T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# BAZI KANSER HÜCRE HATLARINA ZAPRİNAST VE CARVACROL UYGULANMASININ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

**Hilal TESTİCİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK**

**KONYA-2020**

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# BAZI KANSER HÜCRE HATLARINA ZAPRİNAST VE CARVACROL UYGULANMASININ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

**Hilal TESTİCİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202052 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2020**

## ÖNSÖZ

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

Hem eğitim sürecimde hem de tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren ve her daim bana sabır gösterip yardımcı olan değerli danışmanım Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e, ders döneminde danışmanlığımı yapan kıymetli hocam Prof. Dr. Ali ÜNLÜ'ye emekleri için çok teşekkür ederim.

Eğitimim için emek veren ve desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV, Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA, Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU ve Doç. Dr. Esma MENEVŞE'ye çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda bilgi ve tecrübesine başvurduğum, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Hülagu BARIŞKANER'e yardımları ve yol göstericiliği için teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve her zaman desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım İlkay SAK'a ve Fatma AKAT'a teşekkürler.

Bilgisinden ve tecrübesinden faydalandığım, yardımını ve desteğini hiç eksik etmeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Öğretim Görevlisi Hakan VATANSEV'e teşekkürler.

Beni sevgi ve saygı ile bu günlere getiren, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme ve kardeşlerime sonsuz teşekkürler.

Her zaman ve her koşulda yanımda olup, sonsuz sabrı ve anlayışıyla bana destek olan eşime sonsuz teşekkürler.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---|---|
| **AGS** | Mide adenokarsinom hücre hattı |
| **AIF** | Apopitoz indükleyici faktör |
| **ALK** | Anaplastik lenfoma kinaz |
| **BAD** | Bcl-2 Antagonisti |
| **Bax** | p53 tümör baskılayıcı proteini kofaktörü |
| **BCL-2** | B-hücre lenfoma protein-2 |
| **Bcl-xL** | Bcl-2 bağlantılı protein |
| **Bid** | BH3 etkileşen domine sahip ölüm antagonisti |
| **BRCA1** | Meme kanserine yatkınlık geni 1 |
| **BRCA2** | Meme kanserine yatkınlık geni 2 |
| **cAMP** | Siklik adenozin monofosfat |
| **CDK** | Siklin bağımlı kinazlar |
| **CDK4** | Siklin bağımlı kinaz 4 |
| **CDK6** | Siklin bağımlı kinaz 6 |
| **cGMP** | Siklik guanozin monofosfat |
| **c-Myc** | Proto-onkogen transkripsiyon faktörü |
| **DMEM** | Dulbecco's modified eagle medium |
| **DMSO** | Dimetil sülfoksit |
| **DNA** | Deoksiribo nükleik asit |
| **DU-145** | Prostat kanseri hücre hattı |
| **E/CDK2** | Siklin bağımlı kinaz 2 aktivatörü siklin E |
| **E2F** | Estradiol transkripsiyon faktörü |
| **EGF** | Epidermal büyüme faktörü |
| **EGFR** | Epidermal büyüme faktörü reseptörü |
| **Er- β** | Östrojen reseptörü beta |
| **ER** | Östrojen reseptörü |
| **ErbB-2** | Tirozin kinaz reseptörünü kodlayan onkogen |
| **ErbB-3** | Tirozin kinaz reseptörünü kodlayan onkogen |
| **ErbB-4** | Tirozin kinaz reseptörünü kodlayan onkogen |
| **ER-α** | Östrojen reseptörü alfa |
| **FBS** | Fetal Bovin Serum |
| **GTPaz** | Guanozin Trifosfataz |
| **HCT116** | Kolon kanseri hücre hattı |
| **HEK** | İnsan Epitel Hücre Hattı |
| **HepG2** | Karaciğer kanseri hücre hattı |

| | |
|---|---|
| **HER** | İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü |
| **HER2** | İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 |
| **HER2/Neu** | Tirozin kinaz reseptörünü kodlayan proto-onkogen |
| **HL-60** | Promiyelositik hücre hattı |
| **IGF-1** | İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 |
| **INSS** | Uluslararası Nöroblastom Evreleme Sistemi |
| **JAG** | Karyokarsinom hücre hattı |
| **JEG** | Karyokarsinom hücre hattı |
| **LAN5** | Nöroblastoma hücre hattı |
| **LoVo** | Kolon kanseri hücre hattı |
| **MCF-7** | Meme kanseri hücre serisi |
| **MDA MB-231** | Meme kanseri hücre serisi |
| **mIBG** | Meta-İyodobenzilguanidin sintigrafisi |
| **MMP-2** | Matriks Metalloproteaz-2 |
| **Myc** | Transkripsiyon faktörlerini kodlayan proto-onkogen |
| **n-MYCN** | Proto-onkogen proteini |
| **NO** | Nitrik oksit |
| **Omi/HtrA2** | Aktif kaspaz inhibe eden protein |
| **p107** | Tümör baskılayıcı gen |
| **p130** | Tümör baskılayıcı gen |
| **p21** | Tümör baskılayıcı gen |
| **p27** | Tümör baskılayıcı gen |
| **p53** | Tümör baskılayıcı gen |
| **PARP** | Poli ADP riboz polimeraz enzim inhibitörü |
| **PBS** | Phosphate buffered saline |
| **Pc3** | Prostat kanseri hücre hattı |
| **PDE** | Fosfodiesteraz |
| **PDE1** | Fosfodiesteraz1 |
| **PDE10** | Fosfodiesteraz 10 |
| **PDE11** | Fosfodiesteraz 11 |
| **PDE2** | Fosfodiesteraz2 |
| **PDE3** | Fosfodiesteraz 3 |
| **PDE4** | Fosfodiesteraz 4 |
| **PDE5** | Fosfodiesteraz 5 |
| **PDE5A1** | Fosfodiesteraz 5A1 |
| **PDE5A2** | Fosfodiesteraz 5A2 |
| **PDE5A3** | Fosfodiesteraz 5A3 |
| **PDE6** | Fosfodiesteraz 6 |
| **PDE7** | Fosfodiesteraz 7 |
| **PDE8** | Fosfodiesteraz 8 |
| **PDE9** | Fosfodiesteraz 9 |
| **PHOX2B** | Homeobox transkripsiyon faktörü |
| **PI3K** | Fosfotidilinositol 3 kinaz |
| **PKA** | cAMP bağımlı protein kinaz |
| **PKG** | cGMP bağımlı protein kinaz |
| **PR** | Progesteron reseptörü |
| **PRA** | Progesteron reseptörü A |
| **PRB** | Progesteron reseptörü B |
| **RAS** | Proto-onkogen transkripsiyon faktörü |
| **Rb** | Retinoblastoma |

| | |
|---|---|
| **RIP1** | Reseptör etkileşimli protein 1 kinaz |
| **RIP3** | Reseptör etkileşimli protein 3 kinaz |
| **RNA** | Ribo nükleik asit |
| **ROS** | Reaktif oksijen türleri |
| **SHEP** | Nöroblastoma Hücre Hattı |
| **SK-N-AS** | Nöroblastom hücre serisi |
| **SK-N-MC** | Nöroblastoma Hücre Hattı |
| **SMAC/DIABLO** | Aktif kaspaz inhibe eden protein |
| **TK** | Tirozin kinaz |
| **TNBC** | Üçlü negatif meme kanseri |
| **TNF** | Tümör nekröz faktörü |
| **TRPM7** | Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı |
| **WS-1** | İnsan fibroblast hücre hattı |

## ŞEKİL DİZİNİ

**Şekil 1.1.** Uluslararası Kanser Ajansı 2018 yeni kanser vaka verileri (GLOBOCAN 2018).

**Şekil 1.2.** Uluslararası Kanser Ajansı 2018 kadınlarda kanser nedenli ölüm verileri (GLOBOCAN 2018).

**Şekil 1.3.** Hücre Siklusu.

**Şekil 1.4.** Uluslararası Kanser Ajansı 2018 kadınlarda yeni kanser vaka verileri (GLOBOCAN 2018).

**Şekil 1.5.** MCF-7 hücre hattı mikroskop görüntüsü.

**Şekil 1.6.** MDA MB-231 hücre hattı mikroskop görüntüsü.

**Şekil 1.7.** PDE ailesi substrat özgüllüğü.

**Şekil 1.8.** PDE5 yapısı.

**Şekil 1.9.** Zaprinast molekül yapısı.

**Şekil 1.10.** PDE5 inhibitörlerinin antikanser etki mekanizması.

**Şekil 1.11.** Carvacrol molekül yapısı.

**Şekil 3.1.** Zaprinastın hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı etkisi.

**Şekil 3.2.** Zaprinastın HEK, MDA MB-231, MCF-7 ve SK-N-AS hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı etkisi.

**Şekil 3.3.** Carvacrolün hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı etkisi.

**Şekil 3.4.** Carvacrolün HEK, MDA MB-231, MCF-7 ve SK-N-AS hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı etkisi.

**Şekil 3.5.** Carvacrolün HEK (A), MDA MB-231 (B) MCF-7 (C) ve SK-N-AS (D) hücreleri için $IC_{50}$ doz değerlerinin belirlenmesi.

**Şekil 3.6.** Hücrelerin kontrol (sadece hücre) ve carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) uygulamasının 48. saatteki apopitoz analizleri grafiği.

## ÇİZELGE DİZİNİ

**Çizelge 3.1.** HEK hücreleri apopitoz değerleri.

**Çizelge 3.2.** MCF-7 hücreleri apopitoz değerleri.

**Çizelge 3.3.** MDA MB-231 hücreleri apopitoz değerleri.

**Çizelge 3.4.** SK-N-AS hücreleri apopitoz değerleri.

# ÖZET


**T.C.**

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**


## Bazı Kanser Hücre Hatlarına Zaprinast ve Carvacrol Uygulanmasının Etkilerinin Karşılaştırılması


**Hilal Testici**

**Doç. Dr. Bahadır Öztürk**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi/ KONYA-2020**



Kanser, hücrelerde ve DNA'da oluşan hasar sebebiyle hücrelerin kontrolü kaybederek çoğalması veya anormal şekilde büyümesidir. Meme kanseri gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kadınlarda en sık gözlenen kanser türüdür. MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarıdır. SK-N-AS nöroblastoma hücre hattı, 10 yaşının altında olan çocuklarda en sık rastlanan ekstrakraniyal solid bir kanser türüdür. HEK, sağlıklı insan embriyonik epitel hücresidir. Zaprinast (2-(o-Propoksifenil)-8-azapurin-6-on) bir antiallerjen bileşik olarak ksantinlerin sentezi sırasında elde edilmiştir. Carvacrol, (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol), kekik ve/veya kekik esansiyel yağlarının ana bileşenidir. Antibakteriyel, antioksidan ve antikanser özelliklere sahip doğal bir bileşiktir. Bu çalışmanın amacı, zaprinast ve carvacrolün, HEK, MCF–7, MDA MB-231 ve SK-N-AS hücre hatlarında hücre proliferasyonuna ve apopitoza etkisinin ortaya konulmasıdır.

Çalışmamızda zaprinast (10-750 μM aralığında) ve carvacrol (50-1000 μM aralığında) belirlenen doz ve zaman aralıklarında farklı hücre serilerinin proliferasyonuna etkileri MTT hücre canlılık testi ile analiz edildi ve 48. saat sonunda $IC_{50}$ değerleri hesaplandı. Zaprinastın tüm hücrelerin proliferasyonunda etkisiz olduğu belirlendi. Hücrelere 48 saat boyunca $IC_{50}$ dozunda carvacrol uygulandı. Flow sitometri ile apopitoz analizi yapıldı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Sonuç olarak, HEK, MCF-7, MDA MB-231 ve SK-N-AS hücre hatlarında zaprinastın hücre proliferasyonuna etkisi olmamıştır. Carvacrol uygulanan hücre hatlarının ise doz artışı ile birlikte hücre proliferasyonu inhibe olmuştur. Apopitoz üzerine etkileri de ortaya konmuştur. Carvacrolün standart kanser tedavi yöntemlerine ek olarak takviye bir tedavi yöntemi olabilir. Çalışmamız, ilerde yapılacak olan moleküler düzeydeki çalışmalara destek ve yol gösterici olabilir.



**Anahtar sözcükler:** HEK, MCF-7, MDA MB-231, SK-N-AS, Zaprinast, Carvacrol, Proliferasyon, Apopitoz

# SUMMARY


**REPUBLİC OF TURKEY**

**SELCUK UNIVERSITY**

**INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES**


**Comparison of the Effects of Zaprinast and Carvacrol Application on Some Cancer Cell Lines**


**Hilal Testici**

**Doç. Dr. Bahadır Öztürk**

**DEPARTMENT OF MEDICAL BIOCHEMISTRY**



**MASTER'S THESIS / KONYA-2020**



Cancer is when cells lose control and multiply or grow abnormally due to damage to cells and DNA. Breast cancer is the most common cancer type in women in developed and developing countries. MDA-MB-231 and MCF-7 are breast cancer cell lines. SK-N-AS neuroblastoma cell line is the most common type of extracranial solid cancer in children under 10 years of age. HEK is a healthy human embryonic epithelial cell. Zaprinast (2- (o-Propoxyphenyl) -8-azapurin-6-one) was obtained during the synthesis of xanthines as an antiallergenic compound. Carvacrol is the main component of (2-methyl-5-(1-methylethyl) -phenol), thyme and / or thyme essential oils. It is a natural compound with antibacterial, antioxidant and anticancer properties. The aim of this study is to determine the effect of zaprinast and carvacrol on cell proliferation and apoptosis in HEK, MCF-7, MDA MB-231 and SK-N-AS cell lines.

In our study, the effects of zaprinast (in the range of 10-750 μM) and carvacrol (in the range of 50-1000 μM) on proliferation of different cell series were determined with MTT cell viability test and $IC_{50}$ values were calculated at the end of 48th hour. Zaprinast was found to be ineffective in proliferation of all cells. The cells were administered an $IC_{50}$ dose of carvacrol for 48 hours. Apoptosis analysis was performed by flow cytometry and compared with the control group.

As a result, zaprinast had no effect on cell proliferation in HEK, MCF-7, MDA MB-231 and SK-N-AS cell lines. Cell proliferation was inhibited with increasing dose of carvacrol treated cell lines. Its effects on apoptosis have also been demonstrated. In addition to the standard cancer treatment methods of Carvacrol, it may be a supplementary treatment method. Our study can support and guide future molecular studies.



**Keywords:** HEK, MCF-7, MDA MB-231, SK-N-AS, Zaprinast, Carvacrol, Proliferation, Apoptosis

**İÇİNDEKİLER**

**ÖNSÖZ** ..... **i**

**SİMGELER VE KISALTMALAR** ..... **ii**

**ŞEKİL DİZİNİ** ..... **v**

**ÇİZELGE DİZİNİ** ..... **vii**

**ÖZET**……..……..……..**viii**

**SUMMARY**……..……**ix**

**İÇİNDEKİLER** ..... **x**

**1. GİRİŞ VE AMAÇ** ..... **1**

1.1. Kanser ..... 3

1.2. Hücre Siklusu ..... 4

1.2.1. Hücre Siklusunun Evreleri ..... 6

1.3. Apopitoz ..... 7

1.4. Proliferasyon ..... 8

1.5. Onkogenler ..... 8

1.5.1. Fosfotidilinositol 3kinaz (PI3K) geni ..... 8

1.5.2. RAS geni ..... 8

1.6. Tümör Baskılayıcı Genler ..... 8

1.6.1. p53 geni ..... 9

1.6.2. Retinoblastoma ..... 9

1.7. Meme Kanseri ..... 9

1.8. Meme Kanseri ile İlgili Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler . 11

1.8.1. Büyüme Faktörü Reseptörleri ..... 11

1.8.2. Sinyal İletimi ile İlişkili Genler ..... 11

1.8.3. Steroid Reseptörleri ..... 12

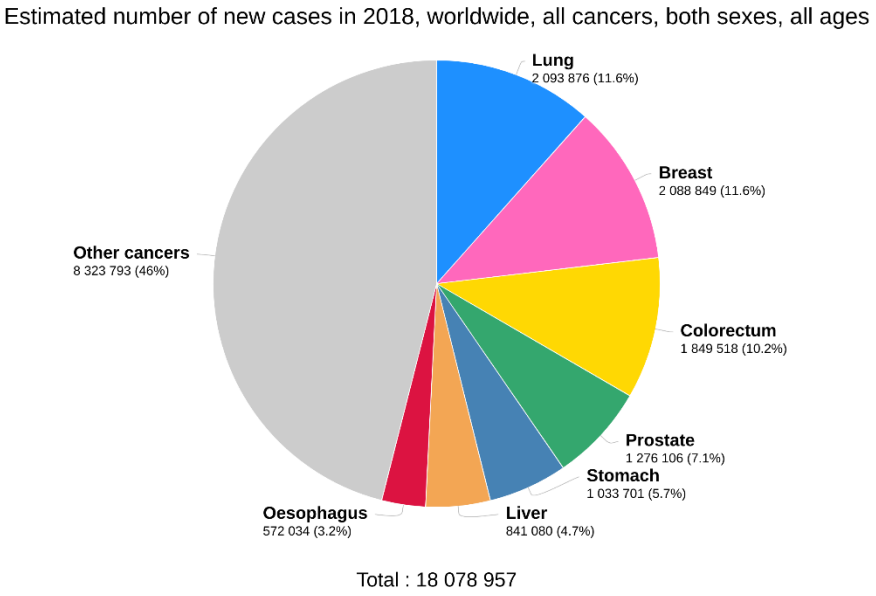
1.8.4. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler ..... 12

1.8.5. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri ..... 13

1.8.6. Meme Kanseri Risk Faktörleri ..... 13
1.8.7. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri ..... 14
1.9. Nöroblastoma ..... 15
1.9.1. Nöroblastoma ile İlgili Onkogenler ve Allelik Fazlalık ..... 16
1.9.2. Nöroblastomada Tümör Baskılayıcı Genler ve Allelik Kayıp .. 17
1.9.3. Nöroblastoma Evreleri ..... 17
1.9.4. Nöroblastoma Tedavi Yöntemleri ..... 18
1.10. Hücre Hatlarının Özellikleri ..... 19
1.11. Zaprinast ..... 21
1.12. Carvacrol ..... 25
**2. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 28**
2.1. Gereçler ..... 28
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ..... 28
2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar gereçleri ..... 28
2.2. Yöntem ..... 29
2.2.1. Hücre kültürü ..... 29
2.2.2. MTT ile Zaprinast'ın $IC_{50}$ Dozunun Belirlenmesi ..... 30
2.2.3. MTT ile Carvacrol'ün $IC_{50}$ Dozunun Belirlenmesi ..... 31
2.2.4. Flow Sitometri ile Apopitoz Analizi ..... 31
**3. BULGULAR ..... 32**
3.1. Zaprinast ve Carvacrolün Hücre Proliferasyonuna Etkisi ve $IC_{50}$ Doz Hesaplamaları ..... 32
3.2. Carvacrolün Farklı Kanser Hücre Hatlarında Apopitoza Etkisi ..... 40
**4. TARTIŞMA ..... 46**
**5. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 54**
**6. KAYNAKLAR ..... 55**
**7. ÖZGEÇMİŞ ..... 66**

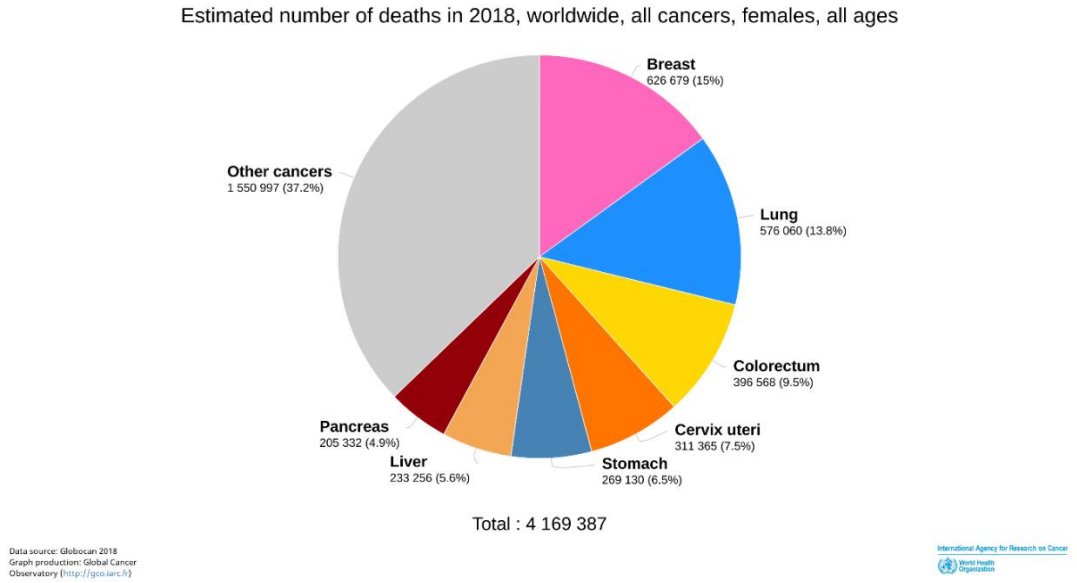
## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde bir halk sağlığı sorunudur. GLOBOCAN 2018 tahmini verilerine göre 18 milyon yeni kanser vakasının ortaya çıkacağı ve bunların 9,6 milyonunun ölümle sonuçlanacağı tahmin edilmektedir. En çok tanı konulan kanserler sırasıyla; akciğer kanseri (%11,6), kadınlarda gözlemlenen meme kanseri (%11,6), prostat kanseri (%7,1) ve kolon kanseri (%6,1) olarak belirtilmiştir (Bray ve ark 2018) (**Şekil 1.1.**).




**Şekil 1.1.** Uluslararası Kanser Ajansı 2018 yeni kanser vaka verileri (GLOBOCAN 2018) (https://gco.iarc.fr/today/home).

Meme kanseri kadınlarda teşhis edilen yeni kanser türlerinin %30'unu oluşturur. Erkeklerde meme kanseri görülme sıklığı kadınlara göre 100 kat daha azdır. Dünya çapında kadınlarda kanserden kaynaklanan ölüm nedenleri arasında meme kanseri ilk sırada yer almaktadır. Meme kanseri, kadınlarda tüm kanser vakalarının %25'ini ve kanser kaynaklı ölümlerinin %15'lik kısmını kapsamaktadır (Gupta ve ark 2015, Igci ve ark 2019, Siegel ve ark 2019) (**Şekil 1.2.**).




**Şekil 1.2.** Uluslararası Kanser Ajansı 2018 kadınlarda kanser nedenli ölüm verileri (GLOBOCAN 2018) (https://gco.iarc.fr/today/home).

Risk faktörü, bir hastalığa yakalanma olasılığının artması demektir. Meme kanserini durdurma yollarından biri, kadınları meme kanseri riskleri ve oluşabilecek semptomlar hakkında bilgilendirmektir. Kadınlara meme kanseri uygun şekilde tanımlanmalı, gerekli tanı yaklaşımları ve muayeneler hakkında bilgi verilmesi gerekmektedir. Bazı meme kanseri risk faktörleri yaş, bağıl vücut ağırlığı, eksojen ve endojen hormon konsantrasyonları ve metabolizması, radyasyona maruz kalma, laktasyon, alkol tüketimi ve aile meme kanseri öyküsü şeklindedir (Moorman ve Terry 2004, Gupta ve ark 2015).

Nöroblastoma, çocuklarda gözlenen bir sempatik sinir sistemi kanseridir. Primer tümör en çok adrenal medulladan ya da diğer yerlerdeki sempatik ganglionlardan kaynaklanmaktadır. Tüm çocukluk çağı malignitelerinin %8-10'unu oluşturur ve çocukluk çağı kanserine bağlı ölümlerin %15'ini oluşturmaktadır (Arumugam ve ark 2019, Elbal ve ark 2019). Nöroblastoma etiyolojisi kesin olarak bilinmemekle birlikte bazı risk faktörleri bulunmaktadır. Bunlar, yaş, gen amplifikasyonları, allelik fazlalık veya allelik kayıp ve tümör baskılayıcı genlerin kaybolmasıdır (MacFarland ve Bagatell 2019).

İnsanlık tarihi boyunca bitkiler ilaç olarak kullanılmıştır. 1994 yılında Amerika'da Diyet Takviyesi Sağlık ve Eğitim Yasası'nın yürürlüğe girmesinden

itibaren, tutarsız düzenleyici uygulamalar bitkisel takviyelerin kullanımının yaygınlaşmasına ve pozitif ayrımcılığa uğramasına sebep olmuştur. Günümüzde, kanser hastaları çoğunlukla bitkisel ürünleri standart tedavi yöntemleri ile birlikte kullanmaktadırlar. Kanser hastalarının bitkileri tedaviye takviye olarak kullanmasının nedenleri arasında insan sağlığını iyileştirmesi, nüks riskini azaltması ve kanser tedavilerinin yan etkilerini azaltması yer almaktadır (Yeung ve ark 2018).

