T.C.

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAİCALEİN VE THYMOQUİNONE KOMBİNASYOUNUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİT VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

SONİA SHOKOUHY ARDEBİLİ

DANIŞMAN

PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2021

T.C.

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAİCALEİN VE THYMOQUİNONE KOMBİNASYOUNUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİT VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

SONİA SHOKOUHY ARDEBİLİ

DANIŞMAN

PROF. DR. ENGİN ULUKAYA

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2021

ETİK BEYAN

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “Biacalein ve Thymoquinone Kombinasyonunun Akciğer Kanseri Hücre Soyunda Sitotoksik/Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sonia SHOKOUHY ARDEBİLİ

İTHAF

Bu tezi, bana her daim destek olan biricik
Annem Malahat RAHİMİ ve babam Nasereldin SHOKOUHY ARDEBİLİ ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımda danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren ve her konuda desteğini, bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, bilime olan heyecanını her toplantıda hissettiren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Tüm yüksek lisans ve laboratuvar hayatım boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan, yol gösteren ve desteklerini hiç esirgemeyen çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Didem KARAKAŞ ZEYBEK'e, Dr. Öğr. Üyesi Nazlıhan AZTOPAL'a,

Çalışmalarımız boyunca bana her konuda destek olan, benden moral ve desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım çalışma arkadaşlarım DR. Mehdi HOSSENİ'ye, Remzi Okan AKAR'a, Merve ERKISA GENEL'e, Melda SARIMAN'a

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi sevgili ailem, babam Nasereldin SHOKOUHY ARDEBİLİ, annem Malahat RAHİMİ ve kardeşim Sina SHOKOUHY ARDEBİLİ'ye en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Sonia SHOKOUHY ARDEBİLİ

08/09/2021

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN i

İTHAF ii

TEŞEKKÜR ..... **I**

İÇİNDEKİLER ..... **II**

TABLO LİSTESİ ..... **IV**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **V**

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **VII**

ÖZET ..... **X**

ABSTRACT ..... **XI**

GİRİŞ **1**

1. GENEL BİLGİLER **3**

1.1.Kanserin Ayırt Edici Özellikleri 4

1.2.Akciğer Kanseri 10

1.2.1.Akciğer Kanserinin Risk Faktörleri 11

1.2.2. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi 12

1.2.3. Akciğer kanseri tedavisi 15

1.3.Apoptoz 16

1.4.Nekroz 26

1.5. Epiteliyal-Mezankimal Geçiş (EMT) 28

1.6.Baicalein veTimokinon (Thymoquinone) İlaçlar 29

1.6.1.Baicalein 29

1.6.2.Timokinon(Thymoquinone) 30

2.MATERYAL METOD **33**

2.1. Materyal 33

2.1.1. Kimyasal Maddeler 33

2.1.2. Sarf Malzemeler 34

2.1.3.Kullanılan Cihazlar 35

2.2. Metot 36

2.2.1. Bicalein ve Timokinin Bileşiklerin Hazırlanması 36

2.2.2. Hücre Kültürü 36
2.2.3. Hücre stoklanması 36
2.2.4.Hücre Soyların Stoktan Çıkarılması 37
2.2.5.kullanılan besiyerini hazırlanması 37
2.2.6.Hemositometre ile hücre sayımı 37
2.2.7.Sulforhodamin B (SRB) testi ile canlılık Tayini 37
2.2.8.Akım sitometrisi ile AnneksinV/7-Amino aktinomisin(7AAD) Belirlenmesi 40
2.2.9. Akım Sitometrisi ile Kaspaz 3/7 Aktivasyon Analizi 42
2.2.10. Migrasyon (yara iyileştirmesi) Testi Analizi 43
3.BUGULAR 44
3.1. SRB Canlılık Testi Sonuçları(etkin doz belirlemesi için) 44
3.1.1.Baicaleinin % Büyüme Oranı (growth rate) Üzerindeki Etkinin İncelenmesi 44
3.1.2. Timokinin'un %büyüme oranı üzerindeki etkisinin incelenmesi 46
3.1.3. Kombinasyon çalışmaları 47
3.2. Akım Sitometrisi Bulguları 63
3.2.1. Anneksin V Testi 63
3.2.2.Kaspaz 3/7 Testi 66
3.3. Migrasyon Testi Bulguları 69
4.TARTIŞMA 71
5. SONUÇ: 73
KAYNAKÇA 74

TABLO LİSTESİ

Tablo1. 1. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar (Engin, Ceyda, & Yusuf, 2011).....27
Tablo2. 1. Anneksin V , 7-AAD'de saptanma sonuçlar 41
Tablo2. 2. kaspaz 3/7 , 7-AAD saptanan sonuçlar.....42
Tablo 3. 1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında Baicalein'in farklı konsantrasyonlarının uygulandıktan sonra hesaplanan GI50 (anti proliferatif etki), TGI (sitostatik etki), LC50 (sitotoksik etki) değerleri görünmektedie. 45
Tablo 3. 2. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında Thymoquinone'nin farklı konsantrasyonlarının uygulandıktan sonra hesaplanan GI50 (anti proliferatif etki), TGI (sitostatik etki), LC50 (sitotoksik etki) değerleri görünmektedie. 46
Tablo 3. 3. A549 ve Beas-2B hücrelerinde uygulanan BAİ ve TİMO 24s tedavi sonrası IC50 ve IC90 değerleri 51
Tablo 3. 4. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B hücre hattı (B) için 24 saat tedavi uyguladıktan sonra Kombinasyon indeksi (CI; combination index) değerleri, CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazılımı kullanılarak Chou-Talalay metoduna göre hesaplandı. 52
Tablo 3. 5. A549 ve Beas-2B hücrelerinde uygulanan BAİ ve TİMO 48s tedavi sonrası IC50 ve IC90 değerleri. 56
Tablo 3. 6. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B hücre hattı (B) için 48 saat tedavi uyguladıktan sonra Kombinasyon indeksi değerleri, CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazılımı kullanılarak Chou-Talalay metoduna göre hesaplandı. 57
Tablo 3. 7. A549 ve Beas-2B hücrelerinde uygulanan BAİ ve TİMO 72s tedavi sonrası IC50 ve IC90 değerleri. 61
Tablo 3. 8. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B hücre hattı (B) için 72 saat tedavi uyguladıktan sonra Kombinasyon indeksi (CI; combination index) değerleri, CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazılımı kullanılarak Chou-Talalay metoduna göre hesaplandı. 62
Tablo 3.9. Baicalein ve Timokinon ve bunların kombinasyonların bileşiğinin 24 ve 48 saat boyunca uygulaması sonrası A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde anneksin-V değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi. 65
Tablo 3. 10. Baicalein ve Timokinon bileşiğinin ve bunların kombinasyonların 24 ve 48 saat boyunca uygulaması sonrası A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi. 68

