarebczan B ve ark. yaptığı bir çalışmada da hesperetin indüklenmiş hücre siklusu progresyonunda, hücre büyüme inhibisyonu, hücrelerin farklı dozlardaki hesperetine maruz bırakılmasıyla gözlemlenmiştir. Bu çalışmada hesperetinin insan gastrointestinal karsinoid hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak inhibisyonu araştırılmıştır. Hesperetin bu inhibör etkisini, nöroendokrin tümör markırları olan CgA ve ASCL1 protein düzeylerini azaltıp, Notch1 protein aktivasyonunu artırarak göstermiştir. CgA ve ASCL1 proteinlerinin azalması, Notch1 proteininin artmasına bağlı olarak gösterilmiştir (Zarebczan B ve ark 2011).

Aromataz enzimi, genellikle menopoz sonrası kadınlarda östrojen sentezinden sorumlu bir enzimdir. Daha önceleri in vitro çalışmalar, hesperetin gibi flavonoidlerin en güçlü doğal aromataz inhibitörleri olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmada meme karsinogenezinde, özellikle hesperetin aromataz inhibisyonunu gerçekleştirmede potansiyel bir kimyasal önleyici ajan olarak gösterilmiştir. Hesperetin östrojene duyarlı pS2 geninin mRNA ekspresyonunu da azalmış siklin D1, CDK4 ve Bcl(x)-L proteinlerini azaltmıştır (Ye ve ark 2011).

Neeman ve ark. yaptıkları bir çalışmada insan meme kanseri hücresi T47D hücrelerine, antioksidan özellikleri olan adriomisin, daunomisin ve aktinomisinin belli dozları uygulanmış ve hücrelerin nükleozit trifosfat (NTP) düzeyleri incelenmiştir. Hücrelerin bileşiklerle muamelesinden sonraki ilk 6 saat boyunca

hücrelerin NTP düzeylerinde, kontrole göre %30-50 oranında artış olmasına rağmen 6. saatten sonra hücre ölümü sebebiyle hücre sayısındaki azalmayla orantılı olarak NTP düzeylerinde düşüş gözlenmiştir. HPLC ölçümleri ilk 6 saatte NTP düzeylerindeki artışın, özellikle ATP'den kaynaklandığını göstermiştir.

Bu çalışmada da hesperetin ve kuersetin uygulanan hücrelerin ATP düzeyleri kontrole göre proliferasyon inhibisyonunun başlamasından sonraki ilk 8 saat boyunca azalma göstermiştir. Hesperetin uygulanan hücre grubunun ATP düzeyleri kontrole göre; 0, 2, 4, 6 ve 8. saatlerde sırasıyla %47, 23, 31, 32, 42 oranında artış şeklinde değişiklik göstermiştir. Kuersetin uygulanan hücre grubunun ATP düzeyleri ise, kontrole göre 0, 2, 4, 6 ve 8. saatlerde sırasıyla %48, 25, 37, 30, 29 oranında azalış şeklinde değişiklik göstermiştir. Bunun yanında hesperetin grubundaki hücrelerin 4. saate göre, 6 ve 8. saatlerde ATP düzeylerinde sırasıyla %10 ve %66 oranında artış gözlenmesine rağmen, kuersetin grubundaki hücrelerin 4. saate göre, 6 ve 8. saatlerde ATP düzeylerinde sırasıyla %11 ve %12,5 oranında düşüklük gözlenmiştir. Proliferasyon inhibisyonunun başlamasından sonra hesperetin uygulanan hücrelerin ATP düzeylerinin artması ve kuersetin uygulanan hücrelerin ATP düzeylerinin azalması, her iki maddenin proliferasyon inhibisyonunu farklı yollarla gösterdiği ihtimalini düşündürmektedir. Metabolik duruma etkinin sebebinin ortaya konulmasıyla ilgili daha ileri çalışmalar bu konuda aydınlatıcı olacaktır.

Bu çalışmada kullanılan flavonoidlerin MCF-7 hücrelerinin proliferasyonu, doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Sonuçlar yukarıda belirtilen diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak bulunmuştur. Fakat benzer çalışmalardan farklı olarak hesperetin ve kuersetinin kanser hücrelerinin proliferasyonuna etkisi, literatürlerde belirtilen dozlara göre hem yüksek dozlarda hem de belirtilen zamanlardan daha geniş bir zaman diliminde gözlemlenmiştir. Çalışmada hesperetin ve kuersetin, MCF-7 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonuna etkisini, uygulamadan sonra 72. saatte göstermiştir. Hesperetinin inhibitör etkisi en fazla 175 µM dozda görülürken, bu etkiyi kuersetin 250 µM dozda göstermiştir. Ayrıca çalışmamızın literatürlerden en önemli farkı da kullanılan flavonoidlerin inhibitör etkilerinin gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle belirlenmiş olmasıdır.