Zaprinast (2- *O* - propropoksifenil -8-azapurin-6-on), ksantinlerle ilgili bir anti-alerji bileşiğinin incelenmesi sırasında keşfedilmiştir ve fosfodiesteraz5 (PDE5) spesifik bir inhibitördür, cGMP'yi hidrolize eder (Gibson 2001). PDE5 inhibitörleri, belirli kanser tiplerinin ortak kemoterapötik ilaçlara duyarlılığını artırabilmektedir (Peng ve ark 2018). PDE5 inhibitörleri, cGMP'ye etki ederek hücre büyümesini azaltır ve apopitozu indükler. Bundan dolayı, PDE5 spesifik inhibitörler yeni bir etki mekanizmasına sahip güçlü antikanser ilaç olma potansiyeline sahiptirler (Das ve ark 2015).

Carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil)) kekik esansiyel yağında bulunan sıvı fenolik yapıda bir monoterpenoiddir. Antibakteriyel, antioksidan ve antikanser özelliğe sahiptir. Carvacrol ile ilgili *in vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalarda, farklı genlere ve apopitotik yolaklara etki ederek apopitozu indüklediği ortaya konmuştur (Sharifi-Rad ve ark 2018).

Literatür incelendiğinde, zaprinast ve carvacrolün antikanser özellikleri ile ilgili çalışmalar yer almaktadır. Çalışmamızın amacı; farklı kanser hücre hatlarına farklı dozlarda zaprinast ve carvacrol uygulayarak $IC_{50}$ değerlerini belirlemek ve proliferasyon ve apopitoz üzerindeki etkilerini incelemektir. Klasik kanser tedavilerine ek olarak bitkisel tedavi yöntemlerinin önemi ve kullanımının iyiden iyiye artması nedeniyle yaptığımız bu çalışmamızla literatüre bu yönde katkıda bulunacağımızı düşünmekteyiz.

### 1.1. Kanser

Kanser kelime anlamı olarak, bir organ veya dokudaki hücrelerin anormal olarak çoğalmasıdır. Kanser vücudun çeşitli bölgelerinde hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan 100'den fazla tür barındıran hastalık grubudur. Farklı kanser tipleri gözlenmesine rağmen, hepsi anormal hücrelerin kontrolsüz bir biçimde

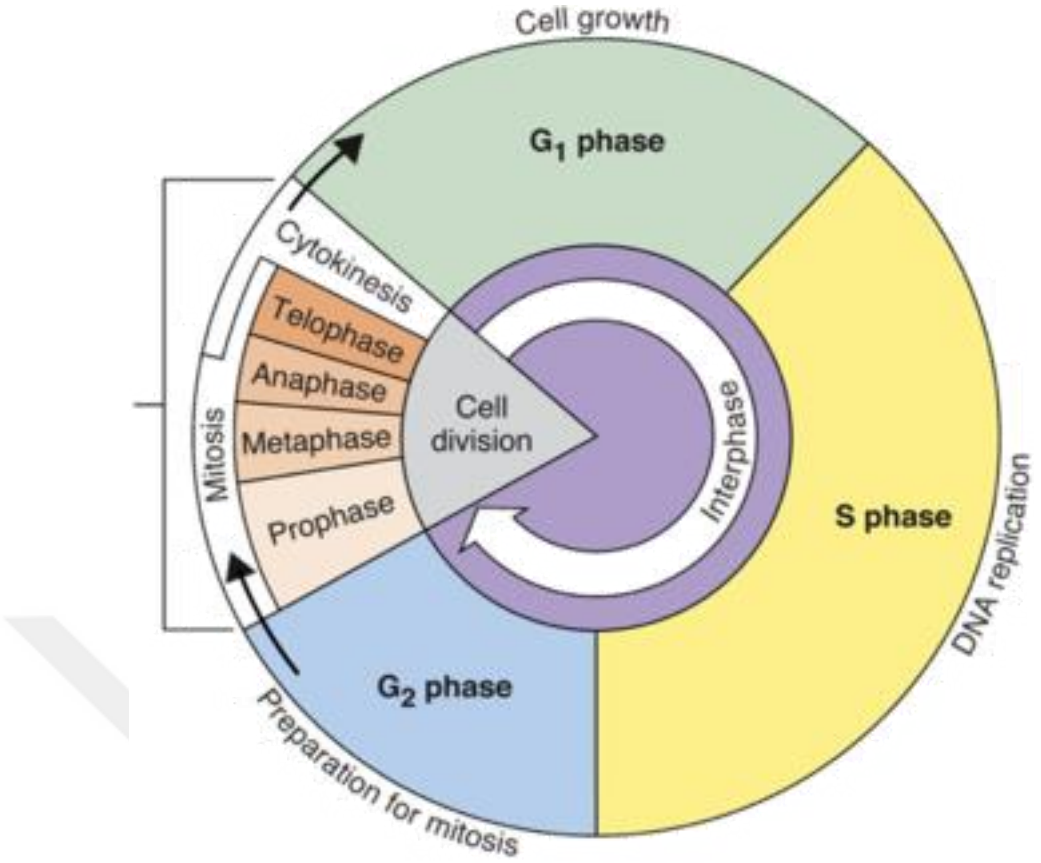
çoğalması ile başlar. Eğer tedavi edilmezse vücutta ciddi sorunlara, hatta ölüme bile neden olabilir (Bayraktar). Kanser hücreleri malignder, yani yakındaki dokulara yayılabilir. Taşındıkları farklı bölgelerde kanser hücreleri büyüdükçe tümör kolonileri oluştururlar ve büyümeye devam ederler. Tümörler büyüdükçe, bazı kanser hücreleri kopabilir ve vücuttaki farklı bölgelere kan veya lenf sistemi yoluyla taşınabilirler ve tümörün orijinal yerinden uzak bir yerde yeni tümörler oluşturabilirler.

Kanser oluşumunun %70-90'ı çevresel risk faktörlerine maruz kalma ile bağlantılıdır (Thong ve ark 2019). Kanserden dolayı gerçekleşen ölümlerin yaklaşık üçte biri; davranışsal ve beslenme ile ilgili faktörlerinden kaynaklanır. Sigara kullanımı, yüksek vücut kütle indeksi, meyve ve sebzeyi az tüketme, fiziksel aktivite yetersizliği ve alkol kullanımı bu nedenlerin başında gelmektedir (Türkyılmaz ve ark 2018).

Kanser hücreleri kendi proliferasyonlarını yapabilme yeteneğine sahiptir. Bu yeteneklerini kendi büyüme hormonlarını sentezleyerek sağlarlar. Tümör hücreleri hücre dışı yüzeyle etkileşime girmeden alt alta ya da üst üste büyüyebilirler. Belirli bir yoğunluğa gelen normal hücrelerin proliferasyonu durur. Fakat tümör hücrelerinin proliferasyonu sürekli devam edebilir (Vatansev 2014).

### 1.2. Hücre Siklusu

Hücre siklusu, hücrelerin bölünmesini sağlayan birçok mekanizma ile kontrol edilir. Hücre siklusu, DNA replikasyonu ile kromozomların iki ayrı hücreye ayrılması ile elde edilen ardışık iki işlemden oluşur. Hücre siklusu 4 faza ayrılır; bunlar G1, S, G2 ve M fazlarıdır (Vermeulen ve ark 2003) (**Şekil 1.3.**).




**Şekil 1.3.** Hücre Siklusu (socratic.org).

Vücudumuzdaki hücrelerin çoğu, biyokimyasal ve işlevsel olarak aktif haldedirler. Yetişkin bir insanda ortalama olarak, saniyede yaklaşık 25 milyon, her 24 saatte bir yaklaşık 2 trilyon hücre bölünmesi meydana gelir. Hücre siklusu, besin ve büyüme faktörleri haricinde birçok sinyalden etkilenir. Bunlar; inhibitör faktörler ve hücre dışı matriks ile etkileşim gibi çeşitli hücre veya sistemin dışında oluşan sinyallerden dolayı olabilir. Bunun gibi birçok faktör çoğalmayı teşvik eder veya çoğalmayı baskılayan hücre içi sinyal yollarını uyarır. Hücre, bu sinyallerin tümünü bir bütün haline getirir ve denge sağlayarak yeni hücrelerin oluşmasını sağlar (Malumbres ve Barbacid 2001).

Hücre siklusunun ilerlemesi, hücre bölünmesi ve çoğalması, tanımlanmış bir dizi aşamadan geçmektedir. Hücre, proliferatif olmayan, durgun G0 fazından, hücre bölünmesi için hücrenin hazırladığı ilk boşluk fazına veya G1 fazına geçer. Bu süreç hem transkripsiyon ve translasyonel programları içeren bir süreç olup, hücre bölünmesinin düzenlendiği, tek hücreden iki hücre oluşumunda kayıp olmadan meydana gelecek makromoleküllerin tamamlayıcı olması için gerekli proteinleri

içerir. Bu aşamada büyüme faktörlerinden herhangi biri azalırsa veya büyüme faktörleri olmazsa, hücre bölünmez. Daha sonra hücre her bir kromozomun bir kez çoğaltıldığı DNA sentez fazına yani S fazına girer. S fazının sonrasında yaklaşık 3 ila 5 saat süren G2 fazı ile ikinci bir boşluk fazı olur. Hücre daha sonra kromozomların ayrıldığı hızlı bir faz olan yaklaşık 1 saat süren mitozu yani M fazını başlatır. Mitozun tamamlanmasıyla oluşan hücreler durgun hale gelebilir veya çevre koşullarına bağlı olarak ikinci bir hücre bölünmesi aşaması başlatabilir. Hücre döngüsünün farklı evrelerindeki ilerleme, translasyon, transkripsiyon veya hücre bölünmesi için gerekli olan moleküllerin aktivitesine bağlıdır (Malumbres 2020).

### 1.2.1. Hücre Siklusunun Evreleri

G1 fazında, yeni oluşacak olan iki hücre için, hücre proteinleri ve organelleri (mitokondri ve ribozomlar gibi) sentezlenir, boyut olarak büyür ve yeterli miktarda oluşumları sağlanır. Bu sebeple, bir G1 veya G1/S evrelerinin kontrol noktaları hücre tarafından belirlenir. G1/S evresi, hücre için ana karar merkezidir. S fazı, hücrenin DNA sentezini sağlaması için kontrol mekanizmasını oluşturur. Hücre G1 evresini geçerse, S fazına girer ve bölünme geri dönüşü olamayacak bir şekilde başlar. Bu aşamada hücrenin DNA replikasyonuna devam etmesi için bazı iç ve dış koşullar mevcuttur. Bu koşullar, hücre boyutu (iki yeni hücrenin oluşabilmesi için yeterli büyüklükte olması), besin maddeleri (hücrenin bölünmesi için yeteri miktarda enerji ve besin bulunması), moleküler sinyaller (büyüme faktörleri gibi) ve DNA bütünlüğü (bir sonraki aşama için DNA hasarı olmadığının kontrolü) şeklindedir. Hücre bu kriterlerin hepsini sağlarsa, S fazına geçer, sağlamazsa G0 evresine dönüş yapar ve hücre siklusu gerçekleşmez.

S fazında, DNA replikasyonu gerçekleşir. DNA, sentrozom ve mikrotübül düzenleyici yapı ile birlikte kopyalanır ve kromozom sayısının iki katına çıkması sağlanır.

G2 fazı, ikinci boşluk fazı olarak da adlandırılır. Bu evre DNA sentezinden sonra başlar. Bu süreçte hücre mitoz bölünmeye hazır hale gelmek için büyümeye devam eder. G2 fazında, S fazındayken DNA'nın hasar görmeden kopyalanması sağlanır. Böylece kardeş kromatidler iki hücre için bölünebilecek duruma gelir. G2 evresinde hata tespit edilirse, hata onarılıp düzelene kadar hücreler G2 fazında kalacaktır; eğer hasar düzeltilemezse hücre ölebilir (Fonseca ve Bettencourt-Dias

2019).

M fazı, mitoz bölünmenin gerçekleştiği kısımdır. M fazının ilerlemesi, düzenlenmesi protein fosforilasyonu ve proteolize dayanır. M fazı, beş aşamadan oluşur; profaz, metafaz, anafaz, telofaz şeklindedir. Mitoz sonunda hücre bölünmesi gerçekleşir, yani ana hücreden yeni iki hücre oluşur. Oluşan yeni hücrelerin genetik yapısı ana hücre ile aynı yapıdadır. Hücre, bu aşamadan sonra tekrar G1 fazına veya G0 fazına dönerek canlılığını devam ettirir (Nigg 2001).

### 1.3. Apopitoz

Apopitoz kavramı ilk olarak 1972'de Kerr Wyllie tarafından tanımlanmıştır. Apopitoz fizyolojik ve programlı bir ölüm şekli olup, hücre çoğalması, hücre sayısının kontrolü ve hücre ölümü arasındaki dengeyi sağlar (Kerr ve ark 1972).

Hücre ölümü, nekroz ve apopitoz olmak üzere iki şekilde olur. Nekroz ve apopitoz arasında morfolojik ve biyolojik farklılıklar bulunur. Nekroz hücrenin kimyasal ve fiziksel olarak zarar görmesinin ardından ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Hücre mitokondrisi başta olmak üzere sitoplazmik hücre organelleri hasar görür ve hücre membranı permeabilite özelliğini kaybedip şişmeye başlar. Böylece hücre ölümü gerçekleşmiş olur (Ayaşlıoğlu 2001).

Apopitoz ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki yolla uyarılır. Ekstrinsik yol, tümör nekroz faktörünün (TNF), hücre yüzeyinde bulunan uygun ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlar (Sayers 2011). İntrinsik yol, mitokondriyal yol olarak da bilinir. Bu yol oksidatif stres, sitotoksik ilaçlar gibi birçok durumdan etkilenebilir. Apopitozun intrinsik yolunda bazı kaspazların aktivasyonu, dış mitokondriyal zarın Bcl ailesinin proapoptotik üyelerini aktive etmesiyle ilişkilidir. Birçok sitotoksik uyarıcı mitokondriyal dış membranın geçirgenliğini tetiklemek için mitokondri üzerinde bir araya gelir. Membran geçirgenliği sırasında Bcl-2 ailesine ait proteinler, biyoenerjetik metabolit akışını düzenleyen proteinler ve bileşenler, mitokondriyal lipitler ile düzenlenir. Dış mitokondriyal zarın bozulması ile bir dizi protein salgılanır. Bunlara sitokrom c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF ve endolnükleaz G örnek gösterilebilir (Fulda ve Debatin 2006).

Kaspazlar ölüm sinyalinin yürütülmesini sağlayan son yoldur. Bu yolda bir dizi proteaz aktive olur. Apopitozda görev alan kaspazlar, kaspaz-3, kaspaz-6,

kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9 şeklindedir. Deosiribonükleaz inhibitörü olan kaspaz-3, intrinsik ve ekstrinsik apopitotik yolları aktive ederek apopitozu indükler (Ghobrial ve ark 2005).

### 1.4. Proliferasyon

Hücre çoğalması veya proliferasyonu hücre bölünmesi üzerinden gerçekleşir. Hücrelerin yeni iki yavru hücre oluşturmak için ayrılmasına hücre bölünmesi denir. Ökaryotik hücrelerde bölünme, G1, S, G2 ve M olarak dört aşamadan oluşur. Hücre bölünmesinde çeşitli kontrol noktaları da vardır. Kanser oluşumuna sebep olan mutasyonların bir kısmı hücre bölünmesini kontrol eden sinyal yolaklarında olur. Rb, p53 gibi hücre siklusunu baskılayan düzenleyicilerin yok olması hücre proliferasyonunu arttırır. Ras, Myc gibi genler de hücre bölünmesinin artmasına sebep olur. Bu genlerin artmasıyla hücrenin normal proliferasyonu bozulur, kontrolsüz hücre çoğalması meydana gelir ve bunun sonucunda kanser oluşur (Dray 2011).

### 1.5. Onkogenler

Proto-onkogenler, hücrelerin büyümesi, çoğalması ve apopitoz için alınan sinyaller gibi birçok yapının sentezlenmesini sağlayan genlerdir (Yokuş ve Çakır 2012). Proto-onkogenler, kromozomal düzenlemeler, mutasyonlar, artmış gen ifadeleri sebebiyle aktif hale gelir ve onkogen haline dönüşür (Baykara 2016).

#### 1.5.1. Fosfotidilinositol 3kinaz (PI3K) geni

PI3K sinyalleri hücre büyümesini, hücre sağkalımını ve metastazı etkiler. PI3K, büyüme faktörleri ve hücre dışı matriksten gelen sinyallerle aktive edilir (Lee ve Muller 2010).

#### 1.5.2. RAS geni

RAS proteinleri, hücre büyümesi, hayatta kalma ve farklılaşma gibi sinyal yollarını kontrol eder. RAS proteinleri, bazı hücre dışı uyarıcılara yanıt olarak GTPaz ailesine aittir. Günümüzde kanserin yaklaşık %20'sinin, RAS genlerinde meydana gelen mutasyonlardan dolayı oluştuğu tahmin edilmektedir (Rajalingam ve ark 2007).

### 1.6. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin belirlenmesi, hücre büyümesinin

kontrolü ve düzenlenmesinde ayrıca kanser oluşumunun açığa kavuşmasına yardımcı olmuştur (Yokuş ve Çakır 2012).

### 1.6.1. p53 geni

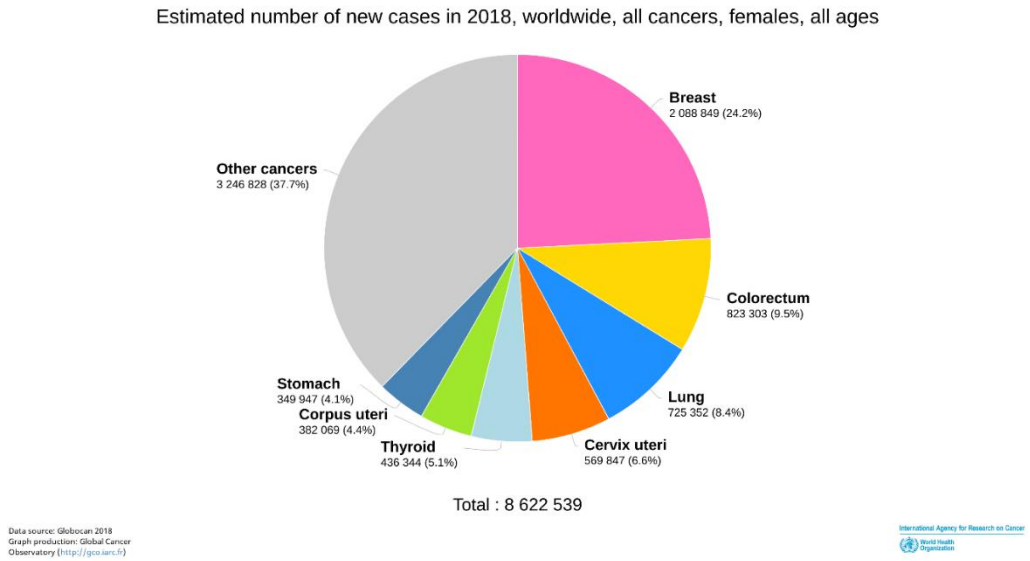
p53 geni, DNA onarımı genomik stabilite, hücre döngüsü kontrolü, yaşlanma ve apopitoz gibi birçok hücresel fonksiyonda görev alan bir gendir. DNA replikasyonu ve G1, G2 kontrol noktalarında hücre siklusunun durması, sırasıyla DNA onarım süreçlerine yardımcı olur, mutasyonları önler (Harris 1996). DNA hasarı olan ve tamir edilemeyen hücreyi apopitoza götürür (Gülsar ve ark).

### 1.6.2. Retinoblastoma

Retinoblastoma (Rb) geni, mitoz, hücre metabolizması, DNA replikasyonu, apopitozda görev alan bir gendir. Retinoblastoma gen yolağında beş protein yer almaktadır. Bunlar; CDK4 ve CDK6 gibi siklin bağımlı protein kinazlar, p107, p130, Rb proteinleri ve E2F transkripsiyon faktörüdür. Bu yolak sadece büyümeyi baskılayan sinyallerin haricinde, büyümeyi uyaran sinyaller ve bu bileşenlerinin aktif hale gelmesini veya inhibe olarak hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır (Demet Akdeniz 2014).

## 1.7. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda görülen en yaygın kanser türü ve ölüm nedenidir (Key ve ark 2001) (**Şekil 1.4.**). Diğer kanser türleri arasında akciğer kanserinden sonra ölümle sonuçlanan ikinci kanser türüdür. Meme kanseri, ülkemizde kadınlarda rastlanan tüm kanser türleri içinde %23,4'lük kısmı oluşturur ve ilk sırada yer alır. Her dört kadından birinde meme kanseri gözlenmektedir (Aksoy ve ark 2015).




**Şekil 1.4.** Uluslararası Kanser Ajansı 2018 kadınlarda yeni kanser vaka verileri (GLOBOCAN 2018) (https://gco.iarc.fr/today/home).

Meme kanseri, süt kanallarında yer alan epitelyal hücrelerin sebep olduğu heterojen bir tümördür. Meme kanseri, moleküler bir gruplandırma ile bireysel tedavilerin tasarlanmasını ve uygulanmasını sağlar. Bundan dolayı hastalığa bağlı sağkalımda önemli gelişmelere yol açan nadir tümör tiplerinden biridir. Meme kanseri alt gruplar içerir. Alt gruplar şu şekildedir (Lv ve ark 2016):

- Luminal A: ER (+), PR (+), HER-2 (-), ErbB-2 (-)
- Luminal B: ER (±), PR (±), HER-2 (+), ErbB-2 (±)
- TNBC (Triple Negative Breast Cancer): ER (-), PR (-), HER-2 (-),
- Normal meme benzeri: ER (-), PR (-), ErbB-2 (-), CK5/6 (-), EGFR (-)
- Bazal benzeri: ER (-), PR (-), ErbB-2 (-), CK5/6 (+), EGFR (+)

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 pozitif (HER2 +) olan meme kanserleri ErbB-*2* amplifikasyonuna ve aşırı gen ekspresiyonuna sahiptir. Farklı anti-HER2 tedavileri ile kontrol altına alınabilir. Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif olan meme kanserleri hormonal tedavi yöntemlerine çoğunlukla olumlu cevap verirler. TNBC olan hastaların yaklaşık %20'si kemoterapi tedavisine pozitif cevap vermektedir ve moleküler hedefli bir tedavi yöntemi yoktur (Polyak 2011).

## 1.8. Meme Kanseri ile İlgili Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler

Kanser ve kanser oluşumu hücresel yolakları ve genetik faktörleri etkileyen çok aşamalı bir süreçtir. Onkogenler, kanser oluşumunu tetikleyen genleri belirtir. Tümör baskılayıcı genler ise kanser oluşumunun engellemesini sağlar. Bu değişimler, tipik meme kanserinde oluşan çok sayıda değişiklik ve içerdiği biyolojik yolakların etkileşimleri sebebiyle karmaşıktır (Osborne ve ark 2004).

### 1.8.1. Büyüme Faktörü Reseptörleri

**EGFR:** Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi ligandlarla aktive edilebilen ErbB reseptör ailesinin bir üyesidir. TNBC hastalarının yaklaşık %40'ında EGFR aşırı ekspresyonu mevcuttur (Liao ve ark 2019). EGFR bazı transmembran glikoproteinlerinden oluşur. EGFR'nin mutasyonlarının aktive edilmesi, kontrolsüz hücre proliferasyonu ile sonuçlanır (Hashmi ve ark 2019). EGFR, ErbB-2, ErbB-3 ve ErbB-4 proteinlerini içine alan bir reseptördür. ErbB reseptörlerinin aktivasyonu, reseptörlerin etrafındaki hücrelerin aynı hücrelerin eksprese olmasıyla ve EGF büyüme faktörlerine bağlanmasıyla olur. Bazı proto-onkogenler, büyüme faktörü reseptörlerini, büyüme faktörüne sahip olan proteinleri veya büyüme faktörleri için hücre içi sinyal iletim yolunda bulunan proteinleri kodlar. Ayrıca, aktive olmuş hücresel proto-onkogenler, endojen üretimi veya kanser hücrelerinin peptit büyüme faktörlerine tepkisini kontrol edebilir (Normanno ve ark 2006).