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1.Kanser ayırt edici özellikleri (Hanahan & Weinberg, 2011) 4
Şekil 1. 2. Beas-2b Sağlıklı akciğer hücre hattın morfolojisi 10
Şekil 1. 3. Akciğer kanserin adenokarsinom hücre hattın morfolojisi 11
Şekil 1. 4. Apoptoz aşamaları (Guerin, McKernan, O'Brien, & Cotter, 2006). 18
Şekil 1. 5. Memeli hücrelerde Apotozis yolakları. 25
Şekil 1. 6. Baicalein bileşiğinin doğl ve kimiyasa şekli 29
Şekil 1. 7. Thymoquinone bileşiğinin doğal ve kimyasal şekli 30
Şekil 3. 1.A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı(B) uygulanan Baicalein hücre canlılığının doz ve zamana bağlı şekilde değışıklık gösterdiği belirlenmiştir.her doz için birbirine bağımlı 3 tekra olacak şekilde tedavi uygulandı ve hesapladığımız GI50, TGI ve LC50 değerlerini tablo (3.1) de görunmektedir 45
Şekil 3. 2. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı (B) uygulanan timokinon hücre canlılığının doz ve zamana bağlı şekilde değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Her doz için birbirine bağımlı 3 tekrar olacak şekilde tedavi uygulandı ve ve hesapladığımız GI50, TGI ve LC50 değerlerini tablo (3.2) de görunmektedir. 46
Şekil 3. 3. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı (B) Timokinon ve Baicalein farklı konsantrasyonlarında uygulanarak 24saat inkübe edildi ve sonrasında SRB metodu gerçekleştirildi. SRB boyalı kontrast mikroskobu (4X) görüntülenerek doza bağlı olarak ters orantılı azalma gösterdiği saptandı. 49
Şekil 3. 4. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı (B) Bicalein ve Timokinon farklı konsantrasyonlarda uygulanarak 24 saat sonrasında SRB canlılık metodu gerçekleştirilerek, doza bağlı olarak ters orantılı canlılığın azaldığı tespit edildi. Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (:*p<0,05; *:* p<0,01; ***:p<0,001), kombinasyonun bai'a göre (+:p<0,05; ++:p<0.01; +++:p<0.001) ve kombinasyonun Timo'ya göre (#:p<0,05 ##:p<0,01; ###; p<0.001) karşılaştırılığında istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak hesaplandı. 51
Şekil 3. 5. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B (B) için 24 saat tedavi uygulandıktan sonra CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazalımı kuşşanşlarak Chou-Talalay metoduna göre calcusyn grafikleri çizildi. 52
Şekil 3. 6. . A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B hücre hattı(B) Baicalein ve Timokinon farklı konsanrasyonlarda uygulanarak 48saat inkübe edileldi ve sonrasında SRB metodu gerçekleştirildi. SRB boyalı faz kontrast mikroskobu (4X) görüntülenerek doza bağli olarak ters orantılı azalma gösterdiği saptandı. 54
Şekil 3. 7 . A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı (B) Bicalein ve Timokinon farklı konsantrasyonlarda uygulanarak 48 saat sonrasında SRB canlılık metodu gerçekleştirilerek, doza bağlı olarak ters orantılı canlılığın azaldığı tespit edildi. Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (:*p<0,05; *:* p<0,01; ***:p<0,001), kombinasyonun bai'a göre (+:p<0,05; ++:p<0.01; +++:p<0.001) ve kombinasyonun Timo'ya göre (#:p<0,05 ##:p<0,01; ###; p<0.001) karşılaştırılığında istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak hesaplandı. 56

Şekil 3. 8. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B (B) için 48 saat tedavi uygulandıktan sonra CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazalımı kuşşanşlarak Chou-Talalay metoduna göre calcusyn grafikleri çizildi. 57
Şekil 3. 9. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B hücre hattı(B) Baicalein ve Timokinon farklı konsanrasyonlarda uygulanarak 72 saat inkübe edileldi ve sonrasında SRB metodu gerçekleştirildi. SRB boyalı faz kontrast mikroskobu (4X) görüntülenerek doza bağli olarak ters orantılı azalma gösterdiği saptandı. 59
Şekil 3. 10. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı (B) Bicalein ve Timokinon farklı konsantrasyonlarda uygulanarak 72 saat sonrasında SRB canlılık metodu gerçekleştirilerek, doza bağlı olarak ters orantılı canlılığın azaldığı tespit edildi. Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (:*p<0,05; *:* p<0,01; ***:p<0,001), kombinasyonun bai'a göre (+:p<0,05; ++:p<0.01; +++:p<0.001) ve kombinasyonun Timo'ya göre (#:p<0,05 ##:p<0,01; ###; p<0.001) karşılaştırılığında istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak hesaplandı. 61
Şekil 3. 11. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B (B) için 72 saat tedavi uygulandıktan sonra CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazalımı kuşşanşlarak Chou-Talalay metoduna göre calcusyn grafikleri çizildi. 62
Şekil 3. 12. Baicalein (50µM), timokinon (25µM) ve bu iki dozun kombinasyonu (Bai 50µM+Timo 25µM), A549(insan akciğer kanser hücrelerinde), Anneksin-V değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 ve 48 saatlık histogramları (a: sağlıklı hücreler, b:erken apoptotik hücreler, c: geç apoptotik hücreler, d: nekrotik hücreler). 64
Şekil 3. 13. Baicalein (50µM), Timokinon (25µM) ve bu iki dozun kombinasyonu(Bai 50µM+Timo 25µM), A549(insan akciğer kanser hücrelerinde), kaspaz 3/7 değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 ve 48 saatlık histogramları (a: sağlıklı hücreler, b: kaspaz 3/7 aktif olan erken apoptotik hücreler; c: kaspaz 3/7 aktif olan geç apoptotik hücreler; d: kaspaz 3/7 aktif olmayan nekrotik hücreler). 67
Şekil 3. 14. Baicalein (12,5µM), Timokinon (6,25µM) ve bu iki doz ilaçın kombinasyonıyla, A549 (insan akciğer kanser) hücre hattı üzerindeki uygulanan tedavi etkisinin 24, 48, 72 saatte yara iyileştirme testinde görüntüleri. 70