5. SONUÇ

Bu çalışmada flavonoidlerin, insan meme kanseri hücresi MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiğini gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle ortaya koymuştur. Yine kanser hücrelerinin metabolik durumuna etkileri, ATP, ADP, AMP düzeyleri ölçülerek ortaya konmaya çalışılmış ve değişikliklere yol açtığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışma flavonoidlerin antiproliferatif ve antioksidan özellikleri nedeniyle kanser hastalarında diğer tedavilerin yanında destek tedavi olarak kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir. Kanser hücrelerine uygulanan antioksidan özellikteki flavonoid bileşiklerinin proliferasyonu inhibe etmesiyle, hücrelerin ATP düzeylerindeki değişiklikler arasındaki ilişki net olarak bilinmemektedir, etki mekanizmalarıyla ilgili daha ileri çalışmalar bu konuda aydınlatıcı olacaktır.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Flavonoidlerin Kanser Hücrelerine Etkisi

Gülsüm Tekin Yalçın

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2013

Bitki kaynaklı flavonoidler, özellikle antiproliferatif ve antioksidan özellikleri taşıması yönüyle son zamanlarda araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Hücre kültürü ve deney hayvan çalışmalarıyla, karsinogenezde flavonoidlerin kanser önleyici etkilerinin olduğu ortaya konmuştur. Fakat antikanserojenik olarak değerlendirilen flavonoidlerin halen moleküler etki mekanizmaları anlaşılamamıştır.

Çalışmamızda kanser hücresi proliferasyonu inhibitörleri olarak değerlendirilen flavonoid türünde olan, kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksi flavon) ve hesperetin (3',5,7-trihidroksi–4'-metoksiflavon)'in, MCF-7 meme kanseri hücre serisinde, farklı konsantrasyon ve sürelerde hücre proliferasyonu üzerine etkisini, gerçek zamanlı hücre elektronik algılama sistemiyle (xCELLigence,) ortaya koymayı amaçladık.

Bu amaçla hücre kültürü laboratuvarında kuersetin (125, 150, 175, 200, 225, 250 μM) ve hesperetinle (10, 50, 100, 125, 150, 175 μM) muamele edilen MCF-7 hücrelerinin her iki bileşikle de doz ve zaman bağımlı olarak proliferasyonunun inhibisyonu gözlemlendi. Hücrelerin proliferasyonundaki değişiklikler, gerçek zamanlı hücre analizörü (xCELLigence, Roche Diagnostics GmbH, Penzbeerg, Germany) kullanılarak değerlendirildi. Hücre sayısındaki değişiklikler, mikro-elektrot içeren özel hücre kültürü kuyucuklarında, deney süresince her 15 dk'da bir sürekli olarak izlendi. Buna göre 175 μM hesperetin 72. saatten sonra, MCF–7 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık % 48,8 oranında engellerken, 144. saatte % 80,8 oranında inhibe etmiştir ($p<0,026$). 250 μM kuersetin de 72. saatten sonra, MCF–7 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre yaklaşık % 63,4 oranında inhibe ederken, 144. saatte % 88,6 oranında inhibe etmiştir ($p<0,000$).

Sonuç olarak, kuersetin ve hesperetinin meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu değerlendirmeyle birlikte, flavonoidlerin hücre proliferasyonuna etki mekanizmalarıyla ilgili daha ileri çalışmalar bu konuda aydınlatıcı olacaktır.

Anahtar Sözcükler: hesperetin; kuersetin; MCF-7; proliferasyon

7. SUMMARY

Effect of Flavonoids on the Cancer Cells

Plant-derived flavonoids has recently attracted the attention of researchers, due to antioxidant and antiproliferative properties. Cell culture and experimental animal studies have been shown to be cancer-preventive effects of flavonoids in carcinogenesis. However, some of the mechanisms of flavonoids are not clear.

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksi flavone) and hesperetin (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone) are flavonoid compounds. They are evaluated as inhibitors of proliferation of various cancer cells. In our study, we investigated the effect of hesperetin and quercetin with different concentrations and durations to cell proliferation in MCF–7 breast cancer cell line by real-time cell analyzer (xCELLigence).

A real-time cell analyzer (xCELLigence, Roche Diagnostics GmbH, Penzbeerg, Germany) was used to evaluate the effects of different doses of hesperetin (10, 50, 100, 125, 150, 175 μM) and quercetin (125, 150, 175, 200, 225, 250 μM) on the proliferation of MCF–7 breast cancer cell line. Changes in the number of cells in special cell culture flasks that containing micro-electrodes was observed continuously every 15 minutes during the experimental period. 175 μM hesperetin inhibit rate of 48,8 % the MCF-7 cells with compared the control after 72. and inhibit rate of 80,8 % after 144. hours ($P<0,026$). 250 μM quercetin inhibit rate of 63,4 % the MCF-7 cells with compared the control after 96. and inhibit rate of 88,6 % after 144. hours ($P<0,000$).