**ErbB2 (HER2/neu):** ErbB-2 (HER2/neu)'nin, meme kanserlerinin %25-30'unda arttığı görülür. Bu reseptörler hücre zarında bulunur. ErbB-2, transmembran bölgesine, sitoplazmik trozin kinaz alanına ve hücre dışı bir ligand bağlama bölgesine sahiptir. Alıcılara ligand bağlanması, ilgili alıcı bölgeler, intrinsik kinaz bölgesinin aktivasyonu ve sitoplazmik kuyruk içindeki spesifik tirozin kalıntılarının fosforilasyonu ile sonuçlanır. Proteinler, bu fosforillenmiş bölgeler üzerinde kenetlenir. Hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması ve metastaz oluşumu için çeşitli hücre içi sinyal yolaklarının aktive olmasına sebep olur (Reid ve ark 2007).

### 1.8.2. Sinyal İletimi ile İlişkili Genler

**c-Myc:** c-Myc, hücre faklılaşmasında, proliferasyonunda ve apopitozda görev alan bir proteindir (Liao ve Dickson 2000). c-Myc etkili bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre metabolizmasının %15'inin kontrolünü sağlar. Ayrıca meme kanserinde

kanser oluşumunu sağlayan güçlü bir aktivatördür. c-Myc, E/Cdk2 gibi aşağı akış hedeflerini aktif hale getirir ve CDK inhibitörü p21'i baskılayarak hücre siklusunda G1-S geçiş noktasını kontrol eder. Meme kanseri hücrelerinde, c-Myc hücre döngüsü üzerinde etkili olan ana mekanizmadır. p27 transkripsiyonunu baskılayarak ya da inhibe ederek proliferasyonu kolaylaştırır (Xu ve ark 2010).

### 1.8.3. Steroid Reseptörleri

**Östrojen reseptörü (ER) ve Progesteron reseptörü (PR):** Östrojen salgılanması steroid reseptör mekanizmasıyla gerçekleşir. Östrojen hücre membrandan yayılır, nükleer monomerik ER proteinine bağlanır. Bu durum ER'de bir değişikliğe sebep olur ve reseptör dimerizasyonu oluşur. Meydana gelen yeni kompleks daha sonra, transkripsiyon artıran östrojene duyarlı genlerin östrojenle ilgili olan bölgelerine doğrudan ya da dolaylı olarak bağlanır. Belirlenmiş yardımcı aktivatörler dokuya özel olan nükleer ER yardımcı proteinleri ve yardımcı baskılayıcılar yardımıyla kesin hücresel cevap sağlanır. ER'nin iki farklı izoformu vardır. Bunlar; ERα ve Erβ'dır. ERβ'nin prognostik değeri belirsizdir. ERα'nın aşırı ekspresyonu meme kanseri hastalarında prognostik ve prediktif bir özelliktir. PR, meme kanseri tedavisi için hastalarda sıklıkla ölçülür. ER pozitif ve PR negatif olan hastaların prognozu, PR pozitif meme kanserine sahip hastalara göre daha kötüdür. PR, PRA ve PRB olarak iki izoforma sahiptir. PR, ER yolağının işlevsel durumunu gösterir (Hammond ve ark 2010).

### 1.8.4. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler

**Bcl-2 – Apopitoz genleri:** Bcl-2 proteini, Bcl ailesinin apopitozu düzenleyen bir üyesidir (Callagy ve ark 2008). Bcl-2 proteini mitokondriyal apopitoz yolağında görev alan bir inhibitördür. Bid ve Bax gibi pro-apoptotik proteinleri bloke eder, böylece sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivasyonunu engeller. Bcl-2, dış mitokondriyal zardaki voltaja bağlı anyon kanalının aracılık ettiği antikanser ilaçlara bağlı apopitozu önleyebilir. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu kemoterapiye direnç sağlayabilir ve meme kanseri, kolon kanseri ve prostat kanseri gibi farklı kanser türlerinde görülür (Emi ve ark 2005).

**Telomeraz:** Telomeraz, bir RNA bileşeni olmasının haricinde birkaç protein alt birimini içeren ribonükleoprotein kompleksidir (Baykal ve ark 2004). Günümüzde meme kanseri için uygulanan tedaviler, toksik olan ve genellikle kullanılan ilaca

karşı direnç görülmesi ile sonuçlanan tedavilerdir. Kromozomların uçlarını yani telomerleri koruyan hücresel ters transkriptaz olan telomeraz, meme kanserlerinin büyük çoğunluğunda yani meme kanserlerinin %90'ından fazlasında aktive olur (Herbert ve ark 2001).

### 1.8.5. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri

**BRCA1 ve BRCA2 genleri:** Meme kanserinde BRCA1 geni 17. kromozomda ve BRCA2 geni 13. kromozomda yer almaktadır. BRCA1 ve BRCA2, DNA çift sarmalında gerçekleşen kopmaların tamirinde görev alan tümör baskılayıcı genlerdir. Meme kanseri oluşma riski BRCA1 gen mutasyonu taşıyan kişilerde %70-80, BRCA2 geni mutasyonu olanlarda ise %50-60'tır (Bracci ve ark 2019). BRCA1, çoğu hücrede ve dokuda bulunur. BRCA1, hücre döngüsünün ilerlemesi, DNA hasarı tepkisi, gen transkripsiyonun düzenlenmesi ve çoğaltılması gibi birçok hücresel düzenleme yolunda rol oynar. Ayrıca BRCA2 vücuttaki hücrelerde ve dokularda eksprese olur. DNA onarımında görev alır (Hawsawi ve ark 2019).

### 1.8.6. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Kadınlarda en çok görülen kanser türü meme kanseridir ve birçok risk faktörü vardır (Dikmen ve Bayraktar 2019). Meme kanseri, biyolojik ve klinik açıdan farklı özellikler gösterir. Meme kanseri oluşumu için çok fazla risk faktörü olmasına rağmen meme kanseri olan kadınların %75'inde hiçbir risk faktörü bulunmamaktadır (Eroglu ve ark 2010, Husejko ve ark 2019). Kadınlarda meme kanseri görülme riskini arttıran faktörler şunlardır;

- Ailede meme kanseri öyküsü
- Yaş
- Menstrüel dönem
- Erken menstrüel dönem başlangıcı
- Meme kanseri gelişimine yatkın genler taşımak
- Kişisel meme kanseri öyküsü
- Östrojen tedavisi
- Oral kontraseptif kullanımı
- Daha önce memede kansere yönelik bir lezyonun gözlenmiş olması
- Meme biyopsisi alınması

- Over veya uterus kanseri öyküsü
- Radyasyona maruz kalma
- Doğum öyküsü ve ilk doğum yaşı
- Sigara ve alkol kullanımı
- Obezite ve beslenme alışkanlıkları
- Geç menapoz
- Emzirme

### 1.8.7. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Standart olarak uygulanan kanser tedavileri olmasına rağmen her insanın farklı DNA'ya sahip olmasına, onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin varlığına ve hastalığın safhasına bağlı olarak uygulanacak tedavi yöntemleri değişiklik gösterir. Kanser tedavisinin haricinde kansere neden olan etmenler, kanserin engellenmesi, psikolojik ve sosyal destek verilmesi hasta için önemlidir. Bu sebeple kanser tedavisi tıbbın birçok dalını kapsayan multidisipliner bir çalışma gerektirir (Baykara 2016).

- **Radyoterapi:** Radyoterapi, iyonize ışın kullanılarak kanser hücrelerini öldürme prensibine dayanan tedavi yöntemidir. Vücudun belli bir bölgesini hedef alarak uygulanabilmesinin dışında, tüm vücudu hedef alacak şekilde de iyonize radyasyon uygulanabilir. Bu yöntemi geliştirmekteki asıl hedef, kanser hücrelerini öldürmek için maksimum etki gösterirken sağlıklı hücre üzerinde minimum hasar verecek olan yöntemi geliştirmektir. Ayrıca cerrahi müdahale öncesi tümör boyutunu küçültmek için kullanılan bir yöntemdir.
- **Kemoterapi:** Kemoterapinin amacı, kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlar kullanarak öldürmektir. Radyoterapide olduğu gibi kemoterapi de cerrahi girişim öncesinde tümörün boyutunu küçültmek üzere kullanılabilecek bir tedavi yöntemidir.
- **Hormonal Tedaviler:** Hormonlar vücutta üretilen proteinler ya da ihtiyaca göre dışarıdan da alınabilen kimyasal maddelerdir. Üretim sonrası, hormonlar dolaşıma katılıp endokrin sinyaller vasıtasıyla dokuların ve organların davranışını kontrol ederler. Ayrıca kanser tedavisinde ilaç olarak da kullanılabilirler. Meme kanseri tedavisinde kullanılan hormonlar, seks hormonlardır. Hormon ilaçları, kemoterapi ilaçlarına benzeseler de en büyük

farkı vücutta doğal yollarla üretilerek hücreye bağlanmak ve tümör büyümesini engellemektir.

- **Cerrahi Yöntem:** Cerrahi yöntem, radyoterapi ve kemoterapi ile birlikte uygulanabilmesinin haricinde tek başına da sıklıkla tercih edilen yaygın bir tedavi yöntemidir. Kanser tedavisinde, biyopsi alınarak tanı konmasında ve metastaz olmayan durumlarda tümör dokusunun veya kitlesinin vücuttan çıkarılmasında kullanılır.
- **Biyolojik Tedaviler:** Bu tedavi yönteminin amacı biyolojik maddeler kullanarak kanseri tedavi etmektir. Gen terapisi, kanser aşıları, monoklonal antikorlar, kanserin büyümesini engelleyici maddeler, interferonlar, anjiogenezi engelleyici maddeler ve interlökinler biyolojik tedavinin alt gruplardır.

### 1.9. Nöroblastoma

Nöroblastoma çocukluk çağının en çok görülen ekstrakranial solid tümörüdür. Bu tümör nöral krest hücrelerinden köken alır ve en sık paraspinal sempatik ganglionlarda veya adrenal medullada gözlenir. Ablatif kemoterapi ve ardından kemik iliği transplantasyonu uygulanması, nihai sağkalım oranını değiştirmez fakat kısa süreli sağkalım oranını arttırır (Schor 1999).

Nöroblastoma; klinik çeşitlilik, genetik anormallikler, tümör histolojisi, tümör evresi ve hasta yaşı gibi sayısız klinik ve biyolojik faktörle ilişkilidir. Nöroblastoma çoğunlukla düzensiz olarak meydana gelir. Vakaların %1-2'sinde aile öyküsü vardır. Nöroblastoma olan çocuklarda gözlenen belirti ve semptomlar, hastalığın derecesini ve primer tümörün yerini yansıtır. Hastalığı lokalize olan çocuklar genellikle asemptomatiktir. Hastalığı metastatik düzeyde olan çocuklarda, tipik olarak tümör ikincil ateş ve kemik ağrısı gibi sistemik semptomlar ile ortaya çıkar (Weinstein ve ark 2003).

Her yıl yeni oluşan nöroblastoma vaka sayısı, 15 yaşından küçük milyon çocuk başına 10,5'dir. Nöroblastoma, çocuklarda kanserden dolayı gerçekleşen ölümlerin %15'ini, tüm çocukluk dönemi kanserlerinin %8-10'unu oluşturur (Park ve ark 2008).

### 1.9.1. Nöroblastoma ile İlgili Onkogenler ve Allelik Fazlalık

**n-MYCN:** n-MYCN, transkripsiyon faktörleri olan ve hücre çoğalması dahil olmak üzere birçok hücresel işlemle ilişkisi olan gen ekspresiyon regülasyonunda önemli Myc ailesine ait, 2. kromozomun kısa kolunda 2p24 bölgesinde bulunan bir proto-onkogendir. n-MYCN sınırlı bir ifadeye sahiptir. Embriyonik gelişimden sonra, n-MYCN aşağı regüle olur ve yetişkin dokularda az miktarda gözlemlenir. n-MYCN normal beyin gelişiminde önemli bir rol oynar. n-MYCN, gelişmeye devam eden ön beyin ve arka beyinlerin nöronal progenitör hücrelerden türetilen granüler nöron öncüllerinin çoğalmasında görev alır. n-MYCN, nöroblastomada en önemli prognoz göstergelerinden biridir. Görülme sıklığı %17-25 arasında değişir. Var olması halinde ileri evre hastalık, yüksek relaps riski, hızlı tümör büyümesi ve kötü prognozla anlamlı olarak ilişkilidir (Beltran 2014, Leventoğlu 2019).

**ALK (Anaplastik Lenfoma Kinaz):** ALK aktive mutasyonları da nöroblastomada bir onkogendir. Mutasyonlar neredeyse tüm ailesel nöroblastoma vakalarda yani toplam nöroblastoma vakalarının %1'inden azında ve spontan olguların %6-10'unda yer alır (Louis ve Shohet 2015). ALK geninde 30'dan fazla farklı mutasyon bulunur ve 20 ila 26 arasındaki ekzonları kapsar. En sık rastlanan mutasyonlar F1174L ve R1275Q'dur. Bu mutasyonlar, tirozin kinaz (TK) bölgesinin otofosforilasyonunu ve ALK reseptörünün aktivasyonunu indükler (Tonini ve ark 2012).

**PHOX2B:** PHOX2B, otonom sinir sisteminin gelişiminde rol oynayan homeodomain bulunduran bir proteindir. Nöral krest gelişiminde transkripsiyon faktörünü kodlayan ve düzenleyen insan kromozomunun 4p12 bölgesinde yer alır. Bu mutasyonların PHOX2B proteininin sinir hücresi farklılaşmasını desteklemedeki rolünü engellediği düşünülmektedir. Kalıtsal nöroblastoma vakalarının % 6,4'ünü oluşturur (Cao ve ark 2017).

**17q Bölgesinde Dengesiz Fazlalık:** Nöroblastoma hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, 17q içeren translokasyonda tekrarlanan genomik bir değişim vardır. Bu translokasyonun %70 gibi büyük bir bölümü 17q da gerçekleşen artıştan kaynaklanmaktadır. 17q'daki artış kötü bir prognoza ve agresif tümöre sebep olur (Schwab ve ark 2003).

### 1.9.2. Nöroblastomada Tümör Baskılayıcı Genler ve Allelik Kayıp

**11q delesyonu:** Nöroblastoma hastalarının yaklaşık %15'inde 11q geninin silinmesi gözlenir. Bir ya da daha fazla 11q gen bozulması, nöroblastoma oluşmasında ve gelişmesinde etkilidir. 11q21-q23 bantlarındaki etkiler genellikle kötü prognozu ifade eder (Westermann ve Schwab 2002).

**1p delesyonu:** 1p geninin silinmesi veya allel kaybı, nöroblastoma başlangıcı ve hastalığın seyri için önemli bir faktördür. Kromozom kollarında 1p allel kaybı nöroblastoma hastalarının yaklaşık %30'unda görülür. 1p36 allel kaybı yüksek riskli ve kötü prognozlu nöroblastomu ifade eder. Ayrıca, n-MYCN amplifikasyonu ile ilişkilidir (Janoueix-Lerosey ve ark 2004, Attiyeh ve ark 2005).

### 1.9.3. Nöroblastoma Evreleri

Nöroblastoma, INSS (Uluslararası Nöroblastoma Evreleme Sistemi) kriterlerine göre, tümör dokusunun karakteristik yapısının histopatolojik olarak değerlendirilmesi veya kemik iliği biyopsisi/aspiratı içinde tümör hücrelerinin varlığı ve yüksek idrar katekolamin seviyeleri ile teşhis edilebilir. Evreleme için özel şartlar vardır. Bunlar; vücudun bilgisayarlı tomografisi, bilateral kemik iliği biyopsileri, kemik taraması ve meta-iyodobenzilguanidin (mIBG) sintigrafisi şeklindedir (Weinstein ve ark 2003).

- Evre 1'de lokalize tümör yapısı bulunur, mikroskobik rezidüel miktar azdır.
- Evre 2a'da cerrahi işlem sonrası mikroskobik rezidüler fazladır tümör lokalizedir ve tümör çevresinde lenf nodu tutulumu yoktur.
- Evre 2b'de 2a'ya ilaveten lenf nodu tutulumu vardır.
- Evre 3'de orta hattı geçen fazla miktarda tümör hücresinin bulunması veya kontralateral bölgesel lenf nodu tutulumu olan tek taraflı tümör bulunmaktadır.
- Evre 4'de tümör, uzak lenf düğümleri, karaciğer, deri, kemik, kemik iliği veya diğer organlara metastaz yapmıştır.
- Evre 4S'de, deri, karaciğer ve/veya kemik iliği ile sınırlı yayılım gösteren lokalize primer tümördür. 1 yaşından küçük bebeklerle sınırlı bir evredir (Moreno ve ark 2013).

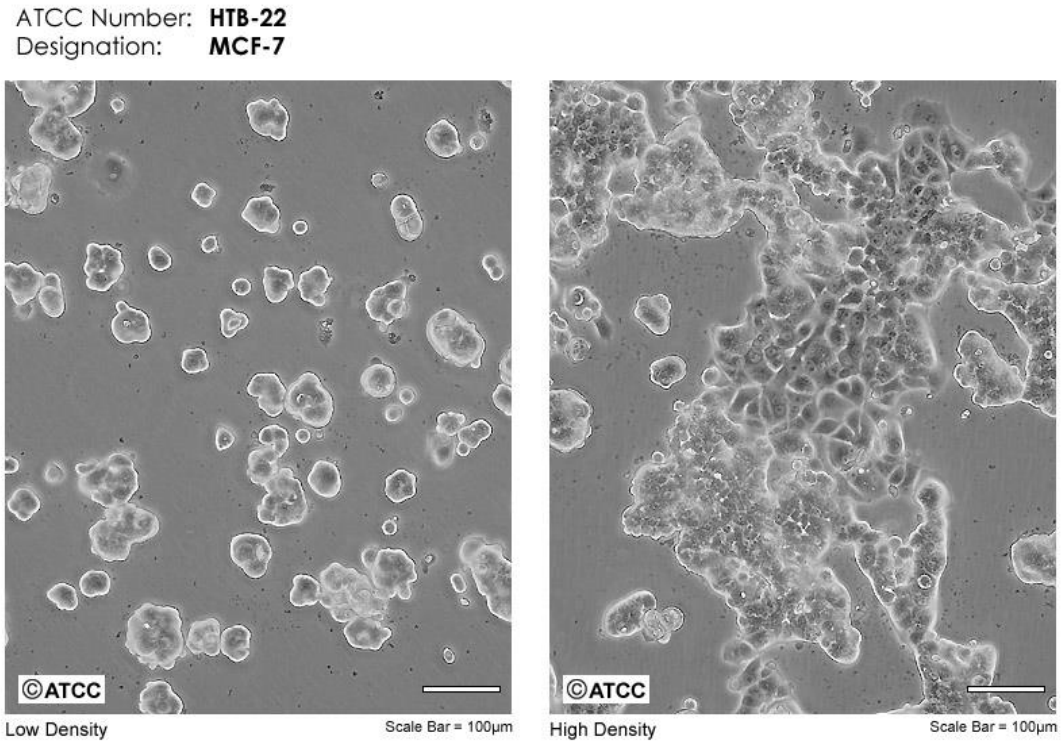
### 1.9.4. Nöroblastoma Tedavi Yöntemleri

Nöroblastomada, tedavi yöntemine hastalığın risk seviyesine göre karar verilir. Üç farklı risk grubu bulunmaktadır. Bunlar; düşük risk grubu, orta risk grubu ve yüksek risk grubu şeklindedir.

- **Cerrahi Yöntem:** Düşük risk grubu olan hastalara yalızca cerrahi ve destekleyici tedavi uygulanmaktadır. Lokalize tümörlerin çoğunda sadece cerrahi tedavi yeterli olabilmektedir (De Bernardi ve ark 2008). Orta risk grubunda cerrahi uygulanmasının amacı, organ işlev kaybı veya nörolojik hasar oluşturmaksızın, gerekirse kritik anatomik yapılar üzerinde tümör bırakarak, olabildiğince tam tümör çıkarımını sağlamaktır (Baker ve ark 2010). Yüksek riskli nöroblastomalarda cerrahi işlem uygulanması hastalığın seyri ve sağkalım üzerinde olumlu bir etki oluşturmaktadır (Koh ve ark 2005, McGregor ve ark 2005).
- **Kemoterapi:** Düşük risk grubu, tüm olguların yaklaşık %23'ünü içermektedir ve sadece cerrahi tedavi yeterlidir (Kushner ve ark 2005). Orta risk grubunda, cerrahi tedavi ve kemoterapi ile 3 yıllık yaşam oranları %75-98 arasındadır. Kemoterapi, sonrası küçülen tümör için gecikmiş cerrahi önerilmektedir (Yılmaz 2011). Yüksek risk grubu yoğun kemoterapi uygulanması ile tam ve kısmi tümör aktivitesi oranları artmış, fakat 3 yıllık sağkalım oranı %5- 15'tir, bu risk grubunda kemoterapi etkisi azdır (Berthold ve ark 2005, Jain ve ark 2012).
- **Radyoterapi:** Düşük riskli grupta standart tedavi uygulaması cerrahi yöntemdir. Bu olgularda genellikle prognozun kusursuz olması ve radyoterapinin uzun vadedeki komplikasyonları nedeniyle önerilmez (Nuchtern ve ark 2012). Orta riskli grupta uygulanan tedavi yöntemi kemoterapi ve cerrahidir. Radyoterapinin orta riskli gruptaki yeri belli değildir (Baker ve ark 2010). Yüksek riskli olgularda yoğun indüksiyon kemoterapisi, cerrahi, yüksek doz kemoterapi ile hematopoetik kök hücre nakli gibi agresif tedaviler uygulanmaktadır. Primer tümör yatağı ve tutulmuş lenfatik bölgelere uygulanan radyoterapinin sadece lokalize tümör kontrolüne katkısı olmaktadır (Laprie ve ark 2004).

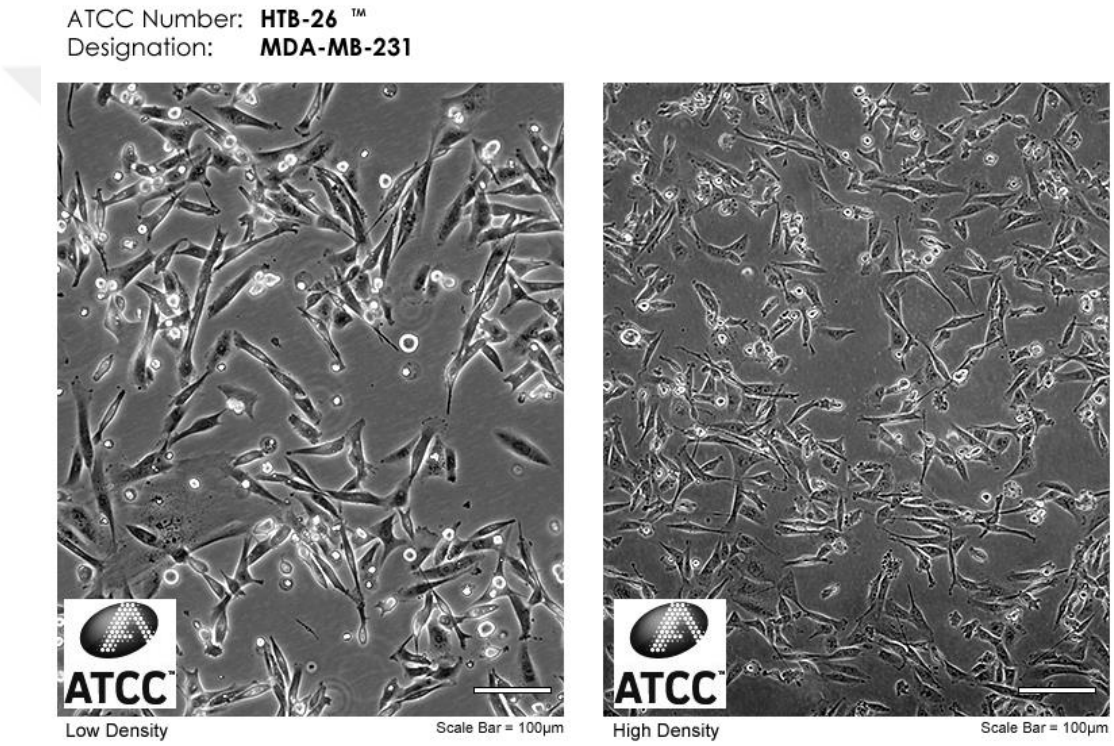
## 1.10. Hücre Hatlarının Özellikleri

MCF-7 hücre hattı, 1970 yılında 69 yaşında invaziv duktal karsinomaya sahip beyaz ırktan bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Hücre hattı, 1973 Michigan Kanser Vakfı'nda izole edilmiştir. MCF-7, meme epiteline spesifik çeşitli özellikleri koruyan bir hücre hattıdır ve *in vitro* meme kanseri çalışmalarında kullanılmaktadır. MCF-7 hücrelerinin, hücre sitoplazmasında östrojen reseptörleri yoluyla östrojeni östradiol formunda işleme kabiliyetini içerir. Bundan dolayı ER pozitif bir hücre hattıdır. Ayrıca, MCF-7 hücreleri PR pozitif ve HER2 negatiftir. Hücre hattının popülaritesi ER ekspresyonu yoluyla oluşan hormon duyarlılığındandır. Bu özellik MCF-7 hücre hattını hormon tepkisini ve hormonal tedavi yöntemlerini incelemek için ideal bir hale getirmektedir. MCF-7 hücreleri, kolay çoğalmasına rağmen, çoğunlukla yavaş büyüyen bir popülasyondur. Hücre sayısının iki katına çıkma süresi genellikle 30-40 saat civarındadır. Büyüklüğü ise 20-25 mikron olup, büyük ve yapışık hücrelerdir (Holliday ve Speirs 2011) (mcf7.com) (**Şekil 1.5.**).