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
7-AAD	: 7-Amino Aktinomisin D
AİDS	: Edinilmiş Bağşıklık Yetmezliği Sendromu
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktifleştirici Faktör -1
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAD	: Bcl-2 ile ilişkili ölüm destekleyicisi
BAİ	: Baicalein
BAX	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
BCL-2	: B Hücre Lendoma-2
BİD	: BH3 Etkileşimi Domainin Ölüm Agonisti
BRCA1	: Meme Kanseri tip1 duyarlılık proteini
CAD	: Kaspaz Aktive olan Deoksiribonükleaz
CADİ	: Kaspaz Aktive olan Deoksiribonükleaz İnhibitörü
Cİ	: Kombinasyon İndeksi
CL-q	: Kollektin
DD	: Ölüm Domaini
DDP	: Sisplatin
DİSK	: Ölüme neden olan neden olan Sinyal Kompleksi
DNA	: Deoksi Ribo Nükleik Asit
DR	: Ölüm Reseptörü
ECM	: Hücre Dışı Matriks
EGFR	: Epitelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	: Epitelyal – Mezankimal Dönüşümü
ENA78	: Epiteliyal Nötrofil Çekici 78
ER	: Endoplazmik Retikulum

ERK : Ras ile indükleyen hücre dışı sinyalleri düzenleyen Kinaz

FADD : Fas ilişkili Ölüm Domaini proteini

FASL : Fas Ligand

FGFR1 : Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1

FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü

GAAD45 : DNA hasarı proteini 45

GTP : Guanozin Tri fosfat

HDAC : Histon Deasetilaz

HDACİ : Histon Deasetilaz İnhibitörü

HER2 : İnsan Epidermai Büyüme Faktörü Reseptörü

HPV : İnsan Papiloma Virüsü

HRAS : Harvey Sıçan Sarkoma Virüsü

ICDA : Kaspazla Aktive olan Deoksiribonükleaz İnhibitörü

İL-8 : İnterleukin-8

KHAK : Küçük Hücreli Akciğer Kanseri(Adeno Karsinoma)

KHDAK : Küçük Hücreli Dışı Akciğer kanseri (Adeno Karsinoma)

KARS : Kirst Siçan Sarkoma onkogenetik Homologu

KASPAZ : Sistein Aspartat Spesifik Proteaz

LOX : Lipo Oksijenaz

MAPK :Mitojen Aktifleştirici Protein Kinaz

MCF-7 : Meme Kanserin hücre soylarından

MET : Mezankimal – Epiteliyal Dönüşüm

NK : Doğal Katiller

NRAS : Nöroblastoma RAS viral onkogen Homoloğu

Pİ3K : Fosfotidil İnozitol 3 Kinaz

PARP : Poli ADP Ribo Polimeraz

PM : Partikül Madde

PS : Fosfatidil Serin

PTEN :Fosfataz ve Tensin Homolog Proteini

RB	: Retinoblastoma
ROS	: Reaktif oksijen Türleri
RT	: Radiyoterapi
STAT-3	: Sinyal dönüştürücü Transkripsiyon proteini-3
TCA	: Tri Karboksilik Asit
TGF-B	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü – B
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-α
TSP	: Trombospond
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TRAILR2	: TNF ilişkili Apoptozis indikleyici dpmain 2
TRADD	: TNF-1 ile ilişkili Ölüm Alanı
TQ	: Thymoquinone
VEGF	: Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü

ÖZET

BAİCALEİN VE THYMOQUİNONE KOMBİNASYOUNUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sonia Shokouhy

Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi

Prof. Dr. Engin Ulukaya

2021

Akciğer kanseri dünya çapında önde gelen ölüm nedenidir. Kemoterapi tedavi sonrası hücrelerde meydana gelen direnç, kanser ölümlerin çoğalmasının nedenidir. Bu nedenle akciğer kanseri tedavisinde yönelik yeni ilaç ve tedavi stratejilerinin araştırmasının yanında bu ilaç adaylarının etkilediği moleküler yolaklarının aydınlatılması araştırmacıların önemli çalışma sahalarındandır. Baicalein ve Timokinon bileşiklerle yapılan çalışmalarda kanser tedavisinde umut verici etkilerden dolayı yeni çalışmalara yol açmıştır. Baicalein bir flavonoiddir. Pro-apoptotik, anti-metastatik, ve anti-proliferatif etkileri mevcuttur. Hücre döngüsünü yeniden düzenlediği de bilinmektedir. Timokinon, anti-inflamatuar, anti-oksidan, ve anti-kanser özelliklere sahiptir. Apoptoz, invazyon, metastaz, anjiogenez ve proliferasyon da dahil olmak üzere birçok kanser sürecini etkilemektedir. Bu iki ajan anti-kanser etkilerinden dolayı kombinasyon olarak bu tez çalışmasında kullanılmıştır. A549 insan akciğer kanser hücre hattı ve Beas-2B sağlıklı akciğer hücre hattı üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Baicalein ve Timokinon bileşiklerinin hücre canlılğın üzerine etkileri SRB canlılık testi ile incelenmiştir. Bu iki ajanları belirlenen dozlarda kombinasyon yapılmış ve söz konusu olan A549 hücre hattında ölüm mekanizmasının belirlenmesi amacıyla akım sitometrisi kullanmıştır. Bunlarla birlikte A549 hücre hattı üzerinde Baicalein ve Timokinon ve kombinasyonlarıyla, metastatik sürece olan etkisini değerlendirmek amacıyla migrasyon testi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak yapılan iki ilaçın kombinasyonunun sitotoksik etkisi, invazyonu azaltmakta ve pro-apoptotik etkisi tekli ajanlara göre daha etkili olduğu görülmektedir. Bu iki ilacın kombinasyonu akciğer kanserinde umut vaad eden bir tedavi seçeneği olabileceği öngörüsüyle farklı kanser türleri de dahil in vitro deneylerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanser, Apoptoz, Anti-kanser ilaç, , Baicalein, Thymoquinone,