As a result, hesperetin and quercetin inhibit the human breast cancer cells as dosa-time dependent. Studies of the mechanisms of action of flavonoids on cell proliferation will be informative in this regard.

Key words: hesperetin; quercetin; MCF–7; proliferation.

8. KAYNAKLAR

1. Abdallah FB, Zribi N, Ammar-Keskes L. Antioxidative potential of quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro. Blackwell Verlag GmbH, Andrologia, 2011; 43: 261–265.

2. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: apoptoz nedir? Tıp Araştırmaları Dergisi, 2008; 6 (2): 93 -104.

3. Apopitozis. Erişim tarihi: 8 Ekim 2012. www.istanbul.edu.tr/fen/notları/1260110414

4. Arıcan E. Kanser biyolojisi. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2010.

5. Aslan Koşar P, Çapar E, Koşar A. Mesane kanseri ve ras proto-onkogenleri. Yeni Üroloji Dergisi, 2012; 7 (1): 55–58.

6. Atlı Sekeroğlu Z, Sekeroğlu V. Effects of viscum album L. extract and quercetin on methotrexate-induced cyto-genotoxicity in mouse bone-marrow cells. Mutation Research, 2012;746: 56–59.

7. Aydemir N. Genistein'in meme kanseri hücreleri üzerine etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknolojisi Enstitüsü, Biyoloji A.B.D. Gebze, 2007.

8. Beliveau R, Gingras D. Role of nutrition in preventing cancer. Can Fam Physician, 2007;53: 1905–1911.

9. Bhatt DP, Chen X, Geiger JD, Rosenberger TA. A sensitive HPLC-based method to quantify adenine nucleotides in primary astrocyte cell cultures. Journal of Chromatography B. 2012; 110:889–890.

10. Bornhorst J, Ebert F, Lohren H, Humpf HU, Karst U, Schwerdtle T. Effects of manganese and arsenic species on the level of energy related nucleotides in human cells. Cite this Metallomics, 2012; 4: 297–306.

11. Borska S, Drag-Zalesinska M, Wysocka T, Sopel M, Dumanska M, Zabel M, Dziegiel P. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of quercetin on human pancreatic carcinoma cell lines EPP85-181P and EPP85-181RDB. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2010; 48(2): 222–229.

12. Braganhol E, Zamina LL, Canedoa AD, Hornb F, Tamajusukua ASK, Wink MR, Salbegoa C, Battastini AMO. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. Anti-Cancer Drugs, 2006; 17: 663–671.

13. Brand W, van der Wel P, Rein MJ, Barron D, Williamson G, Van Bladeren PJ, Rietjens I. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell Monolayers. Drug Metabolism and Disposition, 2008; 36: 1794–1802.

14. Breast cancer. Erişim tarihi: 8 Ekim 2012. www.cancerbacup.org.uk.

15. Breast cancer. Erişim tarihi: 8 Ekim 2012. www.cancer.org/cancer/breastcancer.

16. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 2008; 9(3) : 51.

17. Campell JB. Breast cancer-race, ethnicity and survival: aliterature review. Breast Cancer Res and Threatment, 2002; 74: 187–192.

18. Canadian Cancer Society. What is Breast Cancer? Erişim tarihi: 14 Eylül 2012. www.cancer.ca /Ontario/ About %20cancer.

19. Caoa X, Liua M, Tuoa J, Shena D, Chana CC. The effects of quercetin in cultured human RPE cells under oxidative stress and in Ccl2/Cx3cr1 double deficient mice. Exp Eye Res. 2010; 91(1): 15–25.

20. Causes of Breast Cancer. Erişim tarihi: 18 Ağustos 2012. www. cancerbacup. org.uk

21. Cermak R. Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drugmetabolism. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2008;4: 17–35.

22. Chen Y, Li X, Xing N, Cao X. Quercetin inhibits choroidal and retinal angiogenesis in vitro. Graefes Arch Clin Exp Ophtahalmol 2008;246:373-378.

23. Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydoxyl groups. Chem Phys Lipids, 1996; 79: 157–163.

24. Chiba H, Uehara M, Wu J, Wang X, Masuyama R, Suzuki K, Kanazawa K, Ishimi Y. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. J of Nutr. 2003; 133(6): 1892–1897.

25. Choi. EJ. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. Nutrition and Cancer, 2007; 59: (1) 115-119.

26. Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. Arch Pharm Res. 2008; 31(10): 1281-1285.

27. Chou CC, Yang JS, Lu, Siu HF, Ip SW, Lo C, Wu CC, Lin JP, Tang NY, ChungJG, Chou MJ, Teng YH, Chen DR. Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. Arch Pharm Res, 2010; 33(8): 1181-1191.

28. Cooray HC, Janvilisri T, Veen HW, Hladky SB, Barrand MA. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004;317: 269–275.