**Şekil 1.5.** MCF-7 hücre hattı mikroskop görüntüsü (www.lgcstandards-atcc.org/~/media/Attachments/Micrographs/Cell/HTB-22.ashx).

MDA MB-231 hücre hattı, metastatik meme adenokarsinoma sahip 51 yaşında beyaz ırktan bir kadınının plevral efüzyonundan izole edilen epitelyal, insan meme kanseri hücre hattıdır. MDA MB-231 ER, PR ve HER2 sahip olmayan aşırı agresif ve invaziv TNBC'dir. Hücrelerinin invaziv olması, hücre dışı matriksin proteolitik bozunması yardımı ile gerçekleşir. TNBC, kemoterapiye orta derecede duyarlılık gösterir. MDA MB-231 hücreleri gevşek yapışan üzüm benzeri yapıya sahiptir. Hücre sayısının iki katına çıkma süresi genellikle 38 saat civarındadır. Hücrelerin ortalama büyüklüğü 18 mikrondur (phe-culturecollections.org.uk, physics.cancer.gov,(Holliday ve Speirs 2011)) (**Şekil 1.6.**).




.

**Şekil 1.6.** MDA MB 231 hücre hattı mikroskop görüntüsü (www.lgcstandardsatcc.org/~/media/Attachments/Micrographs/Cell/HTB-26.ashx).

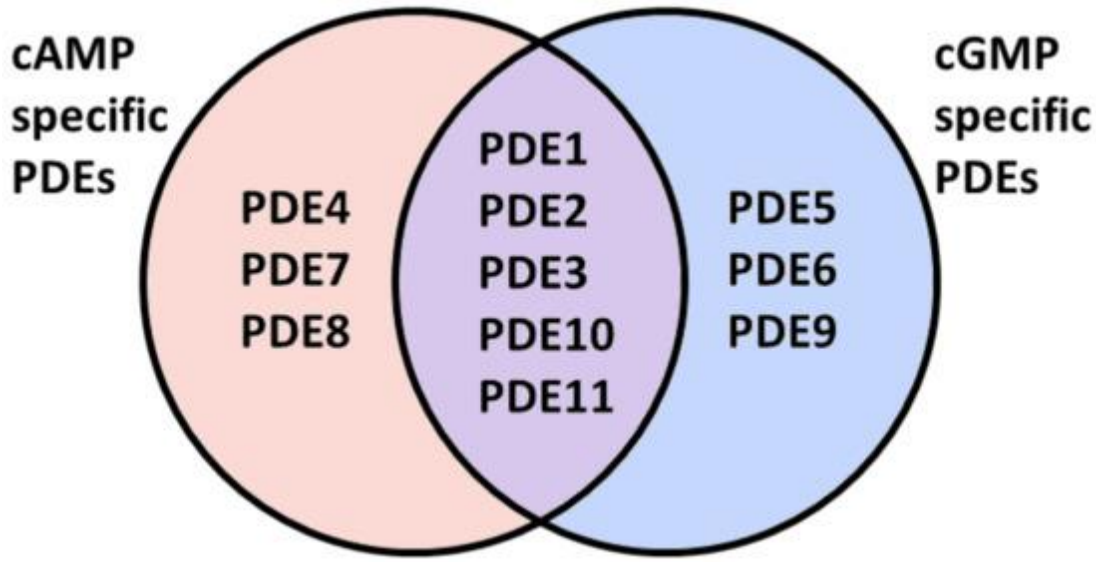
SK-N-AS hücre hattı, 6 yaşında beyaz ırktan bir kız çocuk hastanın kemik iliği metastazından izole edilmiştir (Prochazka ve ark 2013). SK-N-AS hücre hattı, nöroblastoma hücreleri arasında en küçük 1p silinmesine sahiptir. Hücre hattı, IGF-1 reseptörü ile ifade edilir (Kaghad ve ark 1997). Hücre hattı, morfolojik olarak gevşemiş kromatine ve büyük düz sitoplazmaya sahiptir. Hücre kültüründe yüzeye kuvvetli bir şekilde yapışırlar. Hücre sayısının iki katına çıkma süresi genellikle 39

saat civarındadır. (Acosta ve ark 2009).

### 1.11. Zaprinast

Fosfodiesteraz (PDE) inhibitörlerinin ilk farmakolojik araştırmaları, kahve, kakao ve çaydan izole edilen ilaçların klinik etkinliği ile geliştirilmiştir, ancak daha sonra ilgili bileşenler PDE olarak görev yapan ksantinler olarak tanımlanmıştır. Diüretik, inotropik ve bronkodilatör klinik etkinliği ile teofilin kullanımı, 1980'den 1990'a kadar olan dönemde ilk nesil zayıf seçici PDE inhibitörü olarak öngörülmüştür. Elde edilen bu bileşiklerle yapılan farmakolojik ve klinik araştırmalar, olumlu ve olumsuz eylemlerle ilgili geniş bir bilgi sağladı; ancak bu yeni ilaçların çoğunun ciddi yan etkilere sahip olması nedeniyle kesilmesi gerekmekteydi. Kalp, damar ve solunum endikasyonları için farmakolojik modelleri PDE izoenzim profilleri için analiz edilmiştir. Biyokimyasal ve moleküler biyolojik yaklaşımlar kullanılabilir inhibitörleri daha sistematik çalışmalar ile son derece seçici izoenzimler kullanılarak özel ilaç üretimi için yeni kapılar açmıştır (Schudt ve ark 2011).

PDE'ler ilk önce Sutherland ve iş arkadaşları tarafından tespit edilmiştir. PDE ailesi, tanınabilir hiçbir sekans benzerliği olmayan iki ana sınıfa, sınıf I ve sınıf II olarak ayrılmıştır. Sınıf I bilinen tüm memeli PDE'lerini içerir ve ayrı genlerin ürünü olan tanımlanmış 11 aileden oluşmaktadır (**Şekil 1.7.**). Bazı PDE'ler cAMP'nin hidrolizi için spesifiktir (PDE4, PDE7, PDE8), bazıları ise cGMP'ye spesifiktir (PDE5, PDE6, PDE9) ve bazıları ise hem cAMP hem cGMP'ye spesifik özelliğe sahiptir (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10, PDE11). Memeli PDE'lerinin hepsi dimerik yapıdadır, ancak dimerik yapının önemi bilinmemektedir.



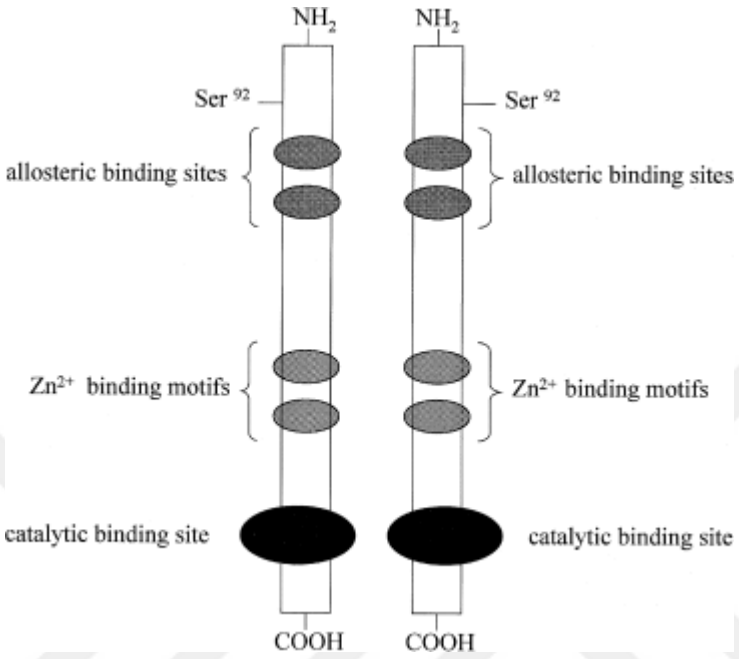

**Şekil 1.7.** PDE ailesi substrat özgüllüğü.

Her PDE, düzenleyici alanında karboksil terminali bulunan PDE aileleri içerisinde yüksek derecede koruma (%25-30) amino asit sekansına sahip yaklaşık 270 amino asitten oluşan korunmuş bir katalitik etki alanı bulunmaktadır. Bazı PDE'lerin aktivatörleri, enzim yapıları içinde bulunan otoinhibitör alanların etkisini azaltır. PDE'ler, enzimin katalitik alanında bulunan $Zn^{2+}$ bağlama bölgelerini içeren bir reaksiyon ile siklik nükleotid fosfodiester bağını 3' pozisyonunda ayırır; bu açıdan $Zn^{2+}$ metalloendoproteazlara benzerler (Corbin ve Francis 1999, Blokland ve ark 2012).

PDE5, siklik nükleotitler cAMP ve cGMP'nin hidrolizini karşılık gelen 5-nükleozit monofosfata katalizleyen enzim ailesine aittir ve insanlarda üç N-terminal varyantından (PDE5A1, PDE5A2 ve PDE5A3) oluşan tek bir PDE5A geni olan kromozom 4q27 tarafından kodlanır (Giovannoni ve ark 2010, Peng ve ark 2018). cGMP, düz kas tonusu üzerinde kısa süreli bir etkiye sahiptir. Proliferatif sinyallere ve kronik ilaç tedavisine verilen yanıtlarda ise uzun süreli etkiye sahiptir. PDE5, cGMP 'yi hidrolize eder ve bunun sonucunda düz kaslar kasılır (Eros ve ark 2008).

cGMP-spesifik PDE5 ilk önce akciğerde tanımlandı ve daha sonra saflaştırıldı ve kopyalandı. PDE5 bir homodimerdir, her bir alt birim 875 amino asitten oluşur. Monomerik 357 amino asit katalitik alandan oluşan bir PDE5 bölgeye sahiptir.

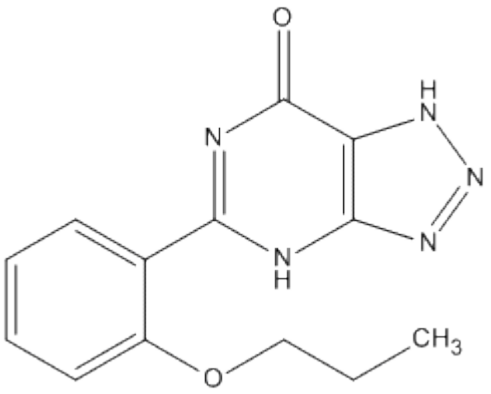
PDE5 her bir alt birimde 875 amino asit bulundurur ve bir homodimer yapıya sahiptir . Ayrıca, her bir alt birim bir fosforilasyon bölgesine ($Ser^{92}$), cGMP için iki allosterik bağlama bölgesine , iki $Zn2^{+}$ bağlama bölgesine ve bir katalitik bağlama bölgesine sahiptir (Corbin ve Francis 1999, Gibson 2001) (**Şekil 1.8.**).




**Şekil 1.8.** PDE5 yapısı

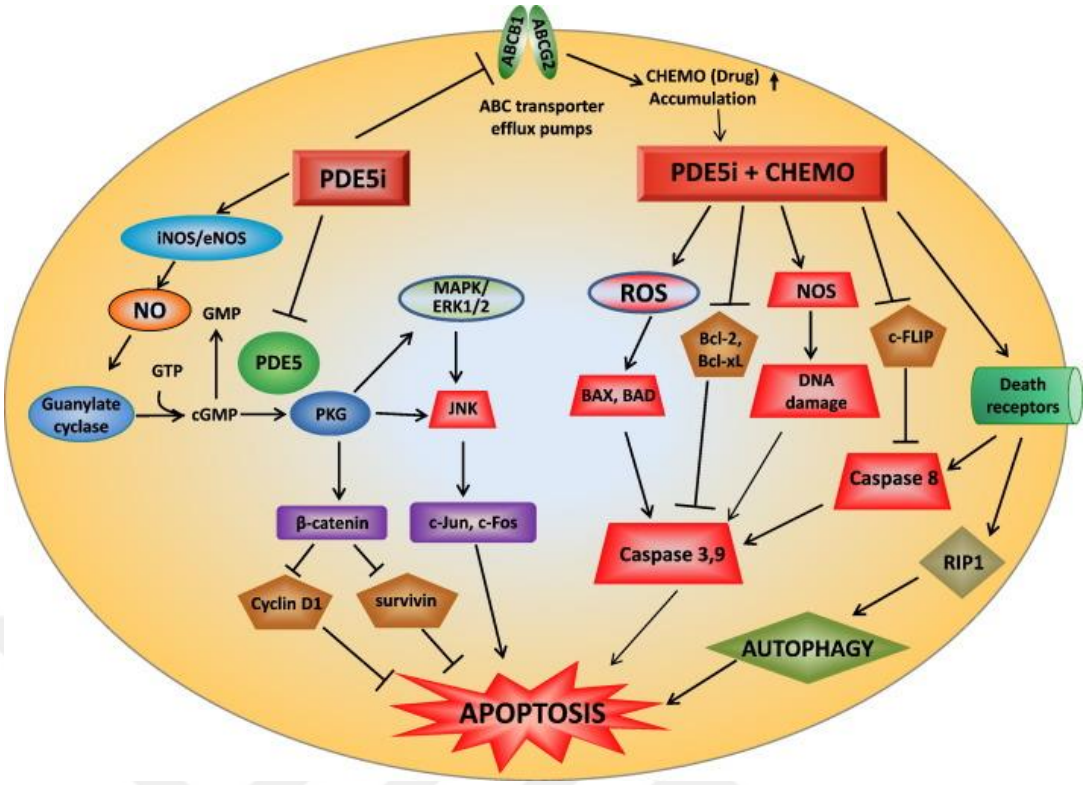
(www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299900008244 )

Zaprinast (2-0-propoksifenil-8-azapurin-6-on) olası bir anti-alerjen bileşiği olarak ksantinlerin incelenmesi sırasında sentezlendi (**Şekil 1.9.**). Teofilin gibi ksantinlerin enflamatuar mediatörlerin mast hücrelerinden ve lökositlerden salınımını engelleyerek, bir miktar anti-alerji potansiyeli sağlar. Zaprinast, astım kaynaklı bronkospazm, histamin salınımı, histamin ve diğer ajanların düz kas üzerindeki spazmojenik etkinin önleyicisi olarak disodyum kromoglikattan 20-50 kat daha etkilidir. Bundan dolayı zaprinast, alerjik astımda kullanmak için olası bir aday olarak önerilmiştir. Sonraki çalışmalar, zaprinastın, diğer ksantinler gibi, fosfodiesterazları inhibe edebileceğini gösterdi. İnsan akciğerinde, sıçan mast hücrelerinde ve cGMP fosfodiesteraza karşı yaklaşık 200 kat daha etkili, cGMP-spesifik fosfodiesterazın seçici bir inhibitörü olduğunu göstermiştir. Ek olarak, zaprinast, nitrovasodilatatör ilaçların koroner arterdeki gevşetici etkilerini büyük ölçüde güçlendirmiştir (Gibson 2001).




**Şekil 1.9.** Zaprinast molekül yapısı (www.biovision.com/zaprinast.html)

PDE5 inhibitörleri, apopitoz, otofaji, büyüme baskılanması, anjiyogenez gibi birçok hücresel faaliyette görev alır (**Şekil 1.10.**). Esas olarak PKG (cGMP bağımlı protein kinaz) aracılı olanlar olmak üzere, aşağı akış sinyal yollarını aktif hale getirerek tümör ilerlemesini ve yayılmasını engelleyebilmektedir. PDE5 inhibitörleri, cGMP'nin oluşumuyla NO sinyal yolunu uyarır ve PKG aktif hale gelir. PKG, çoklu aşağı akış sağkalım proteinlerini zayıflatan ve ayrıca apopitoza yol açan pro-apoptotik proteinleri aktive eden β-katenini uyarır. Ayrıca, ABC-taşıyıcı aracılı akışın engellenmesiyle ilaçların hücre içinde birikimini artırarak birden çok kemoterapötiğin etkinliğini arttırmaktadır. Ek olarak, PDE5 inhibitörleri ile kemosensitizasyonun artmış ROS üretimi, anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-xL) inhibisyonu, pro-apoptotik (Bax, BAD) ve otofaji ile ilgili proteinlerin aktivasyonu (RIP1) ve kaspaz-3, 9 ve 8'in aktivasyonu ile hücrelerin apopitoza gitmesini sağlamaktadır (Das ve ark 2015, Barone ve ark 2017).



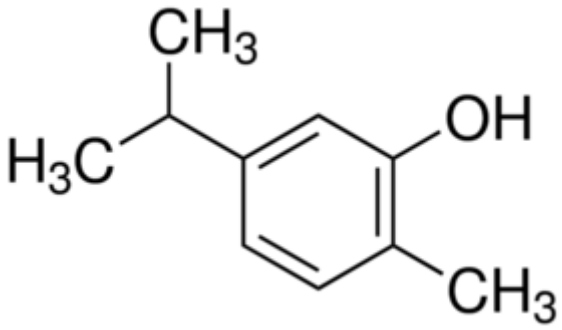

**Şekil 1.10.** PDE5 inhibitörlerinin antikanser etki mekanizması (Das ve ark 2015).

## 1.12. Carvacrol

Son yıllarda yıllarda yapılan araştırmalara göre, önemli sosyal etkileri olan farklı patolojiler için yeni potansiyel ilaçlar üretilmeye başlanmıştır. Bunun için şifalı bitkilerin biyolojik olarak aktif türleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Arunasree 2010). Türkiye'de bulunan bitkilerin yaklaşık 1/3'ü tıbbi ve aromatik bitkilerden oluşmaktadır. Bu bitkilerin içerisinde kekik bitkisinin de bulunduğu Lamiaceae (Labiatae: Ballıbabagiller) familyası, dünyada en geniş dağılıma sahiptir ve yaygın bir bitki familyasıdır. Kekik, kimyasal olarak değişken özellikler gösteren Akdeniz bölgelerine özgü bir bitkidir. Ülkemizde cins bakımından 45 cinsle altıncı sırada yer almaktadır ve tür açısından 550 türe sahip üçüncü büyük familyadır. Lamiaceae familyasına ait bitkiler; tıpta ve parfümeride kullanılan birçok uçucu yağın kaynağı ve ana bileşenidir. Tedavi ve baharat amaçlı kullanılması bu familyanın önemli olduğunu göstermektedir. Lamiaceae familyasına ait en önemli bitkilerden biri kekiktir. Kekiğin, Türkiye'de beş cinsi bulunmaktadır. Bunlar; Thymus, Origanum, Satureja, Tymbra ve Coridothymusdur. Bazı istisnalar dışında bu cinslere ait uçucu yağların ana bileşeni genellikle thymol ya da carvacrol veya her ikisidir (Bozdemir ,

Salehi ve ark 2018).

Carvacrol (2-metil-5- (1-metiletil) -fenol) birçok aromatik bitkide bulunan, thymol ile izomerik bir yapıya sahip monoterpenik bir fenol bileşenidir (Suntres ve ark 2015) (**Şekil 1.11.**). Carvacrol antimikrobiyal, antioksidan, antikanser, antiinflamatuar etki gösterir (Mbese ve Aderibigbe 2018).




**Şekil 1.11.** Carvacrol molekül yapısı (www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/282197?lang=en&region=TR).

Esansiyel yağların bazılarının antimikrobiyal aktivitesine, fenolik bileşiklerin varlığı neden olmaktadır. Fenolik bileşenlerin inhibitör etkisi, mikro organizmaların hücre zarı ile etkileşimi ve bileşiklerin genellikle hidrofobikliği ile açıklanmaktadır. Carvacrol, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerinde, proton, fosfat ve potasyum sızıntısı sonucunda bakterilerin hücre zarında geçirgenlik farklılığına neden olmaktadır. *Staphylacoccus epidermis, Streptococcus pneumonia, Escherichia coli, Klebsiella pnömonisi, Proteus mirabilis, Enterobacter spp. ve Serratia spp.* gibi birçok bakteri suşunda carvacrol antibakteriyel etki göstermiştir. Ayrıca carvacrol, *Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Alternaria alternata, Penicillium rubrum, Trichoderma viride, Candida spp.* gibi çeşitli mantar türlerinde antifungal özellik göstermiştir. Fenolik bileşikler arasında, carvacrol en güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşendir (Ben Arfa ve ark 2006, Sharifi-Rad ve ark 2018).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri ile reaktif ara maddelerin detoksifiye edilmesi ile gerçekleşmektedir. Proteinlere, lipidlere ve nükleik asitlere serbest radikaller etki ederek, hücrelerde bulunan farklı moleküllerde oksidatif hasara neden olmaktadır. Bitkilerin birçoğunda bulunan doğal antioksidanlar olarak bilinen uçucu

yağlar, oksidatif hasarı azaltabilmektedir. Ayrıca radikal temizleme faaliyetlerinden dolayı mutajenez, karsinojenez ve yaşlanmayı engellemektedir. Carvacrol, enzimatik antioksidanların yani süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazın aktivitesini arttırmaktadır. Ayrıca, nonenzimatik antioksidanların yani C vitamini, E vitamini ve azaltılmış glutatyon aktivitesini iyileştirirerek antioksidan etki göstermektedir (Sharifi-Rad ve ark 2018).

Carvacrol kanser hücrelerine karşı güçlü bir etki göstererek doza bağımlı bir şekilde proapoptotik yolları aktive eder ve apopitoza neden olur. Ayrıca matriks metalloproteaz ekspresyonunu azaltarak proliferasyonun azalmasını sağlamaktadır.

Carvacrol meme kanserinde kaspaz-9 geninin translasyonel ürünü ile apopitozun başlamasını sağlar. Kaspaz-3 ise apopitozun terminal fazında önemli bir rol oynayan aşağı akım kaspazıdır. Ayrıca, p53 geni ile Bcl-2 ailesi etkileşime girer. Bax promotörünün Bcl-2 geninin eş zamanlı aşağı regülasyonu ile doğrudan transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla Bax geninin ekspresyonunu düzenleyerek apopitozun düzenlenmesinde görev almaktadır. Carvacrol ile tedavi edilen meme kanseri hücre hattında, hücre siklusunun G0/G1 fazında hücre miktarında artış ve S fazında ise hücre miktarında bir azalma gözlemlenmiştir. Böylece carvacrol, apopitozun başlaması ve S fazında DNA sentezinin inhibisyonunu sağlamıştır.

Carvacrolün insan karaciğer adenokarsinom hücre hattı üzerindeki etkisi ise kaspaz-3 aktivasyonu, Bcl-2 gen ekspresyonunun azalması ve PARP bölünmesinin gerçekleşmesiyle apopitozu indüklemektedir. İnsan prostat kanseri hücrelerinde carvacrol, reaktif oksijen aracılı olarak apopitozu sağlamaktadır ve G0/G1 evresinde hücre siklusunu durdurmaktadır (Sharifi-Rad ve ark 2018).