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF BAICALEIN AND THYMOQUINONE COMBINATION ON LUNG CANCER CELL LINE

Sonia Shokouhy

Cancer Biology and Pharmacology

Prof. Dr. Engin Ulukaya

2021

Lung cancer is the leading cause of death worldwide. The resistance that occurs in the cells after chemotherapy treatment is the cause of the proliferation of cancer deaths. Therefore, besides the research of new drugs and treatment strategies for the treatment of lung cancer, the elucidation of the molecular pathways affected by these drug candidates is one of the importent fields of work of researchers. Studies with baicalein and thymoquinone compounds have paved the way for new studies due to their promising effects in cancer treatment. Baicalein is a flavonoid that has pro-apoptotic, anti-metastatic, anti-proliferative effects and reorganizes the cell cycle. Thymoquinone has anti-inflammatory, antioxidant and anti-cancer properties. It affects many cancer processes, including apoptosis, migration, invasion, angiogenesis and proliferation. Due to the anti-cancer effects of these two agents and in order to obtain more effecttive drugs from them, the compound in which the two agents are combined, the cytotoxic effects on the human lung cancer cell line (A549) and the healthy lung cell line (Beas-2B) were investigated in this thesis. The cell viability of baicalein and thymoquinone compounds was investigated by effective SRB viability test. These two agents were combined at the determined doses and flow cytometry was used to determine the mechanism of death in the A549 cell line in question. Finally, the migration (wound healing) test was performed on the A549 line with Baicalein and Thymoquinone and their combinations to evaluate the effect on the metastatic process. As a result, the combination of the two drugs seems to be more effective than singel agents with cytotoxic effect, reducing migration effect and pro-apoptotic effect. With the prediction that the combination effect of these two drugs could be a promising treatment options in lung cancer, it was concluded that in vitro experiments including different cancer types should be performed.

Keywords: Lung cancer, Apoptosis, Anti-cancer drug, Baicalein, Thymoquinone

GİRİŞ

Kanser tüm ülkelerde ve dünya çapında önde gelen ölüm nedenidir. Kanser rastlanma sıklığı, nüfus arttıkça vaka ve ölüm sayısının hızlı bir şekilde artması beklenmektedir. Tabii ki yaşam koşulları da bu hızı etkilemektedir. Genellikle yaşam tarzının risk faktörlerini belirlediği düşünülmekte ve bu risk faktörlerinin çoğu tütün ve alkol kullanımı, fiziksel hareketsizlik, aşırı vücut ağırlığı, beslenme ve en yaygın olarak hayatımızdaki stres oranına bağlıdır (Torre, Siegel, Ward, & Jemal, 2016). Akciğer kanseri geçen yüzyılda sigara içmenin yaygınlaşmasıyla büyük bir artış göstermiştir. Sigara içmek akciğer kanseri riskini beş ile on kat arttırmaktadır. Ayrıca çevresel tütün dumanına da maruz kalmak da %20 akciğer kanser riskini arttırdığı bilinmektedir (Schwartz & Cote, 2016). Akciğer kanseri en sık görülen kansere bağlı ölüm nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum akciğer kanserini tüm dünyayı tehdit eden önemli bir sorun boyutuna getirmiştir. Akciğer kanserinin, tanı ve tedavi ile önlenmesine yönelik gelişmelerin önemli bir kısmı diğer kanser türlerinde olduğu gibi son yirmi beş yılda sağlanmıştır. Yirmi birinci yüzyıla girerken akciğer kanserindeki en büyük gelişmelerden biri de sistematik bir hastalık olduğunu öğrenilmesidir. Akciğer kanseri ile ilgili çalışmalar, kanser öncüsü lezyonların gelişimine ve kansere yatkın olmaya etkili faktörleri ayırt etmemizi sağlamaktadır. Akciğer kanseri gelişme riski yüksek olan bireylerin belirlenmesi ve bu kişilere önleyici tedavilerin uygulanması giderek önem kazanmaktadır. Cerrahi tedavi yöntemlerinin gelişimi ile daha başarılı rezeksiyon uygulamalarının, yeni teknolojik uygulamalar sayesinde radyoterapide daha etkili sonuçlar, ve farklı tedavi modellerinin kombinasyonların daha yüksek yanıt oranları ile daha uzun sağkalım sürelerine ulaşılabilmektedir. Akciğer kanseri oldukça invaziv, hızlı metastaz yapan ve yaygın bir kanser olduğundan tez konusu olarak belirlenmiş ve çalışılmıştır. Günümüzde en yayın kullanılan tedavi şekillerinden kemoterapi, ağız yoluyla verilen ya da damar içinde enjekte edilen anti-kanser ilaçlarını kapsamaktadır. Bu sebeple agresif olup invazyon ve metastaza yatkın olan kanserler tiplerine uygun tedavi olanağı sunmaktadır. Son yıllara kadar küçük hücreli olmayan akciğer kanserde kullanılan en yaygın kemoterapi ajanı olan Cisplatin(DDP), tek başına kullanılmaktadır ve yanıt oranı %21 olarak belirlenmiştir. Adjuvant terapide kullanılması ile birlikte tedavinin etkinliğinin arttığı ortaya konmuştur (Group, 1995). Son zamanlarda akciğer kanser hücreleri, Cisplatin ajanına direnç kazandığı bilinmektedir. Baicalein uygulaması ile karşılaştırıldığında Cisplatin e karşı oluşan direncin