29. Corcoran MP, McKay DL, Blumberg JB. Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. J of Nutr in Gerontology and Geriatrics, 2012; 31: 176–189.

30. Cutler GJ, Ross JA, Harnack LJ, Jacobs DR, Scrafford CG, Barraj LM, Mink PJ , Robien K. Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: The Iowa Women's Health Study. Int J Cancer, 2008; 123(3): 664–671.

31. Çapanoğlu Güven E, Toydemir Otkun G, Boyacoğlu D. Flavonoidlerin biyoyararlılığını etkileyen faktörler. Derleme / Review GIDA 2010; 35 (5): 387-394.

32. Dalay N. Kanser biyolojisi. İn: Klinik Onkoloji. Topuz E. Aydıner A. Karadeniz, A.N. Ends. İstanbul Üniv. Onkoloji Enstitüsü Yayınları. 2000.

33. De Pascual-Teresa S, Sanchez-Moreno C, Granado F, Olmedilla B, De Ancos B, Cano MP. Short and mid-term bioavailability of flavanones from oranges in humans. Curr Top Nutraceut R, 2007; 5: 129-134.

34. Dönmez Altuntaş H, Öztürk F, İlhan Yılmaz S, Eröz R. Asbest ve erionite bağlı mezotelyomalı hastaların parafin bloklarında p53 tümör supressör ve ras onkogen mutasyonlarının araştırılması. Erciyes Tıp Dergisi. 2009; 31: 001-008

35. Egert S, Rimbach G. Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous coppe ions and generation of reactive oxygen species. Nutr Food Res. 2011; 55: 553–559.

37. Enein A, Hassan, Kruk J. Occupational Physical Activity and the Risk of Breast Cancer. Cancer Detection and Prevention, 2003; 27: 187-192.

38. Erdman JW Jr, Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly J, Hollman P, Keen CL. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI north america flavonoids Workshop. J Nutr. 2007;137: 718-737.

39. Erhan Y. Meme kanserinde onkogenler ve tümör süpressör genlerin rolü. Türk Patoloji Dergisi, 1995;11 (2) :40-42.

40. Erlund I. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology, review of flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Nutr Res. 2004; 24: 851–874.

41. Erlund I, Freese R, Marniemi J, Hakala P, Alfthan G. Bioavailability of quercetin from berries and the diet. Nutr Cancer, 2006; 54 (1): 13-17.

42. Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. J. Nutr. 2001; 131: 235–241.

43. Espin JC, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA. Nutraceuticals: facts and fiction. Phytochemistry. 2007;68: 2986–3008.

44. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. Breast Cancer Res. 2004; 6: 109-118.

45. Felicia V, Guthrie N, Chambers AF, Carrollb KK. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. Cancer Letters, 1997;112:127-133.

46. Flavonoids. Erişim tarihi: 16 Nisan 2012. www.naturalremedies.org/flavonoids.

47. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Fd. Chem Toxic. 1995; 33 (12):1061-1080.

48. Frasson AP, Charão MF, Rosemberg DB, Paula de Souza A, Garcia SC, Bonorino C, Bogo MR, Attilio De Carli G, Tasca T. Analysis of the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase profiles in serum-limited trichomonas vaginalis. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2012; 107(2): 170-177.

49. Garcia-Lafuente A, Guillamon E, Villares A, Rostagno MA, Martinez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. Inflamm. Res. 2009; 58: 537–552.

50. Gelmann EP. Oncogenes in human breast Cancer. In: The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases. Vol I. Ed: Bland KI, Copeland EM. WB Saunders Company, USA, 1998:499-517

51. Gerwirtz DA. Does bulk damage to DNA explain the cytostatic and Cytotoxic effects of topoisomerase II inhibitors? Biochem. Pharmacol. 1991; 42: 2253-2258.

52. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, Biasi SD, Roat E, Bertoncelli L, Cooper EL, Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011.

53. Goldbohm RA, van den brandt PA, Hertog MGL, van Poppel G. Flavonoid intake and risk of cancer: a prospective cohort study. Am. J.Epidemiol. 1995; 41: 61.

54. Graff RD, Lazarowskı ER, Banes AJ, Lee GM. ATP release by mechanıcally loaded porcıne chondrons ın pellet culture. Arthritis & Rheumatism, 2000; 43: 1571–1579.

55. Gregory JF, Quinlivan EP, Davis SR. Integrated the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification. Trends Food Sci Tech, 2005; 16: 229–240.

56. Grenado-serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3 Kinase/Akt and ERK Pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). The Journal of Nutrition; 2006;136(11); 2715

57. Guha N. Dietary flavonoids and the risk of breast cancer and childhood leukemia. Doctor Theses. California University, Berkeley, 2009.