# 2. GEREÇ VE YÖNTEM

## 2.1. Gereçler

### 2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- Annexin V: Muse Annexin V&Dead Cell Kit MCH100105 Lot: B78272
- Carvacrol: Sigma Aldrich, W224511
- DMSO: Dimetil Sülfoksit Sigma-Aldrich D2650
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Biological Industries Kibutz Haemek Israel Kat. no: 01-1A
- Fetal Bovin Serum (FBS): Foetal Bovine Serum (FBS) European Grade Heat Inactivated (BIO-IND, BI04-127-1B)
- Glutamin-L-glutamin Solüsyonu, (29.2 mg/ml in Saline) (200 mmol) (BIO. IND, BI03-020-1B)
- MTT hücre proliferasyon kiti: IntRon Biotecnology
- Penisilin-Streptomisin: Penicillin-Streptomycin Solüsyon 10,000units/ml Penicilin (BIO-IND, BI03-031-1C)
- Phosphate Buffered Saline (PBS): Biological Industries Kibutz Haemek Israel Cat No:02-La
- Tripsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with Phenol (BIO-IND, BI03-053-lB)
- Zaprinast: Sigma Aldrich, Z0878

### 2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar gereçleri

- -80˚C buzdolabı: SANYO MDF-U5186S
- 96 kuyucuklu steril plaka: Corning® Costar® 96-well plate
- Azot tankı: LS 750 Las Systems Taylor-Wharton
- Buzdolabı (+4 ˚C ve -20˚C): ALTUS AL 302
- CO2 inkübatörü: SANYO $O_2$/$CO_2$ INCUBATOR MCO-175M
- ELISA Reader: CLARIOstar
- Falcon tüp: 352098 Blue max™ 50ml polypropyleneconicaltube 30x115mm style
- Flow Sitometri Cihazı: Muse Cell Analyzer, Merck Millipore
- Işık mikroskobu: Leica Dmil Led (inverted microscope)

- Kriyo tüp: REF:C12ARBIPS
- Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact
- Mikropipet (1000, 200, 10µl): Gilson
- Petri kabı: Corning® 100x20mm Lot: 430167
- Santrifüj: Sigma 3K30
- Serolojik pipet (5 ve 10 ml): Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, bulkpacked
- Sıcak su banyosu: Wise Bath fuzzy systems
- Steril filtre: 0,22 µm
- Thoma lamı: IsoLab, Tiefe depth profendeur 0,200 mm

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Hücre kültürü

Zaprinast ve carvacrol farklı kanser hücre hatlarına uygulanarak hücre proliferasyonu ve apopitoz üzerine etkilerinin gözlemlenmesi için HEK, MCF–7, MDA MB–231 ve SK-N-AS hücre hatları kullanılmıştır.

HEK hücre hattı Selçuk Üniversitesi Tıbbi Genetik Ana Bilim dalı bölümünden temin edilmiştir.

ATCC-HTB-26 kod numaralı, 3822 0000 gümrük tarife numaralı, US menşeili, 16.03.2015 teslim tarihli MDA-MB 231 meme kanseri hücresi, ATCC firmasından temin edilmiştir.

ATCC-HTB-22 kod numaralı, 3822 0000 gümrük tarife numaralı, US menşeili, 16.03.2015 teslim tarihli MCF-7 meme kanseri hücresi, ATCC firmasından temin edilmiştir.

SK-N-AS hücre hattı ATCC'den satın alınmıştır.

HEK, MCF–7, MDA MB–231 ve SK-N-AS hücreleri nemlendirilmiş, %5 $CO_2$ içeren ve 37°C'lik atmosferde, %10 FBS ve %1 PSG içeren DMEM besi yerinde kültüre edildi.

Hücrelerin pasajlanması 4-5 günde bir olacak şekilde, tripsin-EDTA ile kaldırılması ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 100 $cm^2$'lik petri kaplarında

besi yerine alınması şeklinde yapıldı.

Hücre stoklanması ise tripsinlenen hücrelerin, santrifüjden sonra besi yerinin uzaklaştırılması, %10 DMSO ve %90 FBS içeren solüsyona konması ve 1,5 ml'lik kriyo tüplere alınarak, -20°C'de 1 gece beklettikten sonra -80°C'de ve sonra sıvı azot tankına konularak saklanması şeklinde gerçekleştirildi. Bu şekilde depolanan hücreler gerektiğinde hızlıca 37 °C'de çözülüp, üzerine 3 ml besi yeri ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, hücre pelleti tekrar 1 ml besi yerinde çözülerek, petri kabında taze besi yeriyle pasajlandı.

Hücre sayımı için; tripsinlenen hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra, kalan hücre pelleti, 1 ml besi yerine alındı. Bir ependorfa 20 µl hücre süspansiyonu ve 20 µl tripan blue alındı ve pipetaj yapıldı. Karışımdan 10'ar µl Thoma lamının alt ve üst kısımlarına aktarıldı, Thoma lamının alt ve üst bölümlerinde bulunan 16 küçük karede hücre sayımı yapıldı ve ortalamaları alınarak hesaplandı.

### 2.2.2. MTT ile Zaprinast'ın $IC_{50}$ Dozunun Belirlenmesi

Zaprinast, $2x10^{-3}$ M olacak şekilde %0,1'lik DMSO'da çözülüp, 0,22 µm çaplı steril filtreden geçirilerek -20˚C'de saklandı. Diğer dozlar hazırlanmış olan bu stok zaprinasttan besiyeri ile dilüsyon yapılarak hazırlandı.

96 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarına 100'er µl DMEM koyuldu. Her bir hücre hattı için optimizasyon çalışması yapıldı ve her kuyucuğa 5000 hücre ekildi. 24 saat hücrelerin yüzeye tutunması beklendikten sonra, belirlenmiş olan zaprinast doz grupları (0 µM (kontrol grubu)10 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM) hücrelere uygulandı. Hücreler 24 ve 48 saat boyunca takip edildi. 24. ve 48. saatin sonunda her bir kuyucuğa 10µl MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) reaktifi eklendi ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında besiyeri ve MTT reaktifi uzaklaştırılarak, her bir kuyucuğa 100 µl kristal çözücü reaktif eklendi ve 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 570 nm dalga boyunda ELISA mikroplate okuyucu ile her kuyucuğun absorbansı alındı. Her bir doz beş tekrarlı olarak çalışıldı.

### 2.2.3. MTT ile Carvacrol'ün $IC_{50}$ Dozunun Belirlenmesi

Carvacrol, $2x10^{-3}$ M olacak şekilde DMSO'da çözülüp, 0,22 µm çaplı steril filtreden geçirilerek +4˚C'de saklandı. Diğer dozlar hazırlanmış olan bu stok carvacrolden besiyeri ile dilüsyon yapılarak hazırlandı.

96 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarına 100'er µl DMEM koyuldu. Her bir hücre hattı için optimizasyon çalışması yapıldı ve her kuyucuğa 5000 hücre ekildi. 24 saat hücrelerin yüzeye tutunması beklendikten sonra, belirlenmiş olan carvacrol doz grupları (0 µM (kontrol grubu), 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM, 1000 µM) hücrelere uygulandı. Hücreler 24 ve 48 saat boyunca takip edildi. 24. ve 48. saatin sonunda her bir kuyucuğa 10 µl MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür) reaktifi eklendi ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında besiyeri ve MTT reaktifi uzaklaştırılarak, her bir kuyucuğa 100 µl kristal çözücü reaktif eklendi ve 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 570 nm dalga boyunda ELISA mikroplate okuyucu ile her kuyucuğun absorbansı alındı. Her bir doz beş tekrarlı olarak çalışıldı. Apopitoz analizi için carvacrolün dört hücre hattı için $IC_{50}$ değeri belirlendi.

### 2.2.4. Flow Sitometri ile Apopitoz Analizi

Dört hücre hattının apopitozu, Annexin V boyama kiti kullanılarak flow sitometri cihazında analiz edilmiştir. Toplamda kontrol (sadece hücre) ve carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) toplam 12 deney düzeneği hazırlandı.

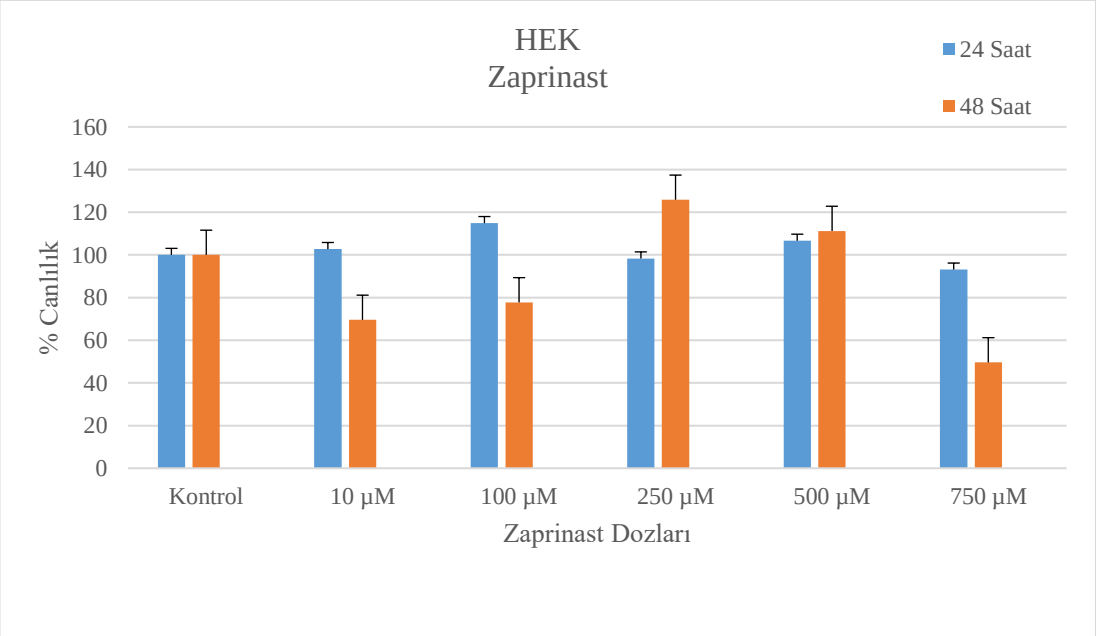
Analiz öncesi hücrelerin sayımı yapılarak, 6 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarına dört hücre için de 50000 hücre ekimi yapıldı. 24 saat sonra kontrol grubu hariç diğer gruplara $IC_{50}$ dozunda carvacrol uygulandı. Deney grupları 48 saat boyunca takip edildi. 48. saatin sonunda hücreler PBS ile yıkandı ve tripsinizasyon işlemi uygulandı. Tripsinlenen hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelletinin üzerine 100 µl besi yeri ve 100 µl Annexin V kiti eklendi, pipetaj yapıldı. 20 dakika karanlıkta bekletildikten sonra flow sitometri cihazında (Muse Cell Analyzer, Merck Millipore, Amerika) apopitoz analizi yapıldı.

# 3. BULGULAR

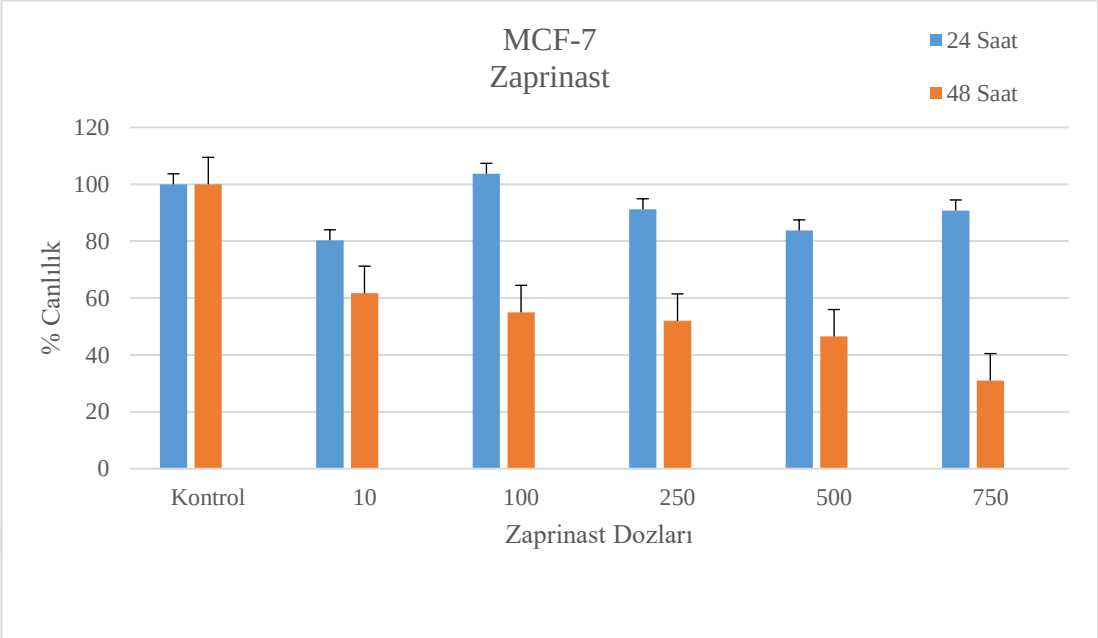
## 3.1. Zaprinast ve Carvacrolün Hücre Proliferasyonuna Etkisi ve $IC_{50}$ Doz Hesaplamaları

Zaprinast ve carvacrol HEK, MCF–7, MDA MB-231, SK-N-AS hücre proliferasyonuna doz ve zaman bağımlı etkisi MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür) hücre canlılık testiyle analiz edildi. Belirlenen doz konsantrasyonlarında zaprinast ve carvacrol ile muamele edilen hücrelerin proliferasyonu 24 ve 48 saat boyunca takip edildi. Zaprinast için, dört hücre hattındaki etkileri çizilen konsantrasyon-canlılık grafiklerinde de görüldüğü üzere doz ve zaman bağımlı olarak gözlemlendi (**Şekil 3.1. A, B, C, D**).

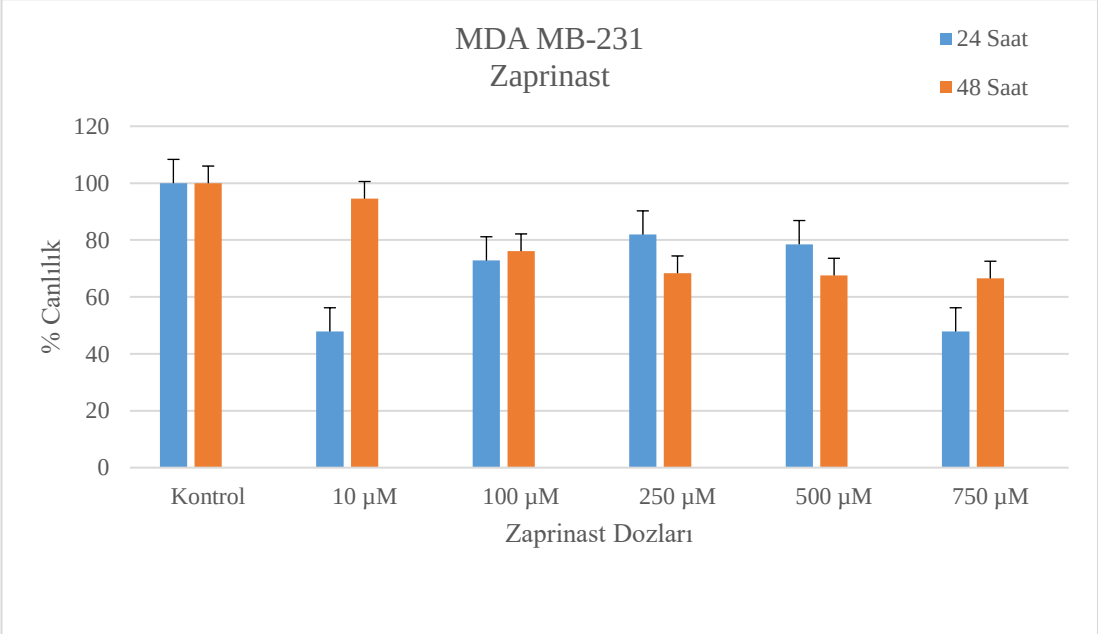
A) Zaprinastın HEK hücre proliferasyonuna etkisi.



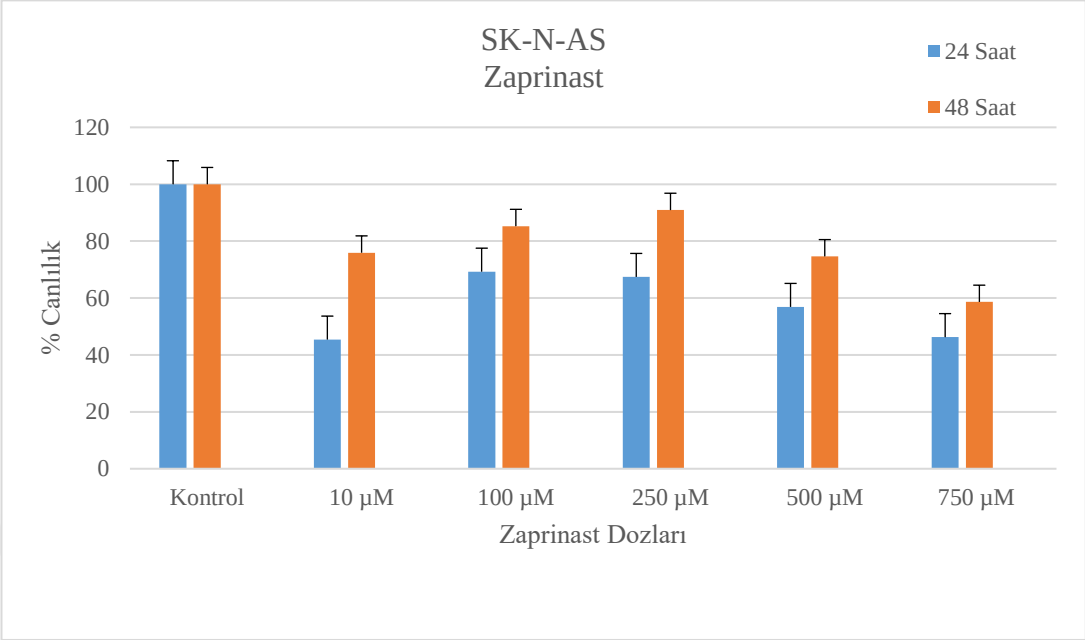
B) Zaprinastın MCF-7 hücre proliferasyonuna etkisi.




C) Zaprinastın MDA MB-231hücre proliferasyonuna etkisi.

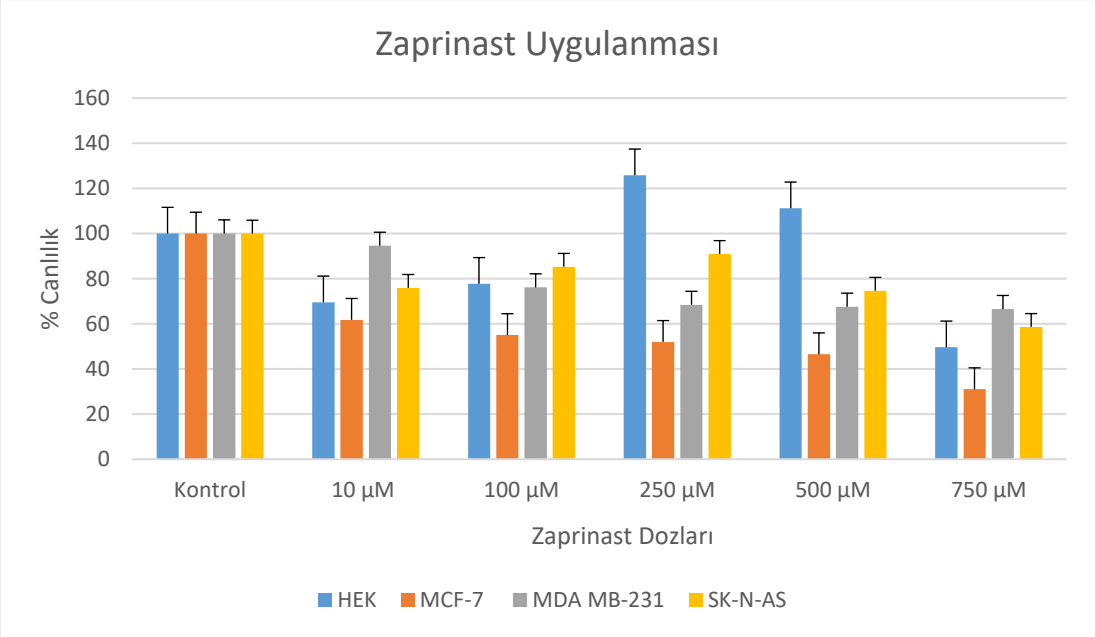


D) Zaprinastın SK-N-AS hücre proliferasyonuna etkisi.




**Şekil 3.1.** Zaprinastın hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı etkisi. (A) Zaprinastın HEK hücre proliferasyonuna etkisi. (B) Zaprinastın MCF-7 hücre proliferasyonuna etkisi. (C) Zaprinastın MDA MB-231 hücre proliferasyonuna etkisi. (D) Zaprinastın SK-N-AS hücre proliferasyonuna etkisi.

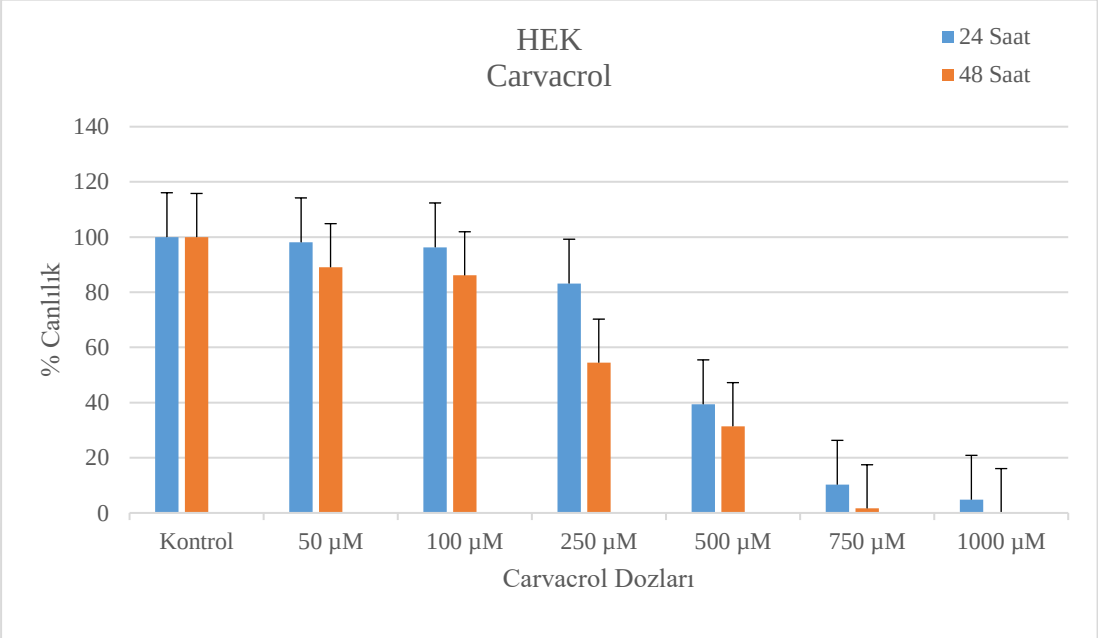
Zaprinastın HEK, MCF–7, MDA MB–231 ve SK-N-AS hücre hatlarında, hücre proliferasyonunda doz ve zamana bağımlı olarak az miktarda inhibisayon sağladığı görülmüştür. Farklı dozlarda zaprinast uygulamasında 48. Saat sonunda HEK, MCF-7, MDA MB-231 VE SK-N-AS hücre hatlarına etki etmesine rağmen $IC_{50}$ değeri bulunamamıştır. (**Şekil 3.2.**).



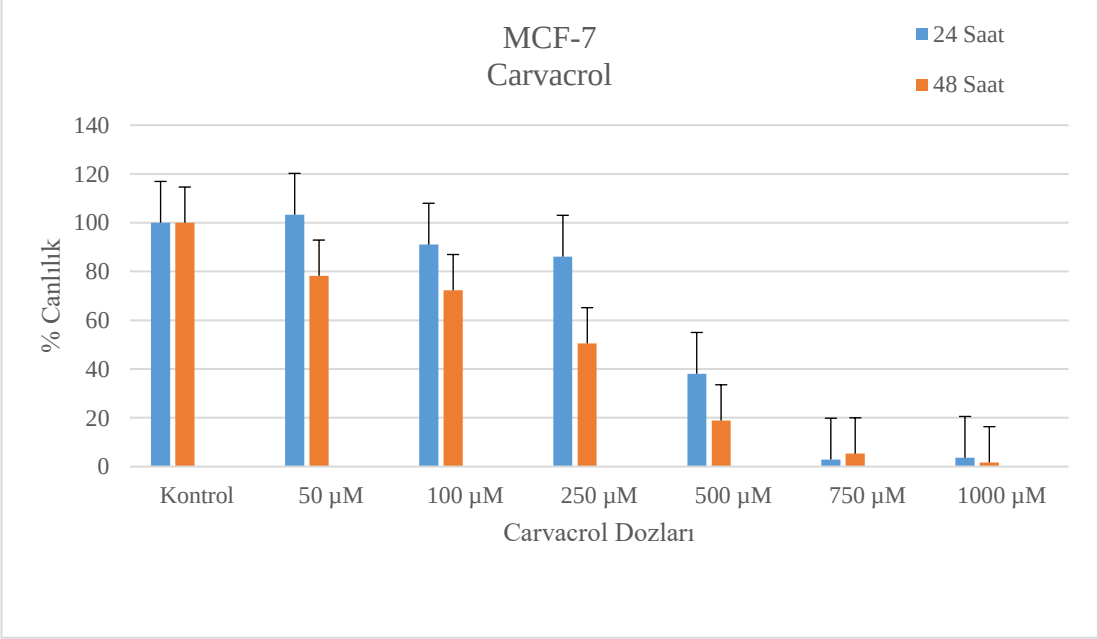

**Şekil 3.2.** Zaprinastın HEK, MDA MB-231, MCF-7 ve SK-N-AS hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı etkisi.