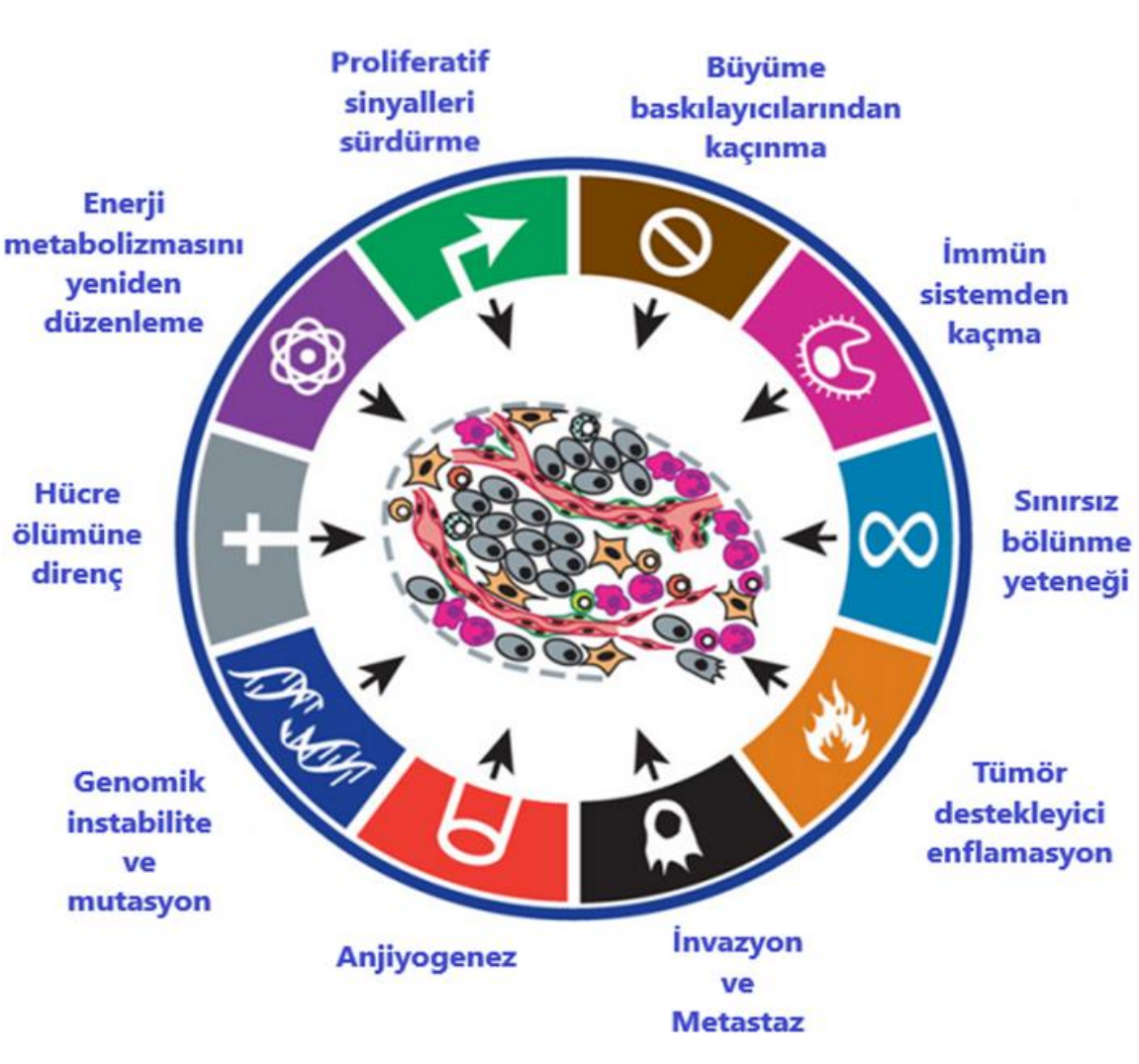
kırıldığı bilinmektedir Baicalein, flavonoid bir bileşik olup anti- inflamatuar, anti-kanser, ve anti-viral özelliklere sahip olduğu ortaya konmuştur. Timokinon biyoaktif bir bileşikdir. Timokinon (TQ), Nigella Sativa kara kimo tohumu diye de adlandırılmaktadır. Timokinon, çörek ötu ekstraktlardan izole edilmiş olup anti-kanser etkisinin ortaya konması amacı ile birçok preklinik çalışma, farmakolojik, ve tıbbi faaliyetler gerçekleştirilmiştir. Timokinon; anti-inflamatuar, anti- oksidan, anti-neoplastik ajan olarak kullanılmaktadır ve anti-kanser etkisi tespit edilmiştir. Apoptoz, invazyon, metastaz, anjiogenez ve proliferasyon da dahil olmak üzere birçok farklı yolakta etki mekanizmasına sahip olduğu belirlenmiştir. Çeşitli araştırmalara göre Timokinon, A549 hücrelerinin büyümesini inhibe etmiştir (J. Yang, X.-r. Kuang, P.-t. Lv, & X.-x. Yan, 2015). Bu tezde kullanılan iki ajan, anti-kanser etkilere sahiptir ve iki ajanın kombinasyonun etkileri araştırılmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında, Baicalein ve Timokinon hem tek başına hem de kombinasyon halinde A549 insan akciğer kanser hücre hattı ve Beas-2B insan sağlıklı akciğer hücre hattı üzerinde sitotoksik etkinliği ve etkinin moleküler mekanizması araştırılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