58. Gulatı N, Laudet B, ZohrabıanVM, Muralı R, Jhanwar M. The antiproliferative effect of quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway -Unıyal Antıcancer Research, 2006; 26: 1177-1182.

59. Guppy M, Leedman P, Zu X and Russell V: Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. Biochem J. 2002; 364:309-315.

60. Günal SY, Günal Aİ. 22-55 yaş çalışan kadınların meme kanserinde yönelik davranışları. Sağlık ve Toplum, 2000;10: 4-21.

61. Hackett A. M. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In: Plant flavonoids in biology and medicine. biochemical pharmacological and structure activity relationships, New York: Liss, 1986; 177–194.

62. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. Food Chem Toxicol. 2007; 45: 2179-2205.

63. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nutritional Biochem, 2002;13: 572-584.

64. Herbst RS. "Review of epidermal growth factor receptor biology". Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004; 59: 21–6.

65. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Kafan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet, 1993; 342:1007-1010.

66. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonods and their determinants in adults in the Netherlands. Nutr Cancer, 1993; 20: 21–29.

67. Hollman PCH, de Vries JHM, van Leeuven SD, Mengelers MJB, Katan MB. Absorbtion of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am J Clin Nutr. 1995; 62: 1276-1282

68. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. Nat Rev Immunol. 2006; 6(11): 813-822.

63. IARC. Fruit and vegatables. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2003.

64. İlvan Ş. Meme Karsinomu Patolojisi. Meme Karsinomu Patolojisi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tip Eğitimi Etkinlikleri, Meme Kanseri Sempozyum Dizisi, 2006; 5: 65–71.

65. Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression, J. Cell Biochem. 2009;106 (1): 73–82.

66. Kahraman A, Serteser M, Koken T. Flavonoidler. Kocatepe Tıp Dergisi, 2002; 3, 01-08.

67. Kanser nedir? Erişim tarihi: 4 Ekim 2012.www.iuonkolojienstitusu.org /pdf/ halk/kanser_nedir. pdf

68. Kemomarsi K, Conte D.J, Toyofuku W, Fox MP, Scambia G. Deregulation of cyclin-E in breast cancer. Oncogene, 1995; 11: 941-950.

69. Kızılkeçili Ö. Salvia crypthanta montbret & auchr ex bentham ve salvia pomifera l. türlerinin metanol, etanol ekstrelerinin ve uçucu yağlarının antibakterial, antifungal ve antitüberküloz aktivitelerinin tayini. Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Balıkesir, 2007.

70. Kim JY, Jung KJ, Choi JS, Chung HY. Hesperetin: a potent antioxidant against peroxynitrite free Radical Research, 2004; 38: 761–769.

71. Klijn JGM, Berns PMJJ, Schmits PLM, Foekens JA. The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. Endocrinol Rev. 1992;13:3-17.

72. Kobayashı S, Tanabe S. Evaluation of the anti-allergic activity of Citrus unshiu using rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells as well as basophils of patients with seasonal allergic rhinitis to polen. International Journal of Molecular Medicine, 2006; 17: 511-515.

73. Kocabaş N. Homosisteinin indüklediği oksidatif stres üzerinde quercetinin koruyucu etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya A.B.D. Afyonkarahisar, 2008.

74. Kolch W. Meaningful relation ships the regulation of the Ras/raf/mek/erk pathway by protein interactions. Biochem J. 2000; 351:289-305.

75. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV: Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Nat Rev Cancer, 2011;11: 325-337.

76. Kuhnau J. The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutriti-on. World Rev Nutr Diet, 1976; 24: 117–191.

77. Lee KS, Kim EY, Cho SG, Han YJ, Yang YC, Lee SS, Ko MS, Rıu KJ, Lee HT, Park SP. 3,4-Dihidroxyflavone acts as an antioxidant and antiapoptotic agent to support bovine embryo development in vitro. J Reprod Dev. 2011;57: 127-134.

78. Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. J Natl Cancer Inst. 2000; 92: 154-160.

79. Leth T, Justesen U. Analysis of flavonoids in fruits, vegetables and beverages by HPCL-UV and LC-MS and estimation of the total daily flavonoid intake in Denmark. In: Polyphenols in Food, Amado R (chief ed.), Andersson H, Bardocz S, Serra F, Off. Official Publications Eur. Commun, Luxembourg, 1998;39–40.

80. Li F, Ye L, Lin S, Leung LK. Dietary flavones and flavonones display differential effects on aromatase (CYP19) transcription in the breast cancer cells MCF-7. Molecular and Cellular Endocrinology, 2011; 344: 51–58.

81. Liu KC, Yen CY, Wu RSC, Yang JS, Lu HF, Lu KW, Lo C, Chen HY, Tang NY, Wu CC, Chung JG. The roles of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic signaling pathway in quercetin-mediated cell death of human prostate cancer PC-3 cells. Inc Environ Toxicol, 2012; 00: 000–000.

82. Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. Am J Clin Nutr. 2003; 78: 517-520.