Carvacrol için, dört hücre hattındaki etkileri çizilen konsantrasyon-canlılık grafiklerinde de görüldüğü üzere doz ve zaman bağımlı olarak gözlemlendi. Carvacrolün ise HEK, MCF–7, MDA MB–231 ve SK-N-AS hücre hatlarının proliferasyonuna olan etkileri doz ve zaman bağımlı olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür (**Şekil 3.3. A, B, C, D**).

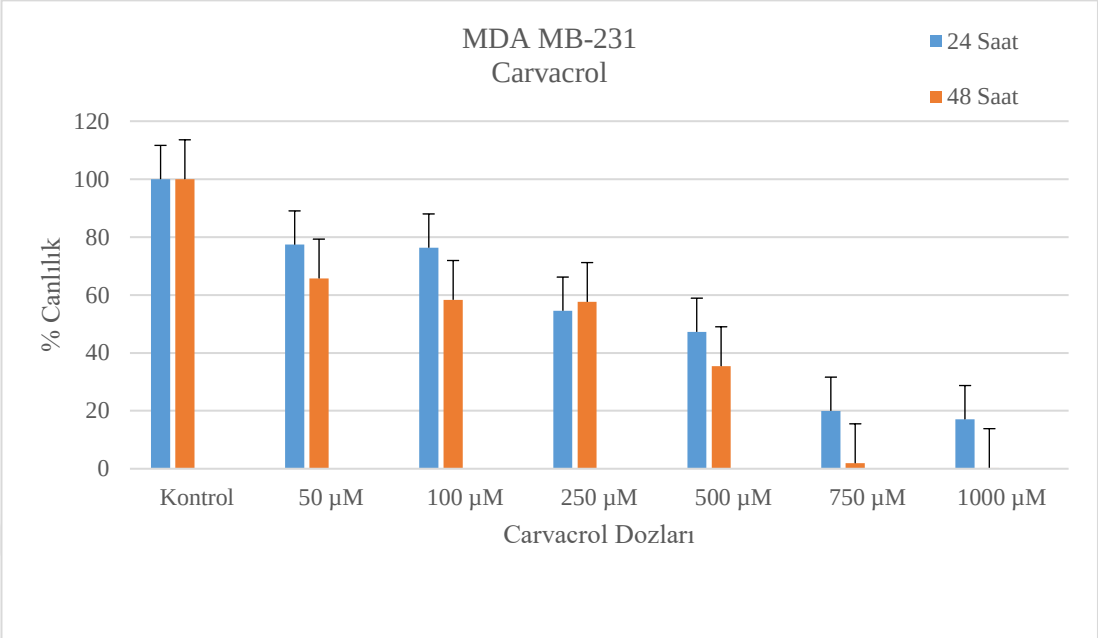
A) Carvacrolün HEK hücre proliferasyonuna etkisi.



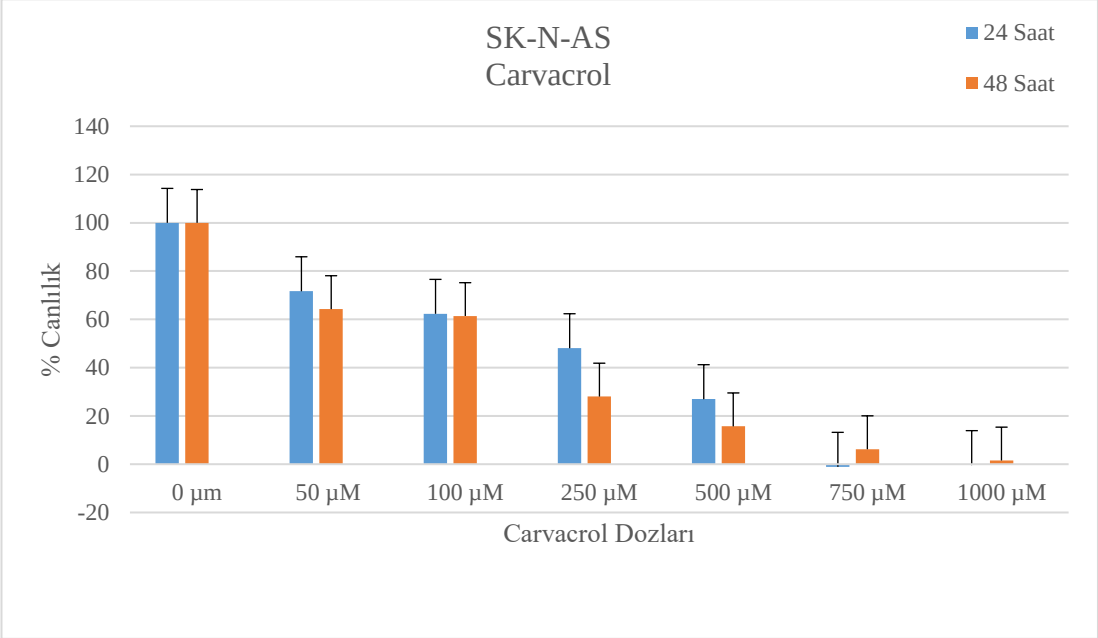

B) Carvacrolün MCF-7 hücre proliferasyonuna etkisi.



C) Carvacrolün MDA MB-231 hücre proliferasyonuna etkisi.



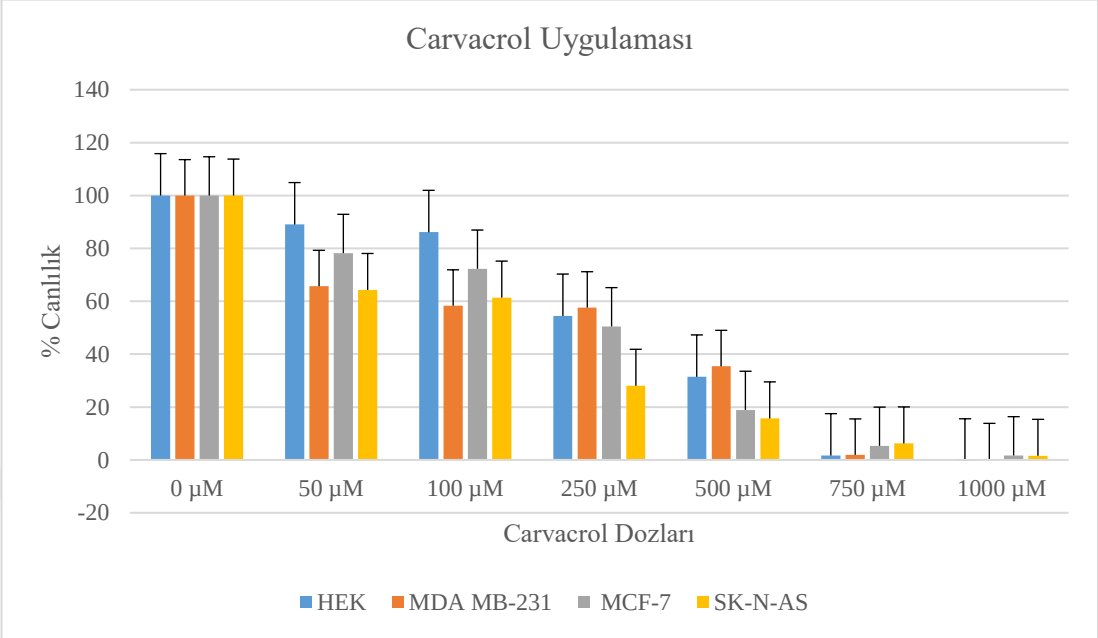

D) Carvacrolün SK-N-AS hücre proliferasyonuna etkisi




**Şekil 3.3.** Carvacrolün hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı etkisi. (A) Carvacrolün HEK hücre proliferasyonuna etkisi. (B) Carvacrolün MCF-7 hücre proliferasyonuna etkisi. (C) Carvacrolün MDA MB-231 hücre proliferasyonuna etkisi. (D) Carvacrolün SK-N-AS hücre proliferasyonuna etkisi.

Carvacrolün konsantrasyon-canlılık sonuçlarına bakıldığında 48. saatte en

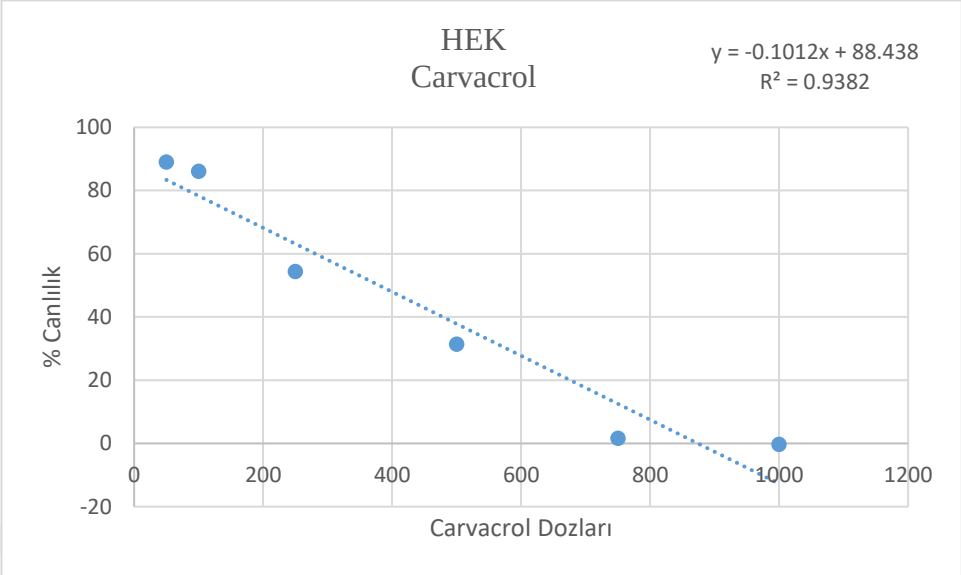
yüksek konsantrasyonda HEK sonrasında MDA MB-231, MCF-7 ve en düşük konsantrasyonda SK-N-AS hücre hattına etki ettiği tespit edildi (**Şekil 3.4.**).



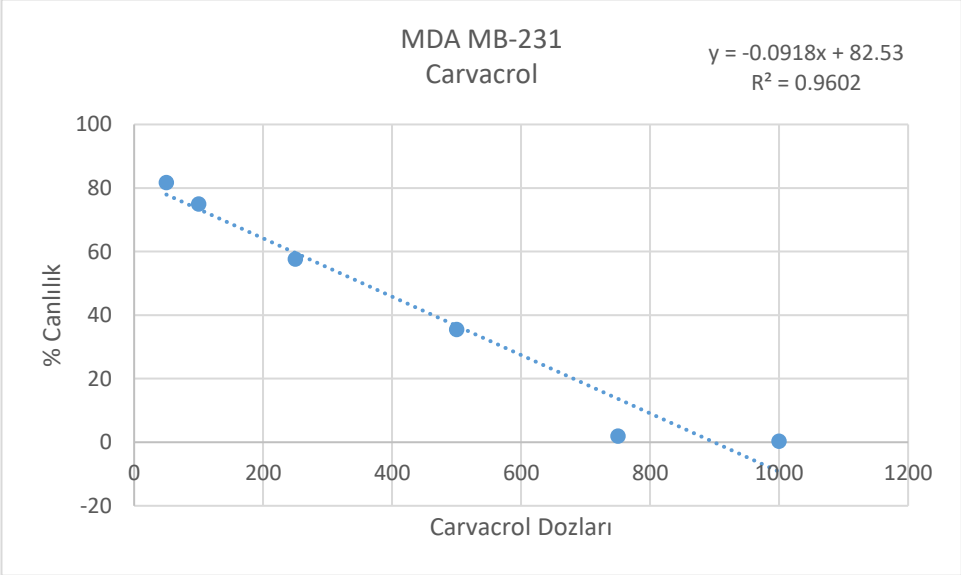

**Şekil 3.4.** Carvacrolün HEK, MDA MB-231, MCF-7 ve SK-N-AS hücre proliferasyonuna doz-zaman bağımlı etkisi.

% canlılık-konsantrasyon grafiklerinden faydalanarak carvacrol için $IC_{50}$ dozları 48. saat için hesaplandı. Buna göre 48. saatte HEK için carvacrol $IC_{50}$: 379,82 µM, MCF–7 için carvacrol $IC_{50}$: 250 µM, MDA MB–231 için carvacrol $IC_{50}$: 354,35 µM SK-N-AS carvacrol $IC_{50}$: 134,93 µM (**Şekil 3.5. A, B, C, D**) olarak belirlendi.

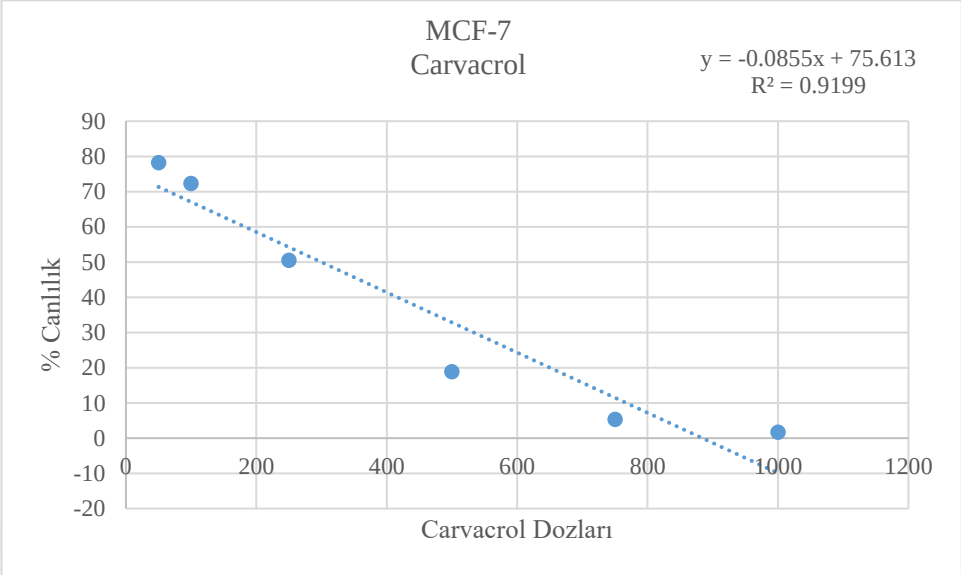
A) HEK hücre hattında carvacrol için $IC_{50}$ değeri belirlenmesi.



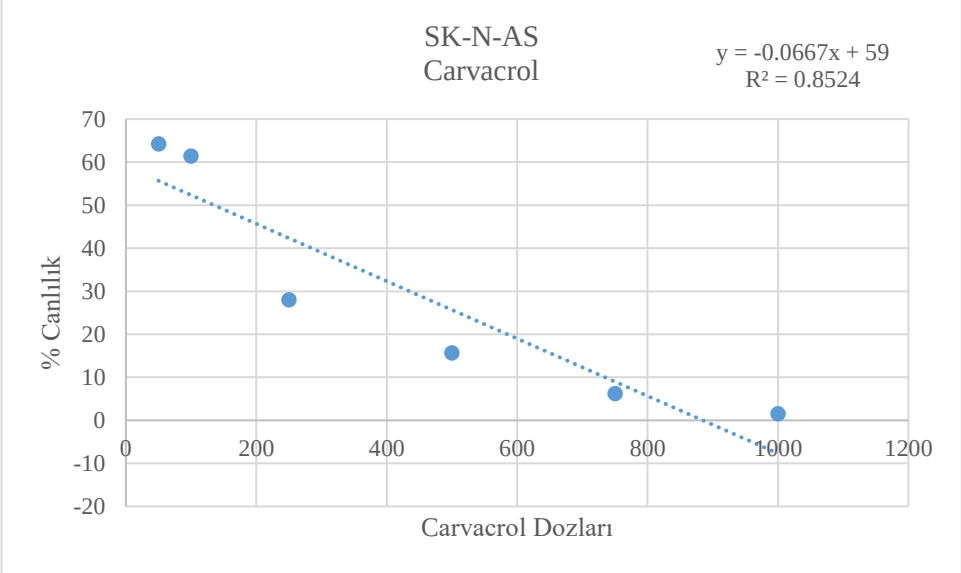

B) MDA MB-231 hücre hattında carvacrol için $IC_{50}$ değeri belirlenmesi.



C) MCF-7 hücre hattında carvacrol için $IC_{50}$ değeri belirlenmesi.




D) SK-N-AS hücre hattında carvacrol için $IC_{50}$ değeri belirlenmesi.



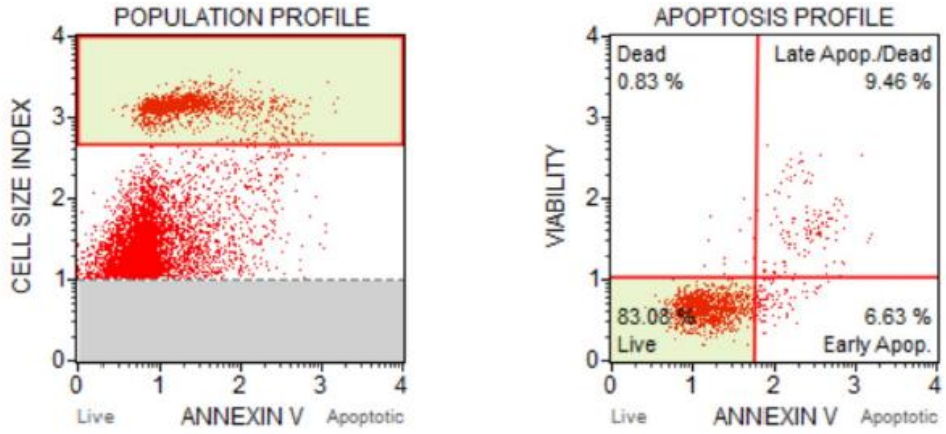

**Şekil 3.5.** Carvacrolün HEK (A), MDA MB-231 (B) MCF-7 (C) ve SK-N-AS (D) hücreleri için $IC_{50}$ doz değerlerinin belirlenmesi.

### 3.2. Carvacrolün Farklı Kanser Hücre Hatlarında Apopitoza Etkisi

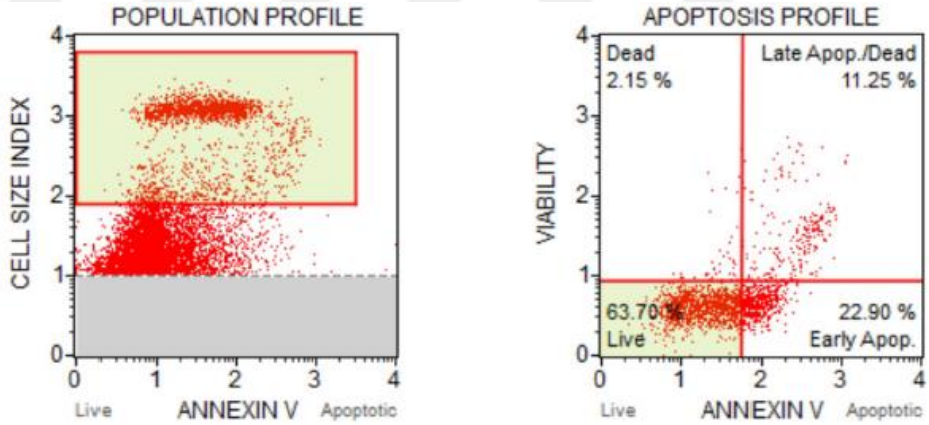
Farklı kanser hücre hatlarına carvacrolün apopitoz üzerine etkisinin incelenmesi için, HEK, MCF–7, MDA MB–231 ve SK-N-AS hücre hatlarıyla yapılan deneylerde, Annexin V kiti kullanılarak flow sitometri cihazında (Muse® Cell Analyzer) analiz yapıldı.

Kontrol hücreleri kullanılarak cihaz kalibrasyonu yapıldı ve hücreler cihaza tanıtıldı. 48. saatte, kontrol (sadece hücre) ve carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) gruplarının apopitoz analizleri yapıldı (**Şekil 3.4. A, B, C, D, E, F, G, H.**). Annexin V ile canlı hücreler, erken apopitotik hücreler ve geç apopitotik hücreler belirlendi.

A) HEK kontrol hücreleri.



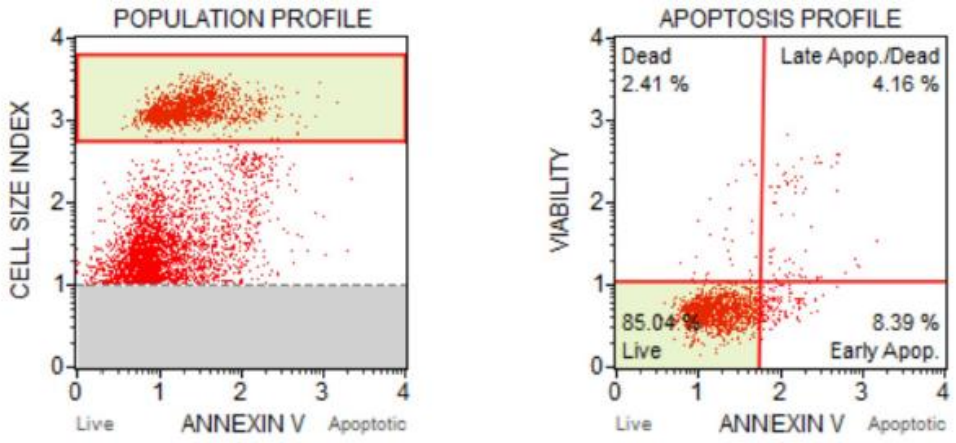

B) HEK carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) uygulaması.



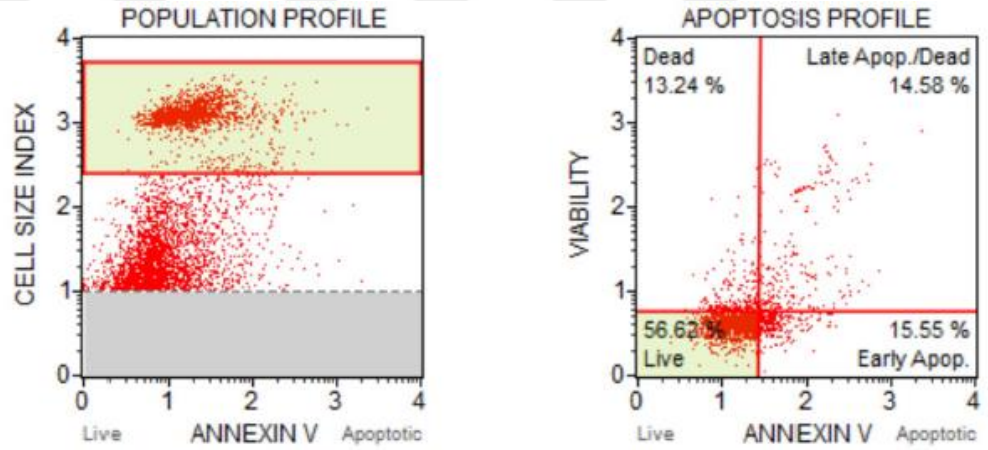

| HEK | Canlı | Erken Apopitotik | Geç Apopitotik | Debris | Total Apopitotik |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrol** | %83,08 | %6,63 | %9,46 | %0,83 | %16,09 |
| **Carvacrol** | %63,70 | %22,90 | %11,25 | %2,15 | %34,15 |

**Çizelge 3.1.** HEK hücreleri apopitoz değerleri.

C) MCF-7 kontrol hücreleri.