Kanser, dünya çapında önde gelen ölüm nedenidir. 200 milyon yılından fazla süredir çok hücreli canlılar arasında kanser profiline sahip hücreler olduğuna dair kanıtlar mecuttur (Hausman, 2019). Kanser yirminci yüzyılın en önemli hastalıklarından biri olarak kabul görmektedir. Yirmi birinci yüzyıl içerisinde artması devam etmekte olup yükselen insidansla daha da yayılmaktadır. Yükselen insidans dünyadaki her dört kişiden birinin kanser olabileceğini ortaya koymaktadır (Roy & Saikia, 2016). Kanser, hücrelerin anormal büyümesidir. Bu hastalık, genotip veya çevresel faktörlerden kaynaklanmakta olup büyümeyi durdurma yeteneğini yitirmiş hücrelerden oluşur. Kanser hücreleri aşırı ve kontrolsuz bir şekilde çoğalıp çevre dokulara yayılabilmektedir. Genelikle kanser tespit edilmeden önce, kanser dokusu 1cm büyüklüğüne ulaşmalı veya bir milyon hücreden oluşmalıdır. Bu durumda doku kitle, tümör, nodül, yumru, veya lezyon olarak adlandırılmaktadır. Bu genel kurala istisna olarak kan ve kemik iliği kanserleri (lösemi ve lemfomalar) yer alır. Bunlar sıklıkla bir kitle oluşturmaz, ancak laboratuvar testlerinde görülür(Roy & Saikia, 2016). Kanser multifaktöriyel bir hastalık olarak bilinmekte olup kanser hücrelerinin büyümesi, invazyonu, metastazı, ve hastalığın gelişmesi hastadan hastaya farklılık gösterebilir. Kanser büyümesinin engellenmesi için bu dört yontemden birisi ya da birden fazlası kullanılabilmektedir. 1. kanser dokuya cerrahi müdahale uygulanması, 2. kemoterapi veya hormon tedavisi gibi, kansere özgü başka bir yaklaşımda bulunulması, 3. Radyoterapi uygulaması, 4. kanser hücrelerin kendiliğinden küçülebilir ve sonunda kaybolabilir. Cerrahi, kanser tedavisinde başarılı olan ilk olarak bilinmekte ve tümörlere karşı uygulanmaktadır. kemoterapi, hem bölünen hemde dormansideki hücrelerde sitotoksik etkisiyle (oral veya intarvenöz, genelikle kombinasyon halinde) hücre ölümünü tetiklemektedir. Kemoterapi, yaygın malign hastalıklar için kullanılan agresif bir kimyasal uygulamasıdır ve bir ana tedavi yöntemi olarak bilinmektedir. Kemoterapide amaç, kanser hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını önleyerek hücre ölümünün tetiklenmesini sağlamaktır. Günümüzde bilim insanlarının bu alanda en çok sorduğu soru; “kanser tedavi edilebilir mi?” olup, bu sorunun cevabı “EVET” olarak ifade edilmektedir. Erken teşhis edilirse (mamogram, kolonoskopi, papsmear muayenesi gibi tarama testleri ile) tüm kanser tipleri tedavi edilebilir. Erken teşhis, herhangi bir kanser tipine karşı sağkalımın anahtarıdır (Roy & Saikia, 2016).

1.1.Kanserin Ayırt Edici Özellikleri

Kanserin altı ayırt edici özelliği; tümör büyümesi, kanser hareketi, hücre ölüm yolaklarından kaçış gibi yaşamsal fonksiyonları etkileyen çeşitli tanımlayıcı özellikler etrafında şekillenmiştir (Hanahan & Weinberg, 2000).



Şekil 1. 1.Kanser ayırt edici özellikleri (Hanahan & Weinberg, 2011)

Proliferatif sinyeller sürdürme : Muhtemelen kanser hücrelerinin en temel özelliği , kronik proliferasyonu sürdürebilme yeteneğidir. Normal dokular büyümeyi teşvik eden sinyallerin üretimini ve salımını kontrol etmektedir. Hücre büyüme ve bölünme döngüsünün başlaması ve ilerlemesine etki etmektedir. Bu sayede hücre sayısının homeostazını, normal dokunun mimarisini, ve işlevinin korunması sağlanmaktadır. Etkileştirilen sinyaller, büyük ölçüde

hücre içi tirozin kinazlara bağlı ve hücre yüzeyindeki reseptörlere büyüme faktorleri ile iletilir. Hücre döngüsü bölünmeyi ve büyümeyi kontrol eden bir süreç olup büyüme sinyalinin iletilmesini takiben başlar ve sinyalin sürekliliğinin oluşması ile kontrolsüz bölünme sekansı başlamış olur. Genelikle bu sinyaller hücre sağkalım ve enerji metabolizması gibi diğer biyolojik fonksiyonları etkiler (Lemmon & Schlessinger, 2010; Witsch, Sela, & Yarden, 2010). Kanser hücreleri profilerasyonun devamını sağlamak üzere bölünme ve büyüme sinyalinin devamlılığını sağlayabilmektedir. Ayrıca belirli kanser hücreleri kendi büyüme reseptörlerini üreterek ligandları ile eşleyebilir ve bölünme sinyalinin dışarıdan gelmesine ihtiyaç duymadan bölünebilir. Bu durum otokrin büyüme olarak adlandırılır (Bhowmick, Neilson, & Moses, 2004; Cheng, Chytil, Shyr, Joly, & Moses, 2008).

Büyüme baskılayıcılardan kaçınma: sağlıklıklı hücrelerde proliferasyonu sınırlayan ve tümör baskılayıcı proteinler tarafından kontrol edilen yolaklar mevcuttur. Bu sebeple kanser hücreleri yaşamlarını sürdürmek için proliferasyonunu sınrlayan tümör baskılıyıcı yolaklardan kaçınmak zorundadır(Sun & Yang, 2010). Hücre döngüsünü durduran veya indükleyen çok çeşitli faktorler vardır. Rb(retinobelastoma) ve p53 gibi proteinler, çeşitli hücre dışından ve hücre içinden gelen sinyaller ile başlatılmış hücre döngüsünü durdurabilir (Harbour & Dean, 2000; Kruiswijk, Labuschagne, & Vousden, 2015). Bu proteinleri ifade eden genler mutasyona uğrayabilir ve anti-kanser işlevlerini kaybedebilirler (Deshpande, Sicinski, & Hinds, 2005; Sherr & McCormick, 2002). Programlanmış hücre ölümünü teşvik edebilmeye ek olarak, bölünme sinyalinin devamlılığının sonlandırılması gibi işlevleri mevcuttur. Kanser hücreleri de hücre çoğalmasını olumsuz yönde düzenleyen anti-kanser etkiye sahip çeşitli proteinlerden kaçınabilmektedir. Bu proteinlerin çoğu tümör baskılayıcı genler tarafından düzenlenmektedir. Hücre büyümesini ve çoğalmasını sınırlamak için çeşitli şekillerde çalışan düzinelerce tümör baskılıyıcı, bir veya başka tür hayvan veya insan kanserinde karkteristik inaktivasyonları ile keşfedilmiştir. Bu genlerin çoğu, farelerde fonksiyon kazancı veya kaybı deneyleri yoluyla tümör baskılıyıcı özelliğe sahip olduğu doğlulanmıştır. iki prototipik tümör baskılıyıcı RB (retinoblastoma ilişkili) ve TP53 bu alanda proteinleri kodlar. Hücrelerin çoğalma kararlarını yöneten veya alternatif olarak

senescence (yaşlanma) ve apoptotik programları etkileştiren iki temel tamamlıyıcı hücresel düzenleyici devre içinde merkezi kontrol düğümleri olarak çalışırlar.