83. Lowitz BB, Casciato DA. Kanser Biyolojisi ve Onkogenler: Ana bilgi. Medıcal Oncology& Prıncıples of Cancer Bıology. Erişim tarihi: 2 Ekim 2012. www.stoma-seite.de/SiklusApoptozisKanser.pdf

84. Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D, Andò S. Estrogen receptor α mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. Mol Pharmacol, 2001; 60:595-602

85. Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. FEBS Lett. 1997; 409: 12–16.

86. Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigne C, Regerat F, Remesy C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. J. Nutr. 1995; 125: 1911–1922.

87. Manjer J, Berglund BL, Garne JP, Janzon L, Malina J. Breast Cancer Incidence in Relation to Smoking Cessation. Breast Cancer Research and Treatment. 2000; 61: 121-129.

88. Manthey JA, Guthrie N and Grohmann K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation current medicinal chemistry, 2001; 8: 135-153.

89. McCormick. Signaling networks that cause cancer trends cell biol. 1999; 9(12):53-6.

90. Meme kanseri nasıl tedavi edilir? Erişim tarihi: 10 Eylül 2012. www. memekanseritedavisi. Com /meme_kanseri_tedavisi.

91. Mi Y, Zhang C, Li CM, Tanedac S, Watanabea G, Suzukic AK, Tayaa K. Quercetin protects embryonic chicken spermatogonial cells from oxidative damage intoxicated with 3-methyl-4-nitrophenol in primary culture. Toxicology Letters, 2009; 190: 61–65.

92. Michaud-Levesque J, Bousquet-Gagnon N, Béliveau R. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. Experımental Cell Research, 2012; 318: 925–935.

93. Moorman PG, Terry PD. Consumption of dairy products and the risk of breast cancer: a review of the literature. Am J Clin Nutr. 2004;80(1): 5-14.

94. Morand C, Crespy V, Manach C, Besson C, Demıgne ´ C and Re ´Me ´ Sy C Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 1998; 275:212-219.

95. Nalini N, Aranganathan S, Kabalimurthy J. Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. Toxicology Mechanisms and Methods, 2012; 22(5): 397-408.

96. Onkogenler-antionkogenler. Erişim tarihi: 8 Ekim 2012.www.genbilim.com //content/view/ 4306/33/

97. Ortega N, Reguant J, Romero MP, Macia A, Motilva MJ. Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model. J Agric Food Chem. 2009; 57: 5743–5749.

98. Öztürk M. Meme Kanserinin Genetiği ve Risk Faktörleri Sempozyum Dizisi No: 54, 2006; 15–26.

99. Perez-Jimenez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Diaz-Rubio ME, Garcia-Diz L, et al. Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: Plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. Plant Foods Hum Nutr. 2009; 64: 102–7.

100. Phytochemicals. Erişim tarihi: 2 Hazian 2012. www. phytochemicals. info / phytochemicals /hesperidin.php.

101. Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D: Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. J Biol Chem. 1979; 254: 2669-2676.

102. Rockenbach L, Bavaresco L, Farias PF, Cappellari AR, Barrios CH, Morrone FB, Battastini AMO. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 2011;4: 72.

103. Ross JA, Kasum CM. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. Annu Rev Nutrition, 2002; 22:19–34.

104. Rossi M, Lugo A, Lagiou P, Zucchetto A, Polesel J, Serraino D, Negri E, Trichopoulos D, La Vecchia C. Proanthocyanidins and other flavonoids in relation to pancreatic cancer: a case-control study in Italy. Ann Oncol. 2012; 23(6):1488-1493.

105. Salih AK, Fentiman IS. Breast cancer prevention: present and future. Cancer Threatment Rewievs, 2001; 27: 261-273.

106. Sampson L, Rimm E, Hollman PC, De Vries JH, Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. J Am Dietetic Ass, 2002; 102:1414-1420.

107. Sandulache VC, Ow TJ, Pickering CR, Frederick MJ, Zhou G, Fokt I, Davis-Malesevich M, Priebe W and Myers JN: Glucose, not glutamine, is the dominant energy source required for proliferation and survival of head and neck squamous carcinoma cells. Cancer, 2011; 117: 2926-2938.

108. Sasco AJ. Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? APMIS, 2001;109: 80–92.

109. Serafini M, Villano D, Spera G, Pellegrini N. Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network. Nutr Cancer, 2006; 56 (2): 232-240.

110. Seyitoğlu B. Apigenin'in (4',5,7 trihidroksi flavon) I-131 ile işaretlenmesi ve radyofarmasötik potansiyelinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar A.B.D. İzmir, 2008.

111. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr. 2000;130: 2073–85.

112. Sghaiera MB, Skandrani I, Nasra N, Francac MGD, Chekir-Ghediraa L, Ghediraa K. Flavonoids and sesquiterpenes from Tecurium ramosissimum promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. Environmental Toxicology and Pharmacology, AAPS, 2011; 32: 336–348.