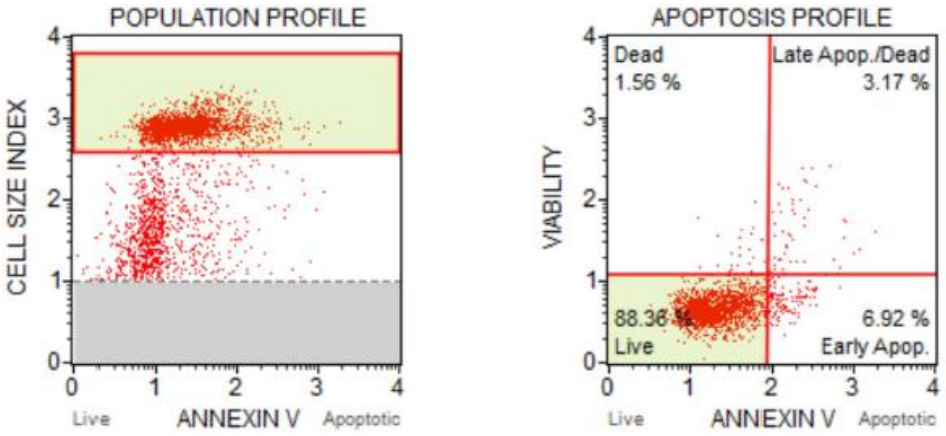

D) MCF-7 carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) uygulaması.



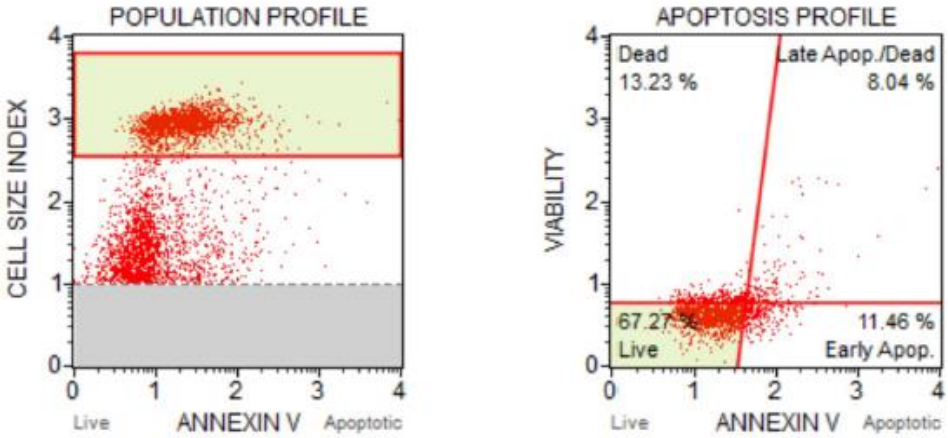

| MCF-7 | Canlı | Erken Apopitotik | Geç Apopitotik | Debris | Total Apopitotik |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrol** | %85,04 | %8,39 | %4,16 | %2,41 | %12,56 |
| **Carvacrol** | %56,62 | %15,55 | %14,58 | %13,24 | %30,13 |

**Çizelge 3.2.** MCF-7 hücreleri apopitoz değerleri.

E) MDA MB-231 kontrol hücreleri.



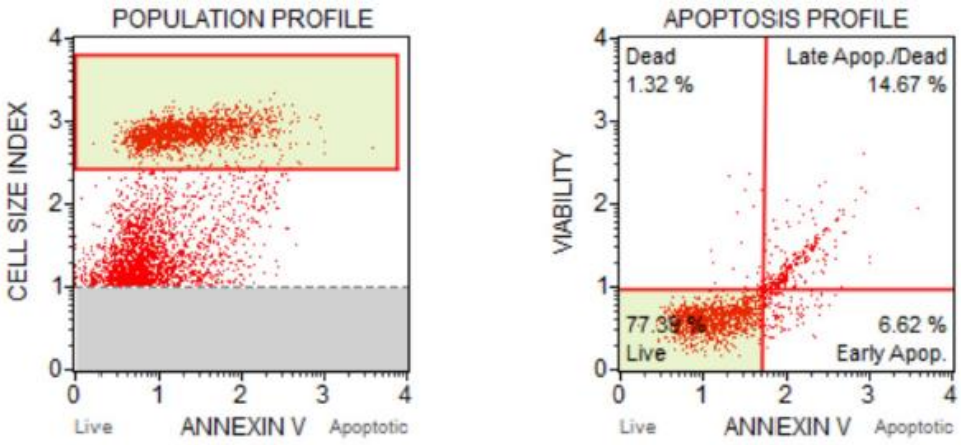

F) MDA MB-231 carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) uygulaması.



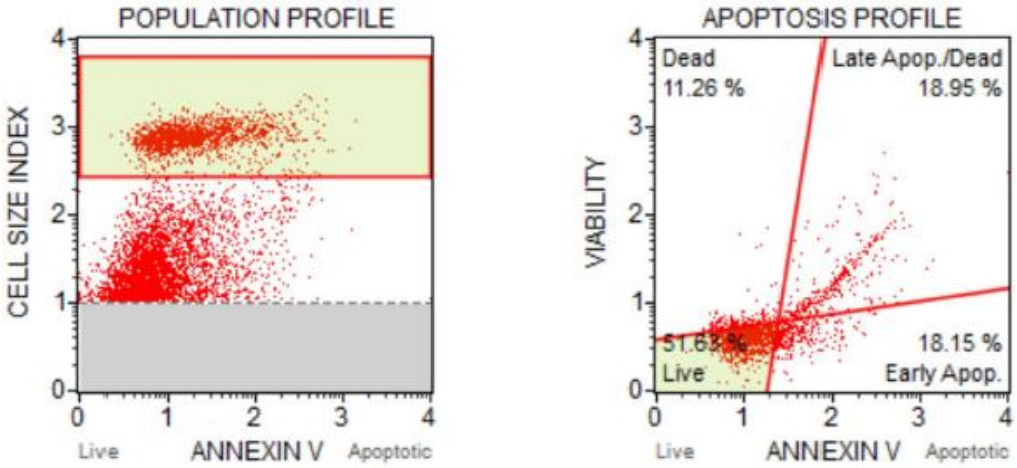

| **MDA MB-231** | **Canlı** | **Erken Apopitotik** | **Geç Apopitotik** | **Debris** | **Total Apopitotik** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrol** | %88,36 | %6,92 | %3,17 | %1,56 | %10,09 |
| **Carvacrol** | %67,27 | %11,46 | %8,04 | %13,23 | %19,50 |

**Çizelge 3.3.** MDA MB-231 hücreleri apopitoz değerleri.

G) SK-N-AS kontrol hücreleri.




H) SK-N-AS carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) uygulaması.




| SK-N-AS | Canlı | Erken Apopitotik | Geç Apopitotik | Debris | Total Apopitotik |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrol** | %77,39 | %6,62 | %14,67 | %1,32 | %21,29 |
| **Carvacrol** | %51,63 | %18,15 | %18,95 | %11.,26 | %37,11 |

**Çizelge 3.4.** SK-N-AS hücreleri apopitoz değerleri.

**Şekil 3.6.** Hücrelerin kontrol (sadece hücre) ve carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) uygulanmasının 48. saatteki apopitoz analizleri grafiği. (A) HEK kontrol hücreleri, (B) HEK carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) uygulaması, (C) MCF-7 kontrol hücreleri, (D)

MCF-7 carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) uygulaması, (E) MDA MB-231 kontrol hücreleri, (F) MDA MB-231 carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) uygulaması, (G) SK-N-AS kontrol hücreleri, (H) SK-N-AS carvacrol ($IC_{50}$ dozunda) uygulaması.

Sonuçlara göre; carvacrol uygulanmış gruptaki HEK, MCF-7 ve SK-N-AS hücrelerinde kontrol hücrelerine göre, apopitoz oranında artış görülmüştür. MDA MB-231 hücrelerinde ise önemli derecede bir artış görülmemiştir (**Çizelge 3.1, 3.2, 3.3, 3.4**).

## 4. TARTIŞMA

Doğal bileşikler ve bitkiler, kanserin ilerlemesini engelleme potansiyeline sahiptir. Ayrıca bitkilerin, kanser hastaları için tamamlayıcı bir tedavi yöntemi olduğu bilinmektedir. Doğal bileşiklerin en önemli özelliklerinden birisi, daha agresif ve yaygın olarak kullanılan kanser tedavi yaklaşımlarına oranla daha az toksik maddelerdir (Wang ve ark 2020).

Zaprinast, sildenafil gibi PDE5 inhibitörleri, kaspaz bağımlı apopitoza ve cGMP/PKG sinyal yolunu aktive ederek ve β-katenin fosforilasyonunu arttırarak hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Kolon kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri gibi birçok kanser türünde yüksek PDE5 ekspresyonu gözlenmiştir. PDE5 enziminin tümör ilerlemesinde bir etken olduğu ortaya konmuştur çünkü PDE5 miktarındaki artışın tümör derecesinin ve evresinin ilerlemesiyle ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, PDE5 inhibitörlerinin yeni etki mekanizmasına sahip güçlü antikanser ilaçları olma potansiyeline sahiptir (Das ve ark 2015).

Taku ve ark. yaptıkları bir çalışmada, zaprinastın, insan malign melanom hücre hattı üzerine etkisini araştırmışlardır. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına $5x10^2$ hücre ekilmiştir ve 24 saat boyunca yapışmasını beklenmiştir. Beş gün boyunca hücrelere, 10 µM ve 50 µM dozlarında zaprinast ile muamele edilmiştir. Beş günün sonunda bir MTT testi uygulanmıştır. Hücre proliferasyonunda 10 µM'da %90 canlı hücre, 50 µM'da %78 canlı hücre bulunmuştur ve doz artışına bağlı olarak anlamlı bir ($p<0.001$) inhibisyon gözlenmiştir. Çalışmada cDNA sekanslarına dayanan spesifik oligonükleotid primerleri kullanılarak PDE5A mRNA, gerçek zamanlı-PCR (RT-PCR) ile tespit edilmiştir. Bu bulgular saptanan PDE5 aktivitesi ile tutarlıdır. Sadece PDE5A1 sekansı tespit edildiğinden, insan maling melonoma hücrelerinden PDE5A1'in nükleotid dizilerini incelenmiştir. PDE5A1'in nükleotit sekansı, daha önce yayınlanmış insan PDE5A1'inki ile aynı bulunmuştur (veriler gösterilmemiştir). Sonuç olarak, bu veriler PDE5A1'in insan malign melanom hücrelerinde transkript edildiğini ve bu hücrelerin büyümesinde önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (Murata ve ark 2010).

Katja ve ark. yapmış olduğu çalışmada, insan akut eritroid lösemi (Dami)

hücre hattına zaprinastın etkisi incelenmiştir. Hücrelere 1 µM, 10 µM, 100 µM ve 1000 µM zaprinast ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Zaprinast 1 µM' da hücrelere etki etmemiştir. 100 µM ise hücreleri %21,2 oranında inhibe etmiştir. 1000 µM'daki etkisi ise belirtilmemiştir. Zaprinastın, büyüme önleyici etkileri, cAMP seviyeleri üzerindeki etkileri ile ilişkili değildir. Ek olarak, PDE tip III ve IV inhibitörleri adenilsiklaz aktivasyonuna bağlı olarak cAMP oluşumunu güçlendirmiş olsa da, çoğalmayı önleyici etkileri düşünüldüğünde hiçbir potansiyel gözlenmemiştir. Dami hücrelerinin PDE'sinin ayrılması ve karakterizasyonu, tip III, IV ve V izoenzimlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır. PDE inhibitörleri için bulunan PDE inhibisyonu, çoğalmaya karşı etkilerini açıklayamamıştır. cAMP konsantrasyonları veya PDE inhibisyonu ile ilgili bir kolerasyon ve antiproliferatif etkileri ortaya koymak için gereken yüksek konsantrasyonlar, sitotoksisite veya lipofiliklik gibi diğer parametrelerin veya test edilen PDE inhibitörleri için PDE'ye ek olarak diğer hedeflerin uygulanmasını gösterir. Antiproliferatif etkilerde lipofiliklik veya sitotoksik bir önemi gözlemlenmemiştir (Zurbonsen ve ark 1997).

Çalışmamızda Dami hücrelerinde olduğu gibi herhangi bir sitotoksik etki gözlemlenmemiştir. Antiproliferatif etki olarak da benzer oranlara sahiptir ve hücre inhibisyonuna çok az miktarda etki etmiştir.

Mauro ve ark. yaptığı bir çalışmada SK-N-MC nöroblastoma hücre hattına zaprinastın etkisi incelenmiştir. 24 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına $5x10^4$ hücre ekilmiştir. Hücrelere, 2,5-50 µM aralığında 48 saat boyunca doz uygulanmıştır. Hücre proliferasyonu MTT testi ile hesaplanmıştır. SK-N-MC hücre hattı için $IC_{50}$ değeri 3,3 µM bulunmuştur. Zaprinast 100 µM'da cAMP üzerine de etki ettiği gözlemlenmiştir.

Mauro ve ark. *in vivo* olarak yaptıkları çalışmada sağlıklı farelere SK-N-MC tümör hücreleri implante edilmiştir. Hücre enjeksiyonundan yedi gün sonra hücre ağırlığı yaklaşık 300 mg olmuştur ve ilaç tedavisine başlanmıştır. Tedavi sürecinde farelerin tümör ağırlığında %47 oranında azalma gözlenmiştir ve zaprinastın kanser hücrelerine etki ettiği bulunmuştur (tedavi edilmemiş farelere karşı $p < 0.01$) (Giorgi ve ark 2001).

Çalışmamızda SK-N-AS nöroblastoma hücre hattında zaprinastın

antiproliferatif olarak herhangi bir etkisi olmamasına rağmen SK-N-MC hücre hattında antiproliferatif etki göstermiştir.

Messina ve ark. yapmış olduğu çalışmada LAN5 ve SHEP insan nöroblastoma hücre hatlarına zaprinastın etkisi araştırılmıştır. Hücrelere 0-10 µM doz aralığında 3-6 gün zaprinast uygulanmıştır. Hücreler için $IC_{50}$ değeri 0,8 µM olarak bulunmuştur (Messina ve ark 2004).

Zaprinast ile ilgili yapılan çalışma sayısı çok azdır ve HEK, MCF-7, MDA MB-231 VE SK-N-AS hücre hatlarıyla hiç çalışma yapılmamış olması çalışmamızı özgün kılmaktadır. Zaprinast, sildenafil, tadalafil gibi diğer PDE5 inhibitörleri ile yapısal olarak kıyaslandığı zaman daha az çift bağlı oksijen grubu bulundurmaktadır. Bu nedenle zaprinastın, diğer PDE5 inhibitörleri ile kıyaslandığı zaman daha az etki ettiğini düşünmekteyiz.

Carvacrol, antibakteriyel, antioksidan ve antikanser özelliğe sahip fenolik bir monoterpenoiddir. Carvacrolün kanser hücrelerinde güçlü sitotoksik, genotoksik, apopitotik ve proapopitotik etkiler gösterdiği farklı çalışmalarla ortaya konmuştur. Ayrıca kaspaz bağımlı olarak, Bcl-2 ve Bax gibi genleri etkileyerek apopitozu indüklediği gözlemlenmiştir. Carvacrolün hücre siklusuna da etki ederek hücre proliferasyonunu durdurduğu ortaya konmuştur (Sharifi-Rad ve ark 2018).

Güneş ve ark. yapmış olduğu çalışmada insan mide adenokarsinom(AGS) hücrelerinde carvacrolün proliferasyon ve apopitoz üzerine etkileri incelenmiştir. AGS hücrelerine 0 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 600 µM dozlarında carvacrol uygulanmış ve 24 saat sonunda $IC_{50}$ değeri 82,57 µM ± 5,58 µM bulunmuştur. Apopitoz analizi için 0 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 50 µM dozlarında AGS hücrelerine 24 saat boyunca carvacrol ile muamele edilmiş ve etidyum bromür/akridin turuncusu boyaması yapılmıştır ve floresan mikroskopta inceleme yapılmıştır. Carvacrol, AGS hücrelerinde 100 µM dozunda, kontrol hücreleri ile kıyaslandığı zaman yaklaşık olarak %50 apopitotik hücre gözlenmiştir. Bunun yanı sıra AGS ve WS-1 hücrelerine uygulanan carvacrol ROS miktarında azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca artan carvacrol konsantrasyonuna karşı GSH düzeylerinin göreceli olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Yapılan western blot çalışmasında kaspaz-3 ve kaspaz-9 ve Bax proteinlerinin ekspresyonunda önemli bir

miktarda artış olmuştur ve Bcl-2 protein ekspresyonunda azalmaya sebep olarak apopitozu indüklediği düşünülmektedir (Günes-Bayir ve ark 2018).

Whasun ve ark. yapmış olduğu çalışmada insan karyokarsinom JAG ve JEG3 hücre hatları üzerine carvacrolün etkisi incelenmiştir. Hücrelere 0 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM dozlarında carvacrol uygulanmış, proliferasyon ve apopitoz üzerinde etkileri araştırılmıştır. 48 saat sonunda 300 µM carvacrol ile muamele edilmiş JAG ve JEG3 hücrelerinde canlılık sırasıyla yaklaşık %76 ve %49 olarak gözlemlenmiştir. Annexin V ve PI ile apopitoz analizi yapılmıştır. Hücre kontrollerine kıyasla 300 µM carvacrol ile muamele edilmiş JAG ve JEG3 hücrelerinde apopitotik hücre miktarı sırasıyla %238 ve %1023 olarak hesaplanmıştır (Lim ve ark 2019).

Kai ve ark. insan kolon kanseri hücre hatları HCT116 ve LoVo üzerine carvacrolün etkisini araştırmışlardır. HCT116 ve LoVo hücrelerine 48 saat boyunca 200–900 µmol/L doz aralığında carvacrol uygulanmıştır. HCT116 ve LoVo hücre hatları için $IC_{50}$ değerleri 544,4 µmol/L ve 530,2 µmol/L bulunmuştur. Apopitoz ise, Annexin V-FLOUS boyama ile flow sitometri cihazında incelenmiştir. Hücrelere, carvacrol ile muamele edildikten sonra apopitotik hücrelerin oranında artış gözlemlenmiştir (Fan ve ark 2015).

Bhakkiyalakshmi ve ark. insan akut promiyelositik lösemi hücresi HL-60 ve insan T lenfosit hücresi olan Jurkat üzerine carvacrolün etkisini araştırmışlardır. Hücrelere 24 saat boyunca 0 uM, 10 uM, 20 uM, 50 uM, 100 uM, 200 uM dozlarında carvacrol uygulanmıştır. HL-60 hücre hattı için $IC_{50}$ değeri 100 uM, Jurkat hücre hattı için $IC_{50}$ değeri 50 uM olarak bulunmuştur. HL-60 ve Jurkat hücrelerinde $IC_{50}$ değerinde carvacrol uygulanmıştır. Kontrol gruplarına kıyasla HL-60 hücrelerinde %78 oranında erken ve geç apopitotik hücre bulunmuştur. Jurkat hücrelerinde ise, %59 apopitotik hücre mevcuttur. Carvacrolün apopitoza yol açabilecek serbest radikal oluşumunu indüklediği görülmüştür. Western blot çalışması ile Bax, Bcl-2 ve kaspaz ekspresyonu ölçülmüştür. Her iki hücre hattında da Bax ekspresyonu artarken, Bcl-2 ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Ayrıca kaspaz-3 ekspresyonu ile mitokondriyal bağımlı apopitozun gerçekleştiği ortaya konmuştur (Bhakkiyalakshmi ve ark 2016).

Melušová ve ark. çalışmasında insan hepatoselüler karsinoma HepG2 hücre hattına carvacrolün etkisi incelenmiştir. Araştırmacıların daha önce yapmış olduğu bir çalışmada HepG2 hücre hattına 24 saat boyunca farklı dozlarda carvacrol uygulanmıştır. HepG2 hücre hattı için $IC_{50}$ değeri 425 uM bulunmuştur. Hücrelere 24 saat boyunca 100 uM, 200 uM, 300 uM, 400 uM carvacrol ile muamele edilmiş ve hücre siklusu üzerine etkileri flow sitometri cihazında analiz edilmiştir. HepG2 hücrelerinde doza bağımlı olarak G1 fazında hücre birikiminde artış meydana gelmiş ve 24 saat carvacrole maruz kalan HepG2 hücrelerinde S fazındaki hücre sayısında azalma meydana gelmiştir. Böylece hücre bölünmesi yavaşlatılmış, durdurulmuş ve apopitoza sebep olmuştur. (Melušová ve ark 2014).

Arunasree'nın yapmış olduğu çalışmada, MDA MB-231 hücre hattı üzerine carvacrolün etkisi araştırılmıştır. Kontrol grubu olarak kurkumin uygulanmış hücreler kullanılmıştır. MDA MB-231 hücreleri için kurkumin $IC_{50}$ değeri 30 uM olarak bulunmuştur. MDA MB-231 hücre hattına 24 saat ve 48 saat boyunca 0 uM, 20 uM, 40 uM, 80 uM, 100 uM carvacrol uygulanmıştır. 48 saat sonunda $IC_{50}$ değeri 100 uM bulunmuştur. Apopitoz analizi için aynı dozlarda 24 saat boyunca hücrelere carvacrol ile muamele edilmiştir ve $IC_{50}$ değerinde %44,1 apopitotik hücre gözlenmiştir. Ayrıca carvacrolün hücre döngüsüne etkisi flow sitometri cihazında analiz edilmiştir. G0/G1 fazında bir tepe oluşturarak apopitozu indüklediği gözlemlenmiştir. Western blot çalışmasında sitokrom c seviyelerinde doza bağımlı olarak artış gözlenmiştir. Bunun yanı sıra Bcl-2 ekspresyonunda doza bağımlı olarak azalma ve Bax ekspresyonunda doza bağımlı olarak artış gözlemlenmiştir (Arunasree 2010).

MDA MB-231 hücre hattında 48. saat sonunda bulduğumuz $IC_{50}$ değeri 354,35 µM'dır. Arunasree'nin yapmış olduğu çalışmada ise $IC_{50}$ değeri 100 µM olarak bulunmuştur. Bu iki çalışmadaki $IC_{50}$ değeri farklılığı Arunasree çalışmasında pozitif kontrol olarak kurkumin uygulanmış hücre grubu kullanmasıdır. Aynı hücre hattı kullanılmış olmasına rağmen apopitotik hücre miktarının çalışmamızda az olmasının sebebi ise nekrotik hücre miktarının daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

Lou ve ark. DU-145 ve Pc3 hücre hatlarına carvacrolün etkisini incelemişlerdir. Hücrelere 24 saat boyunca 0 uM, 250 uM, 500 uM, 750 uM, 1000

uM carvacrol ile muamele edilmiştir. Farklı kanser hücre hatları kullanılmasına rağmen Lou ve arkadaşları çalışmamızla benzer carvacrol dozları uygulamıştır. DU-145 ve Pc3 hücre hatları için $IC_{50}$ değerleri sırasıyla; 430,6 ± 21,9 uM ve 498,3 ± 12,2 uM bulunmuştur. Yapılan çalışmada, carvacrolün prostat kanseri hücrelerinde geçici reseptör potansiyel katyon kanalı (TRPM7) benzeri akımları inhibe ettiğini ve prostat kanseri hücresinin hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu azalttığı ortaya konmuştur. Ayrıca, carvacrol tedavisinin MMP-2, p-Akt ve p-ERK protein ekspresyonunu azalttığını ve prostat kanseri hücrelerinde F-aktin yenilenmesini bloke ettiği bulunmuştur. TRPM7 yıkımı prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını, migrasyonu ve invazyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca prostat kanseri hücrelerinde de p-Akt ve p-ERK protein ekspresyonunu baskılamıştır (Luo ve ark 2016).

Daha önce yapılmış çalışmalarda zaprinast ve carvacrolün farklı kanser hücre hatları üzerinde proliferasyon ve apopitoz üzerine etkileri ortaya konmuştur. Zaprinastla ilgili çok fazla çalışma yapılmamış olmasına rağmen RT-PCR yapılmış bir çalışma ile PDE5 üzerine etkisi ortaya konmuştur. Carvacrol ile farklı hücre hatları üzerine yapılan çalışmalarda gen ekspresyonları ve hücre siklusu üzerine etkileri de incelenmiştir.