RB proteini, çeşitli hücre dışı ve hücre içi kaynaklardan gelen sinyalleri entegre eder ve yanıt olarak, bir hücrenin büyüme ve bölünme döngüsü boyunca devam edip etmeyeceğine karar verir (Burkhart & Sage, 2008; Deshpande et al., 2005; Sherr & McCormick, 2002). RB, büyük ölçüde hücrelerinin dışından kaynaklanan büyüme önleyici sinyalleri aktarmaktadır. TP53, hücre içi işletim sistemlerinde çalışan stres ve anormallik sensorlerinden girdiler alır. Genomdaki hasar derecesi aşırıysa veya nükleotid havuzları, büyümeyi teşvik eden sinyaller, glikoz veya oksijenasyon seviyeleri yetersiz ise, TP53 bu koşullar normale donene kadar hücre döngüsü ilerlemesini durdurulmasını sağlar. Alternatif olarak, bu tür hücresel alt sistemlerde onarılmaz hasar gösteren alarm sinyalleri karşısında, TP53 apoptoz tetikleyebilir. Özellikle aktif TP53'ün çeşitli etkileri karmaşık ve yüksek bağlam açısından bağımlıdır. Hücre tipi, hücre stresi, ve genomik hasar koşullarının şiddetine ve kalıcılığına göre değişmektedir. TP53 ve RB hücre çoğalmasını düzenlemede önemli öneme sahip olsa da, çeşitli araştırmalar iki genin de daha büyük ve kompleks yolakların üzerinde farklı etkileri olduğunu göstermektedir. Örneğin, vücütları boyunca fonksiyonel bir RB geni olmayan bireysel hücrelerle doldurulan kimerik fareler, RB işlevinin kaybının bu hücrelerde ve onların lineal soyundan gelen hücre bölünme döngüsünün sürekli ateşlenmesine izin vereceği beklentisine rağman şaşırtıcı derecede üretken anormallıklerden arınmıştır; RB null hücrelerinin elde edilen hücre topluluklarından neoplaziye gitmesi beklenmektedir. Bunun yerine, bu tür kimerik farelerdeki RB null hücrenin vücutta nispeten normal doku morfogenezine katıldığı bulunmuştur (Lipinski & Jacks, 1999).

Hücre ölümüne direnmek : Hücre ölümü apoptozla programlanmakta ve boylece kanserin gelişmesinin doğal bir şekilde engellemektedir (Adams & Cory, 2007; Evan & Littlewood, 1998; Lowe, Cepero, & Evan, 2004). Apoptotik programı yöneten sinyal devresinin ayadınlattığı, kanser hücrelerinin tümöregenez sırasında veya antikanser tedavisinin bir sonucu olarak yaşadığı çeşitli fiziyolojik streslere yanıt olarak apoptozun nasıl tetiklediği ortaya çıkmıştır. Apoptoza neden olan stres tipleri arasındaİ; yüksek onkogen sinyalizasyon seviyelerinden kaynaklanan dengesizlikler ve hiper proliferasyonla ilişkili DNA hasarına işaret etmektedir. Basitce ifade edilmesi gerekirse sağlıklı hücreler stres koşulları altında p53

proteini ile ilişkili olarak çeşitli programlanmış hücre ölüm yolaklarını aktive ederler. Bu yolaklar apoptoz, nekroz ve otofaji olarak bilinmektedir (Adams & Cory, 2007; Lowe et al., 2004)

Hücresel ölümsüzlüğün etkileştirilmesi : Normal koşullarda hücrelerin zamanla DNA'sı kısalır ve hücre yaşlanır. Bu durumu takiben programlanmış bir hücre ölümü olan apoptoz ile hücre ölümü gerçekleşir. Bu kısalma telomerlerde meydana gelir ve telomeraz enzimin araclığıyla korunur (Blasco, 2005). Fakat kanser hücrelerinde durum bundan farklı olarak gerçekleşir. Kanser hücrelerinde telomerazların (koruyucu enzimleri) üretilmesini indükleyerek telomerlerin uzunluğunu korumaktadır. Bu sebeple kanser hücreleri telomerlerini koruyabilir ve sınırsız bölünme özleliği gösterirler (Artandi & DePinho, 2000, 2010; Shay & Wright, 2000).

Anjiogenez(yeni damar oluşumunun tetiklenmesi): Hücre fonksiyonlarında ve hücre sağkalımı için damarlar tarafından sağlayan oksijen ve besiyeri çok önemlidir. Bu sebeple organogenez sırasında yeni damarların oluşmasi gerekmektedir. Bahsedildiği üzere; anjiyogenez, normal dokularda geçici olarak, fiziyolojik ihtiyaca göre aktive edilir (Bouck, Stellmach, & Hsu, 1996; Hanahan & Folkman, 1996). Kanser hücreleri farklı faktorler kullanarak anjiyogenezi surekli olarak aktive ederler. Bu sayede kanser hücrelerinin beslenmesi ve hareket edebilmesi için bir taşıma sistemi görevi görür. Bu durumun sağlanması amacı ile VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü), FGF (fibroblast büyüme faktörü) ve TSP-1(trombospondin-1) gibi pro-anjiyogenik büyüme faktörleri aktif olarak kullanılmaktadır. Bu faktörlerin ortlama bırakılması sebebi ile anjiyogenez sürekli olarak aktive olur (Carmeliet, 2005; Kazerounian, Yee, & Lawler, 2008; Veikkola & Alitalo, 1999). Ek olarak, anjiyogenez mekanizması bağışıklık sistemin hücrelerinin tümör dokusuna nüfuz etmesini kolaylaştırır (Murdoch, Muthana, Coffelt, & Lewis, 2008; Zumsteg & Christofori, 2009).