113. Shen S, Chen Y, Hsu F, Lee W.Differantial apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyelo leukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase 3 cascade. J Cell Biochem. 2003;89: 1044-1055.

114. Shimoda K, Hamada H, Hamada H. Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures. Phytochemistry, 2008; 69: 1135–1140.

115. Sierra A, Castellsague X, Escobedo A, Lloveras B, Garcia-Ramirez M, et al. Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alteration: a pathway to metastatik progression in human breast cancer. Int J Cancer, 2000; 89(2): 142-147.

116. Silva AR, Pinheiro AM, Souza CS, Freitas SR, Vasconcellos V, Freire SM, Velozo ES, Tardy M, El-Bachá RS, Costa MFD, Costa SL. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. Cell Biol Toxicol, 2008; 24: 75–86.

117. Somunoğlu S. Meme kanseri: belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi, 2009; 4 Sayı:10.

118. Staedler D, Idrizi E, Kenzaoui BH, Juillerat-Jeanneret L. Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. Cancer Chemother Pharmacol, 2011; 68:1161–11.

119. Suh DK, Lee EJ, Kim HC, Kim JH. Induction of G1/S phase arrest and apoptosis by quercetin in human osteosarcoma cells. Arch Pharm Res. 2010; 33: 781-785.

120. Tandon, Clark K, Chamness GM, Chirgwin GC, JM, Mcguire WL, Cathepsin D. Prognosis in breast cancer. Nengl J Med. 1990; 322: 297-302.

121. Tribolo S, Lodi F, Connor C, Suri S, Wilson VG, Taylor MA, Needs PW, Kroon PA, Hughes DA. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. Atherosclerosis, 2008;197: 50–6.

122. Tuncer S. Retinoblastoma. Klinik Gelişim Dergisi, 2012; 25: 56-65.

123. Utesch D, Feige K, Dasenbrock J. Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. Mutat Res. 2008; 654: 38-44.

124. Uz A. Akut egzersizin kalp dokusu üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya A.B.D. Kayseri, 2011.

125. van der Burg B, De Groot RB, Isbruk L, Kruijer W, DeLaat SWJ. Oestrogen directly stimulates growth factor signal transduction pathways in human breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 1992; 43: 111-115.

126. van Erk M, Roepman P, van der Lende T, Stierum R, Aarts J, van Bladeren P, van Ommen B. Integrated assesment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. Eur J Nutr. 2005; 44: 143-56.

127. Viskupicova J, Ondrejovic M, Sturdik E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. J Food Nutr Res. 2008; 47(4): 151–162.

128. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K. Similarity of protein encoded by the human cerbB2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature 1986; 319: 230-234.

129. Yang YL, Hsu HT, Wang KH, Han CY, Chen CM, Chen CM and Ko WC. Hesperetin-7,3'-*O*-dimethylether selectively inhibits phosphodiesterase 4 and effectively suppresses ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness with a high therapeutic ratio. J Biomed Sci. 2011;18: 84.

130. Ye L, Chan FL, Chen S, Leung LK. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. J Nutr Biochem. 2012; 23(10): 1230-1237.

131. Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring JE, and Sesso HD. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. Am J Clin Nutr. 2009; 89(3): 905–912.

132. Wang P, Zhang K, Zhang Q, Meib J, Chen C, Feng Z, Yu D. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. Toxicology in Vitro, 2012;26: 221–228.

133. Wu LC, Lu IW, Chung CF, Wub HY, Liub. Antiproliferative mechanisms of quercetin in rat activated hepatic stellate cells. Li-chen Cite this: Food Funct. 2011; 2: 204.

134. Zarebczan B, Pinchot SN, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Hesperetin, a potential therapy for carcinoid cancer. The American Journal of Surgery, 2011; 201: 329–333.

135. Zhang S, Yang X, Morris ME. Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. Pharmaceutical Research, 2004; 21(7): 1263-1273.