Çalışmamızda farklı kanser hücre hatlarına zaprinast ve carvacrol uygulanmıştır. Kullandığımız hücre hatları ile ilgili daha önce çalışma yapılmamış olması çalışmamıza özgünlük kazandırmaktadır. Çalışmanın proliferasyon çalışması sonuçlarına göre; zaprinastın tüm hücre hatlarında etkili olmadığı görülmüştür. Carvacrol'un ise tüm hücre hatlarına etkisi gözlenmiştir. Carvacrolün, 48. saat için $IC_{50}$ değerleri, HEK hücreleri için; 379,82 µM, MCF-7 hücreleri için; 250 µM, MDA MB-231 hücreleri için; 354,35 µM, SK-N-AS hücreleri için; 134,93 µM olarak bulunmuştur ve yüksek dozlarda hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca hücrelere carvacrol uygulaması sonucu $IC_{50}$ değerleri ile proliferasyon üzerine en yüksek dozdan en düşük doza doğru karşılaştırma yapıldığında, HEK, MDA MB-231, MCF-7 ve SK-N-AS olarak etkinlik göstermiştir.

Carvacrolün, $IC_{50}$ dozunda apopitoz çalışması sonuçlarına göre; total apopitotik hücre miktarında artış gözlenmiştir. HEK hücre hattı için kontrol grubunda total apopitotik hücre miktarı %16,09 iken, carvacrol uygulanmış

hücrelerde total apopitotik hücre miktarı %34,15‘tür. Kontrol grubu ile doz uygulanan hücrelerin total apopitotik hücre miktarı karşılaştırıldığında, %18,06 artış gözlemlenmiştir.

MCF-7 hücreleri için kontrol grubunda total apopitotik hücre miktarı %12,56 iken, carvacrol uygulanmış hücrelerde total apopitotik hücre miktarı %30,13‘tür. Kontrol grubu ile doz uygulanan hücrelerin total apopitotik hücre miktarı karşılaştırıldığında, %17,57 artış gözlemlenmiştir.

MDA MB-231 hücre hattı için kontrol grubunda total apopitotik hücre miktarı %10,09 iken, carvacrol uygulanmış hücrelerde total apopitotik hücre miktarı %19,50‘dir. Kontrol grubu ile doz uygulanan hücrelerin total apopitotik hücre miktarı karşılaştırıldığında, %9,41 artış gözlemlenmiştir.

SK-N-AS hücre hattı için kontrol grubunda total apopitotik hücre miktarı %21,29 iken, carvacrol uygulanmış hücrelerde total apopitotik hücre miktarı %37,11‘dir. Kontrol grubu ile doz uygulanan hücrelerin total apopitotik hücre miktarı karşılaştırıldığında, %15,82 artış gözlemlenmiştir.

Tüm hücre hatlarında total apopitotik hücre miktarı karşılaştırıldığında en çok HEK hücrelerine etki etmiştir. Sonrasında MCF-7, SK-N-AS ve en az MDA MB-231 hücrelerine etki etmiştir.

Carvacrol, tüm hücre hatlarında proliferasyon ve apopitoz üzerine etki ederken zaprinast hücreler üzerinde yeteri kadar etkili bulunmamıştır. İki ilacın kimyasal yapısı karşılaştırıldığında carvacrol, heterosiklik halkasında bir hidroksil grubu bulundurmaktadır. Zaprinastın kimyasal yapısında ise hidroksil grubu bulunmamaktadır. Bu farklılık sebebiyle zaprinastın antiproliferatif etkisinin gözlemlenemediğini düşünmekteyiz. Carvacrolde ise apopitoz miktarının literatüre göre daha düşük miktarda olmasının sebebi nekrotik hücre miktarının fazla olmasından kaynaklıdır. Nekrotik hücre miktarındaki artışta, Fas ve TNF reseptörlerinin aktivasyonu veya hücresel stres sonucu RIP1 ve RIP3’ün aktif hale gelmesi etkili olabilmektedir. RIP1 ve RIP3 mitokondriyi ya direkt aktive etmekte ya da NADPH oksidazın vasıtasıyla oluşan ROS ile indirekt olarak hücreyi etkileyip nekrozu indüklemektedir. Ayrıca nekrotik uyarı PARP’i aktive etmektedir. PARP1 de kalpain aktivasyonu, RIP kinazların aktivasyonu ya da PAR polimerazlar yoluyla

nekroza neden olmaktadır. Nekrotik hücre miktarının apopitotik hücre miktarından fazla olmasını bu sebeplerle ilişkilendirilebileceğini düşünüyoruz.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma zaprinastın HEK, MCF-7, MDA MB-231 ve SK-N-AS hücre hatlarında proliferasyon ve apopitoz üzerinde az miktarda etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Carvacrolün ise kullandığımız hücre hatlarının proliferasyonunda doza ve zamana bağımlı bir şekilde azalmaya sebep olmuştur ve apopitoza yol açtığını ortaya konmuştur. Çalışmamızın, ilerde yapılacak olan moleküler düzeydeki çalışmalara, hücre siklusu ve kaspaz bağımlı olarak yapılacak çalışmalara yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz Etki mekanizmaları ile ilgili yapılacak olan daha ileri çalışmalar da bu konuya katkı sağlayacaktır.

## 6. KAYNAKLAR


What Is Cancer. National Cancer Institute.

Acosta S, Lavarino C, Paris R, Garcia I, de Torres C, Rodríguez E, Beleta H, Mora J, 2009. Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells. BMC Dev Biol, 9, 12-.

Aksoy YE, Turfan EÇ, Sert E, Mermer G, 2015. Meme kanseri erken tanı yöntemlerine ilişkin engeller. J Breast Health, 11, 26-30.

Arumugam S, Manning-Cork N, Gains J, Boterberg T, Gaze M, 2019. The evidence for external beam radiotherapy in high-risk neuroblastoma of childhood: A systematic review. Clinical Oncology, 31, 3, 182-90.

Arunasree K, 2010. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. Phytomedicine, 17, 8-9, 581-8.

Attiyeh EF, London WB, Mossé YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, 2005. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. New England Journal of Medicine, 353, 21, 2243-53.

Ayaşlıoğlu E, 2001. Apopitoz. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 21(1), 57-62.

Baker DL, Schmidt ML, Cohn SL, Maris JM, London WB, Buxton A, Stram D, Castleberry RP, Shimada H, Sandler A, 2010. Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. New England Journal of Medicine, 363, 14, 1313-23.

Barone I, Giordano C, Bonofiglio D, Andò S, Catalano S, 2017. Phosphodiesterase type 5 and cancers: progress and challenges. Oncotarget, 8, 58, 99179-202.

Baykal A, Rosen D, Zhou C, Liu J, Sahin AA, 2004. Telomerase in breast

cancer: a critical evaluation. Advances in anatomic pathology, 11, 5, 262-8.

Baykara O, 2016. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5, 3, 154-65.

Baykara O, 2016. Kanser Tedavisnde Güncel Yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5, 3, 154-65.

Bayraktar U, Derin Öğrenme Tabanlı Kanserli Hücre Tespiti.

Beltran H, 2014. The N-myc oncogene: maximizing its targets, regulation, and therapeutic potential. Molecular Cancer Research, 12, 6, 815-22.

Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P, 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Letters in applied microbiology, 43, 2, 149-54.

Berthold F, Boos J, Burdach S, Erttmann R, Henze G, Hermann J, Klingebiel T, Kremens B, Schilling FH, Schrappe M, 2005. Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. The lancet oncology, 6, 9, 649-58.

Bhakkiyalakshmi E, Suganya N, Sireesh D, Krishnamurthi K, Devi SS, Rajaguru P, Ramkumar KM, 2016. Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. European journal of pharmacology, 772, 92-8.

Blokland A, Menniti FS, Prickaerts J, (2012). PDE inhibition and cognition enhancement, Taylor & Francis.

Bozdemir Ç, Türkiye'de Yetişen Kekik Türleri, Ekonomik Önemi ve Kullanım Alanları. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 29, 3, 583-94.

Bracci M, Ciarapica V, Zabaleta ME, Tartaglione MF, Pirozzi S, Giuliani L, Piva F, Valentino M, Ledda C, Rapisarda V, 2019. BRCA1 and BRCA2 Gene Expression: Diurnal Variability and Influence of Shift Work. Cancers, 11, 8, 1146.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A, 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 68, 6, 394-424.

Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C, 2008. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. BMC cancer, 8, 1, 153.

Cao Y, Jin Y, Yu J, Wang J, Yan J, Zhao Q, 2017. Research progress of neuroblastoma related gene variations. Oncotarget, 8, 11, 18444-55.

Corbin JD, Francis SH, 1999. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. Journal of Biological Chemistry, 274, 20, 13729-32.

Das A, Durrant D, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC, 2015. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. Pharmacology & therapeutics, 147, 12-21.

De Bernardi B, Mosseri V, Rubie H, Castel V, Foot A, Ladenstein R, Laureys G, Beck-Popovic M, De Lacerda A, Pearson A, 2008. Treatment of localised resectable neuroblastoma. Results of the LNESG1 study by the SIOP Europe Neuroblastoma Group. British journal of cancer, 99, 7, 1027.

Demet Akdeniz ŞBT, Hülya Yazıcı, 2014. Retinoblastoma (RB) gen yolağı ve kanser. Türk Onkoloji Dergisi, 29(4), 173-80.

Dikmen BT, Bayraktar N, 2019. Meme Kanserinde Risk Faktörleri, Erken Tanı ve Tarama Programları. Turkiye Klinikleri Surgical Nursing-Special Topics, 5, 1, 1-7.

Dray N, 2011. Harrison’s Hematology and Oncology. Yale J Biol Med, 84, 1, 64-.

Elbal ER, Miñarro AG, Riestra ML, Cortés MB, Soler JF, 2019. Neuroblastoma: validation of the INRG classification system in a small series. Clinical and Translational Oncology, 1-5.

Emi M, Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Toge T, 2005. Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells. Breast cancer research, 7, 6, R940.

Eroglu C, Eryilmaz MA, Civcik S, Gurbuz Z, 2010. Meme Kanseri Risk Değerlendirmesi: 5000 Olgu. Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi, 20, 27-33.

Eros D, Szantai-Kis C, Kiss R, Keri G, Hegymegi-Barakonyi B, Kovesdi I, Orfi L, 2008. Structure-Activity Relationships of PDE5 Inhibitors (Supporting Material). Current medicinal chemistry, 15, 16, 1570-85.

Fan K, Li X, Cao Y, Qi H, Li L, Zhang Q, Sun H, 2015. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. Anti-cancer drugs, 26, 8, 813-23.

Fonseca IS, Bettencourt-Dias M, 2019. The Cell Cycle, Cytoskeleton and Cancer. In: Molecular and Cell Biology of Cancer. Eds: Springer, p. 51-74.

Fulda S, Debatin K-M, 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene, 25, 34, 4798.

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA, 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. CA: a cancer journal for clinicians, 55, 3, 178-94.

Gibson A, 2001. Phosphodiesterase 5 inhibitors and nitrergic transmission—from zaprinast to sildenafil. European journal of pharmacology, 411, 1-2, 1-10.

Giorgi M, Leonetti C, Citro G, Augusti-Tocco G, 2001. In vitro and in vivo inhibition of SK-N-MC neuroblastoma growth using cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. J Neurooncol, 51, 1, 25-31.

Giovannoni M, Vergelli C, Graziano A, Dal Piaz V, 2010. PDE5 inhibitors and their applications. Current medicinal chemistry, 17, 24, 2564-87.

Gupta A, Shridhar K, Dhillon PK, 2015. A review of breast cancer awareness among women in India: Cancer literate or awareness deficit? Eur J Cancer, 51, 14, 2058-66.

Gülsar MG, Özdemir HN, Çeviker K, Bağcı Ö, Tatar B, Yazkan R,

Erdemoğlu E, Tümorogenezde p53 Geni ve Genetik Tedavi Yaklaşımları. Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi, 4, 2, 133-5.

Günes-Bayir A, Kocyigit A, Güler EM, 2018. In vitro effects of two major phenolic compounds from the family Lamiaceae plants on the human gastric carcinoma cells. Toxicology and industrial health, 34, 8, 525-39.

Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, 2010. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). Archives of pathology & laboratory medicine, 134, 7, e48-e72.

Harris CC, 1996. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 88, 20, 1442-55.

Hashmi AA, Naz S, Hashmi SK, Irfan M, Hussain ZF, Khan EY, Asif H, Faridi N, 2019. Epidermal growth factor receptor (EGFR) overexpression in triple-negative breast cancer: association with clinicopathologic features and prognostic parameters. Surgical and Experimental Pathology, 2, 1, 6.

Hawsawi YM, Al-Numair NS, Sobahy TM, Al-Ajmi AM, Al-Harbi RM, Baghdadi MA, Oyouni AA, Alamer OM, 2019. The role of BRCA1/2 in hereditary and familial breast and ovarian cancers. Molecular genetics & genomic medicine, e879.

Herbert B-S, Wright WE, Shay JW, 2001. Telomerase and breast cancer. Breast cancer research, 3, 3, 146.

Holliday DL, Speirs V, 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast cancer research, 13, 4, 215.

Husejko J, Porada M, Bieniek D, Skierkowska N, Prylińska M, Ruszkowska N, Nawrocka A, Sępka J, Szczesna N, Swierczek P, 2019. Breast cancer as a significant social problem. Journal of Education, Health and Sport.

Igci A, Tukenmez M, Özkurt E, 2019. Male Breast Cancer. In: Breast Disease: Management and Therapies, Volume 2. Eds: Aydiner A, Igci A, Soran A. Cham: Springer International Publishing, p. 337-48.

Jain N, Harder L, Potter B, Krull KR, 2012. Cancers of Childhood: Biology and Forms. Neuropsychology of Cancer and Oncology, 205.

Janoueix-Lerosey I, Novikov E, Monteiro M, Gruel N, Schleiermacher G, Loriod B, Nguyen C, Delattre O, 2004. Gene expression profiling of 1p35–36 genes in neuroblastoma. Oncogene, 23, 35, 5912.

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan J-C, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias J-M, Dumont X, 1997. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. cell, 90, 4, 809-19.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer, 26, 4, 239.

Key TJ, Verkasalo PK, Banks E, 2001. Epidemiology of breast cancer. The lancet oncology, 2, 3, 133-40.

Koh C-C, Sheu J-C, Liang D-C, Chen S-H, Liu H-c, 2005. Complete surgical resection plus chemotherapy prolongs survival in children with stage 4 neuroblastoma. Pediatric surgery international, 21, 2, 69-72.

Kushner BH, Cohn SL, Matthay KK, Cheung N-KV, La Quaglia MP, Haas-Kogan DA, Wolden SL, Grupp SA, Cheung IY, Ambros PF, 2005. Treatment of neuroblastoma. In: Neuroblastoma. Eds: Springer, p. 123-92.

Laprie A, Michon J, Hartmann O, Munzer C, Leclair MD, Coze C, Valteau-Couanet D, Plantaz D, Carrie C, Habrand JL, 2004. High-dose chemotherapy followed by locoregional irradiation improves the outcome of patients with international neuroblastoma staging system Stage II and III neuroblastoma with MYCN amplification. Cancer, 101, 5, 1081-9.

Lee EYHP, Muller WJ, 2010. Oncogenes and tumor suppressor genes. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2, 10, a003236-a.

Leventoğlu E, 2019. Nöroblastom tanılı çocuk hastalarda izositrat dehidrogenaz 1 ve 2 mutasyonlarının genetik analiz ile araştırılması, T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara.

Liao D, Dickson R, 2000. c-Myc in breast cancer. Endocrine-related cancer, 7, 3, 143-64.

Liao W-S, Ho Y, Lin Y-W, Raj EN, Liu K-K, Chen C, Zhou X-Z, Lu K-P, Chao J-I, 2019. Targeting EGFR of triple-negative breast cancer enhances the therapeutic efficacy of paclitaxel-and cetuximab-conjugated nanodiamond nanocomposite. Acta biomaterialia, 86, 395-405.

Lim W, Ham J, Bazer FW, Song G, 2019. Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis via disruption of calcium homeostasis in human choriocarcinoma cells. Journal of Cellular Physiology, 234, 2, 1803-15.

Louis CU, Shohet JM, 2015. Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. Annu Rev Med, 66, 49-63.

Luo Y, Wu J-Y, Lu M-H, Shi Z, Na N, Di J-M, 2016. Carvacrol alleviates prostate cancer cell proliferation, migration, and invasion through regulation of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. Oxid Med Cell Longev, 2016.

Lv Q, Meng Z, Yu Y, Jiang F, Guan D, Liang C, Zhou J, Lu A, Zhang G, 2016. Molecular mechanisms and translational therapies for human epidermal receptor 2 positive breast cancer. International journal of molecular sciences, 17, 12, 2095.

MacFarland S, Bagatell R, 2019. Advances in neuroblastoma therapy. Current opinion in pediatrics, 31, 1, 14-20.

Malumbres M, 2020. Control of the Cell Cycle. In: Abeloff's Clinical Oncology. Eds: Elsevier, p. 56-73. e5.

Malumbres M, Barbacid M, 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision

in cancer. Nat Rev Cancer, 1, 3, 222-31.

Mbese Z, Aderibigbe BA, 2018. Biological Efficacy of Carvacrol Analogues. Recent patents on anti-infective drug discovery, 13, 3, 207-16.

McGregor LM, Rao BN, Davidoff AM, Billups CA, Hongeng S, Santana VM, Hill DA, Fuller C, Furman WL, 2005. The impact of early resection of primary neuroblastoma on the survival of children older than 1 year of age with stage 4 disease: the St. Jude Children's Research Hospital Experience. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 104, 12, 2837-46.

Melušová M, Jantová S, Horváthová E, 2014. Carvacrol and rosemary oil at higher concentrations induce apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. Interdiscip Toxicol, 7, 4, 189-94.

Messina E, Lupi F, Barile L, Giacomello A, 2004. Cyclic nucleotides and neuroblastoma differentiation. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 23, 8-9, 1551-4.

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

Moreno L, Marshall LV, Pearson ADJ, 2013. At the frontier of progress for paediatric oncology: the neuroblastoma paradigm. British Medical Bulletin, 108, 1, 173-88.

Murata T, Shimizu K, Watanabe Y, Morita H, Sekida M, Tagawa T, 2010. Expression and role of phosphodiesterase 5 in human malignant melanoma cell line. Anticancer Res, 30, 2, 355-8.

Nigg EA, 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. Nat Rev Mol Cell Biol, 2, 1, 21-32.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS, 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Gene, 366, 1, 2-16.

Nuchtern JG, London WB, Barnewolt CE, Naranjo A, McGrady PW, Geiger JD, Diller L, Schmidt ML, Maris JM, Cohn SL, 2012. A Prospective Study of Expectant Observation as Primary Therapy for Neuroblastoma in Young Infants, a Children's Oncology Group Study. Annals of surgery, 256, 4, 573.

Osborne C, Wilson P, Tripathy D, 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. The oncologist, 9, 4, 361-77.

Park JR, Eggert A, Caron H, 2008. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. Pediatric clinics of North America, 55, 1, 97-120.

Peng T, Gong J, Jin Y, Zhou Y, Tong R, Wei X, Bai L, Shi J, 2018. Inhibitors of phosphodiesterase as cancer therapeutics. European journal of medicinal chemistry, 150, 742-56.

Polyak K, 2011. Heterogeneity in breast cancer. The Journal of clinical investigation, 121, 10, 3786-8.

Prochazka P, Hrabeta J, Vicha A, Cipro S, Stejskalova E, Musil Z, Vodicka P, Eckschlager T, 2013. Changes in MYCN expression in human neuroblastoma cell lines following cisplatin treatment may not be related to MYCN copy numbers. Oncology reports, 29, 6, 2415-21.

Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert Š, 2007. Ras oncogenes and their downstream targets. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1773, 8, 1177-95.

Reid A, Vidal L, Shaw H, de Bono J, 2007. Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu). European journal of cancer, 43, 3, 481-9.

Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras MdM, Segura-Carretero A, Fathi H, Nasrabadi NN, Kobarfard F, Sharifi-Rad J, 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. Phytotherapy Research, 32, 9, 1688-706.

Sayers TJ, 2011. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for

cancer therapy. Cancer Immunology, Immunotherapy, 60, 8, 1173-80.

Schor NF, 1999. Neuroblastoma as a neurobiological disease. Journal of neuro-oncology, 41, 2, 159-66.

Schudt C, Hatzelmann A, Beume R, Tenor H, 2011. Phosphodiesterase inhibitors: history of pharmacology. In: Phosphodiesterases as Drug Targets. Eds: Springer, p. 1-46.

Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F, 2003. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. The lancet oncology, 4, 8, 472-80.

Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, del Mar Contreras M, Salehi B, Soltani-Nejad A, Rajabi S, Tajbakhsh M, 2018. Carvacrol and human health: A comprehensive review. Phytotherapy Research, 32, 9, 1675-87.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A, 2019. Cancer statistics, 2019. CA: a cancer journal for clinicians, 69, 1, 7-34.

Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M, 2015. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. Critical reviews in food science and nutrition, 55, 3, 304-18.

Thong T, Forté CA, Hill EM, Colacino JA, 2019. Environmental exposures, stem cells, and cancer. Pharmacology & Therapeutics, 107398.

Tonini GP, Nakagawara A, Berthold F, 2012. Towards a turning point of neuroblastoma therapy. Cancer Lett, 326, 2, 128-34.

Türkyılmaz M, Hacıkamiloğlu E, Baran Deniz E, Boztaş G, Dündar S, Kavak Ergün A, 2018. Türkiye kanser istatistikleri 2015. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara.

Vatansev H, 2014. Timokinon'un Meme Kanseri Hücresine Etkisi, Selçuk Üniversitesi, Konya.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN, 2003. The cell cycle: a

review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif, 36, 3, 131-49.

Wang X-J, Chen J-Y, Fu L-Q, Yan M-J, 2020. Recent advances in natural therapeutic approaches for the treatment of cancer. Journal of Chemotherapy, 1-13.

Weinstein JL, Katzenstein HM, Cohn SL, 2003. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. The oncologist, 8, 3, 278-92.

Westermann F, Schwab M, 2002. Genetic parameters of neuroblastomas. Cancer letters, 184, 2, 127-47.

Xu J, Chen Y, Olopade OI, 2010. MYC and breast cancer. Genes & cancer, 1, 6, 629-40.

Yeung KS, Gubili J, Mao JJ, 2018. Herb-Drug Interactions in Cancer Care. Oncology (Williston Park), 32, 10, 516-20.

Yılmaz S, 2011. Nöroblastomlu Hastalarda Sfingozin 1- Fosfat Reseptör 4 Gen Ekspresyonunun Sağlıklı Çocuklar ile Karşılaştırılması, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana.

Yokuş B, Çakır DÜ, 2012. Kanser biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1, 7-18.

Zurbonsen K, Michel A, Vittet D, Bonnet PA, Chevillard C, 1997. Dissociation between phosphodiesterase inhibition and antiproliferative effects of phosphodiesterase inhibitors on the Dami cell line. Biochem Pharmacol, 53, 8, 1141-7.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

**Adı:** Hilal

**Soyadı:** Testici

**Adres:** Karaaslandede Mah. Dede Molla sok. No:2/3 Karatay/KONYA

**Eğitim Durumu:** Üniversite

**Uyruk:** Türkiye Cumhuriyeti

**Doğum Tarihi:** 22.04.1992

**Doğum Yeri:** Gaziantep

**GSM:** 05335225623

**E-mail:** hilalkucukdurmaz@gmail.com

**Lisans:** Necmettin Erbakan Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği

**Lise:** Özel Erdem Anadolu Lisesi

**İş Deneyimi:**

1- Necmettin Erbakan Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Organik Kimya Araştırma Grubu 2014-2016 (stajyer öğrenci)
2- Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı 2016-halen(yüksek lisans)
3- Antibakteriyel Nanokaplama Teknolojilerinde Mükemmeliyet için İngiltere-Türkiye İşbirliği TÜBİTAK Projesi 2017-2019(bursiyer öğrenci)

**Sertifikalar:**

1- Western Blot Teorik Eğitimi ve Uygulama Teknikleri (6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi)
2- Q-Pcr Teorik Eğitimi ve Uygulama Teknikleri (6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi)

**Poster:**

1- Yeni Pirazol ve Pirazolin Türevlerinin Sentezi
   Hilal Küçükdurmaz, Erdal Kocabaş, Ahmet Coşkun, Fatih Erci, Hilal Kocabaş (III. Ulusal Organik Kimya Kongresi-2016)
2- MCF-7 Hücre Hattında Twist1 Geni Transfeksiyonunun Radyasyon Duyarlılığına Etkisi
   Bahadır Öztürk, Güler Yavaş, Suray Pehlivanoğlu, İlkay Sak, Hilal Testici (III. Uluslararası Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi-2019)
3- MDA-MB 231 Hücre Hattında Twist1 Antisense Gen Transfeksiyonunun Radyasyon Duyarlılığına Etkisi
   Bahadır Öztürk, Güler Yavaş, Suray Pehlivanoğlu, İlkay Sak, Hilal Testici, İlker Güven (III. Uluslararası Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi-2019)