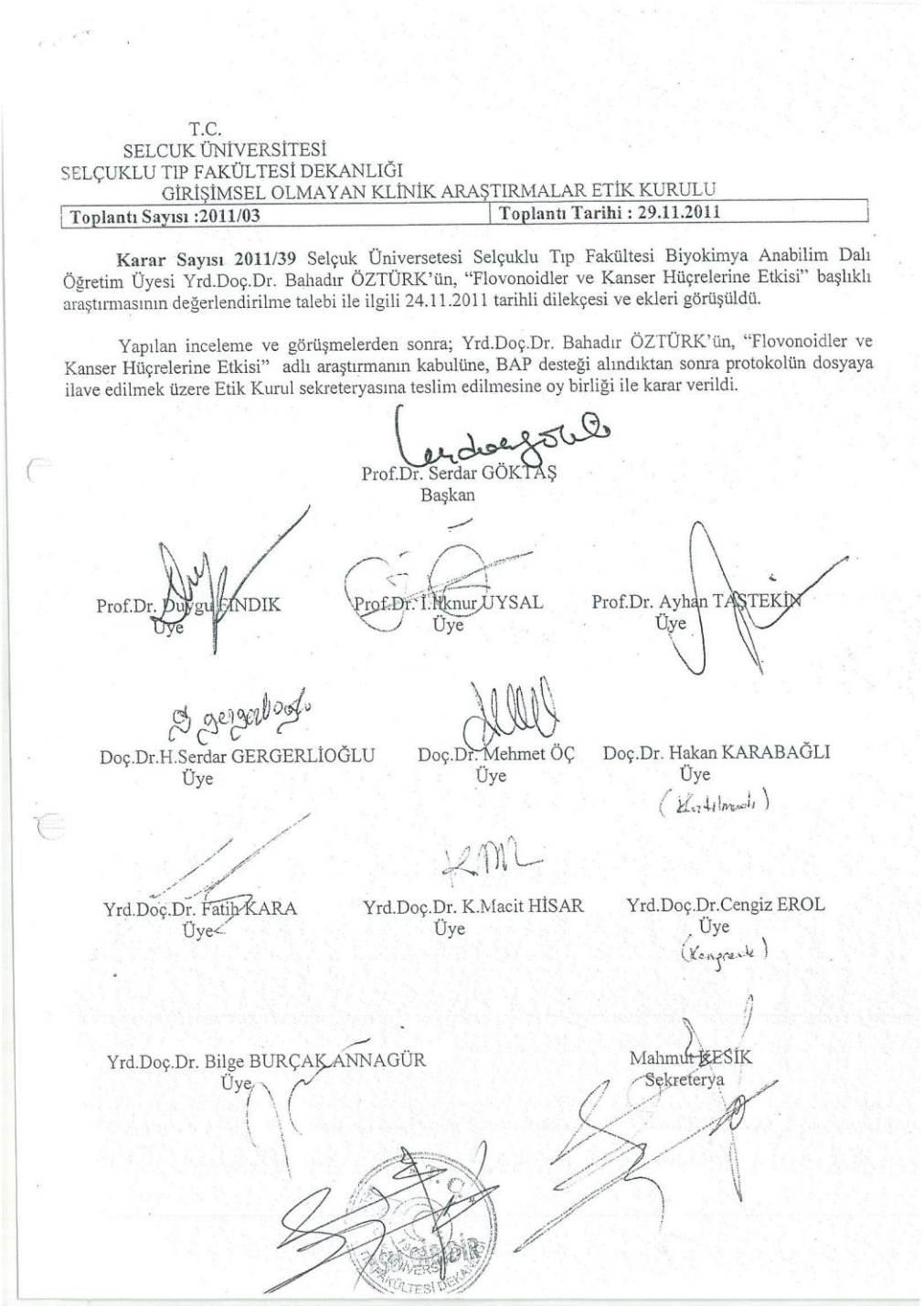
136. Zheng J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review) Oncology Letters, 2012; 4: 1151-1157.

137. Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. Biochem Biophys Res Commun, 2004;313: 459-465.

138. Zukerberg LR, Yang WL, Gadd M, Wooster R. Cyclin d1 (prad1) protein expression in breast cancer: approximately one third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. Mol Pathol. 1995; 8: 560-567

9. EKLER

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



T.C.
SELCUK ÜNİVERSİTESİ
SELÇUKLU TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı :2011/03	Toplantı Tarihi : 29.11.2011

Karar Sayısı 2011/39 Selçuk Üniversetesi Selçuklu Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Bahadır ÖZTÜRK'ün, "Flovonoidler ve Kanser Hüçrelerine Etkisi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 24.11.2011 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Yrd.Doç.Dr. Bahadır ÖZTÜRK'ün, "Flovonoidler ve Kanser Hüçrelerine Etkisi" adlı araştırmanın kabulüne, BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekreteryasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi.

Prof.Dr. Serdar GÖKTAŞ
Başkan

Prof.Dr. Duygu SINDIK
Üye

Prof.Dr. İ.Hknur UYSAL
Üye

Prof.Dr. Ayhan TAŞTEKİN
Üye

Doç.Dr.H.Serdar GERGERLİOĞLU
Üye

Doç.Dr. Mehmet ÖÇ
Üye

Doç.Dr. Hakan KARABAĞLI
Üye
(Katılmadı)

Yrd.Doç.Dr. Fatih KARA
Üye

Yrd.Doç.Dr. K.Macit HİSAR
Üye

Yrd.Doç.Dr.Cengiz EROL
Üye
(Kongrede)

Yrd.Doç.Dr. Bilge BURÇAK ANNAGÜR
Üye

Mahmut KESİK
Sekreterya

10. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Ankara'da doğdu. 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.