İnvaszyon ve metastaz aktivasyonu: Hücre bağlantı proteinleri, hücreler ve hücre dışı matris arasındaki önemli çift yönlü etkileşimlere aracılık eder. Normal hücrelerde hücreler birbirlerine ve hücre dışı matrise yapışırlar. Hücre dışı kimiyasal ve fiziksel ortam ile hücresel iskeleti ve sinyalleme makineleri arasında etkileşimli bir arayüz sağlarlar (Geiger &

Yamada, 2011). E-kadherin, güçlü malignite baskılayıcı aktivitesi ile bilinmektedir. Kanser hücreleri E-kadherin/CDH1`i farklı mekakanizmalarla(kalıtsal ve somatik mutasyonlar, anormal protein işleme, arttırılmış promotör metilasyonu ve transkripsiyonal baskılıyıcıların indüksiyonu) inaktive eder. Tümör ilerlemesinin bir özelliği olan "mezankimal" kadherinlerin indüklemesiyle de ilişkili olan epiteliyal mezenkimal geçişi indükleyebilirler (Berx & van Roy, 2009; J. Yang & Weinberg, 2008). Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden kaçmasını, dolaşımda hayatta kalmasını, uzak bölgelerde sekonder tümörler oluşturmasını ve büyümesini gerektiren çok aşamalı bir süreçtir. Süreçlerin her biri tümör mikroçevresi tarafından negatif yönde etkilenebilir. Bu hücrelerin çoğü kemik iliğinden, özellikle miyeloid soyundan türetilir ve hayatta kalmalarını, büyümelerini, invazyonlarını ve metastazlarını arttırmak için kanser hücreleri tarafından çağırılmaktadır. Tümörün çevresinde olan proteolitik enzimler, tümör mikroçevresine ait hücreler, büyüme faktörleri ve immün hücreleri aktive ederek invazyon ve metastaza yardımcı olmaktadırlar (Joyce & Pollard, 2009; S. Y. Yang, Miah, Pabari, & Winslet, 2011).

İmmün sistemden kaçma : Normal koşullar altında hücreler sürekli olarak immün sistemle taranır ve taranan hücrede bir anormallık tespit edilirse hücrenin öldürülmesi sağlanır (Gajewski, Schreiber, & Fu, 2013). klinik olarak teşhis edilen kanserlerde görüldüğü üzere kanser hücreleri anti-tümör yanıtlardan kaçınmaktadır. Kanser hücrelerin büyümesi ve hayata devam etmesi için immün baskılıyıcı faktörler üretmekte veya tümör dokusuna immün baskılıyıcı enflmatuar hücreleri toplayarak immün sistemden kaçabilmektedir (Mougiakakos, Choudhury, Lladser, Kiessling, & Johansson, 2010).

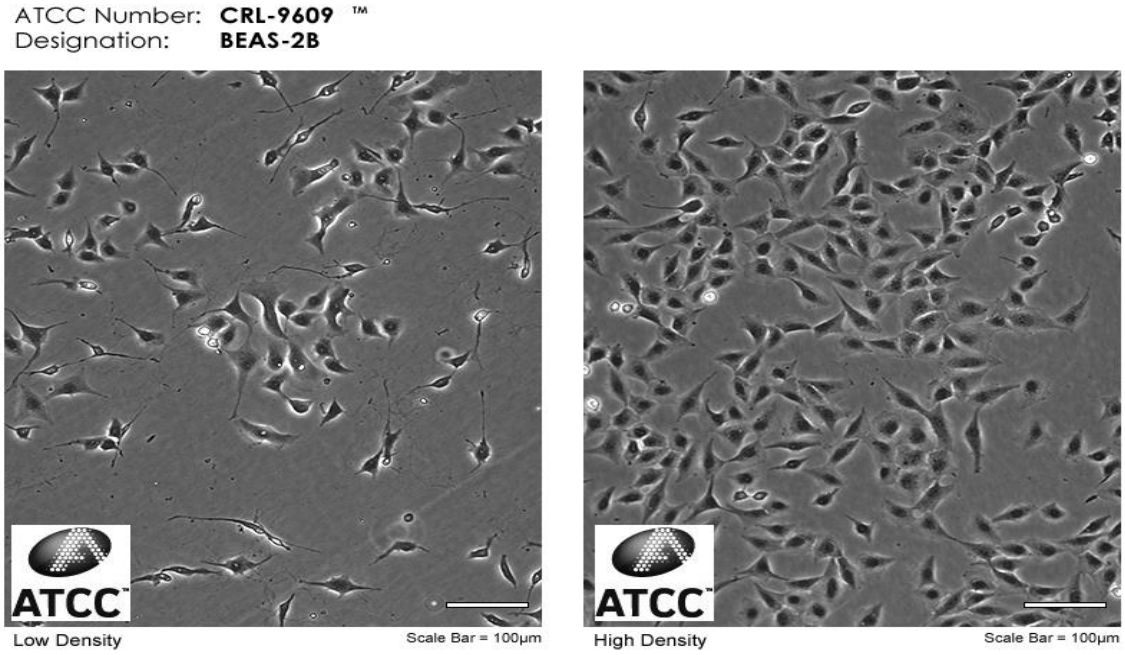
Tümör destekleyici enflamasyon : Enflamatuar tepkilerin başlatılması; çoğalma, hücre döngüsü, invazyon ve metastaz dahil tümör gelişiminin farklı aşamalarında belirliyici olarak rol almaktadır. Enflamasyon bağışıklık gözetim ve tedaviye yanıtları da etkilemektedir. Tümör dokusuna immün hücrelerinin toplanması ve enflamasyon varlığı, hücrelerin hayatta kalma, büyüme, ve pro-anjiyojenik faktörlerin yanısıra mutajenik oksijen türlerinin de açığa çıkmasını sağlamaktadır (DeNardo, Andreu, & Coussens, 2010; Grivennikov, Greten, & Karin, 2010; Qian & Pollard, 2010).

Genomik instabilite ve mutasyon: Genomik kararsızlık çoğu kanser tipinde görülen bir özelliktir. Genomik kararsızlık, kalıtsal kanserlerde DNA onarım genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır ve kanser gelişimine sebep olabilir(Negrini, Gorgoulis, & Halazonetis, 2010). Genetik ve epigenetik değişiklikler genelikle normal hücreleri, malign hücrelere dönüşümünü sağlar. Tümör baskılıyıcılar (p53) genomik olarak hasarlı hücrelerin mümkün ise sağkalımını değil ise programlanmış hücre ölümünü sağlamak ile görevlidir. DNAyı koruyan genlerde (p53), mutasyonlar oluşması durumunda kanserojen mutasyonların da arttığı tespit edilmiştir (Artandi & DePinho, 2000; Haupt, Raghu, & Haupt, 2016).

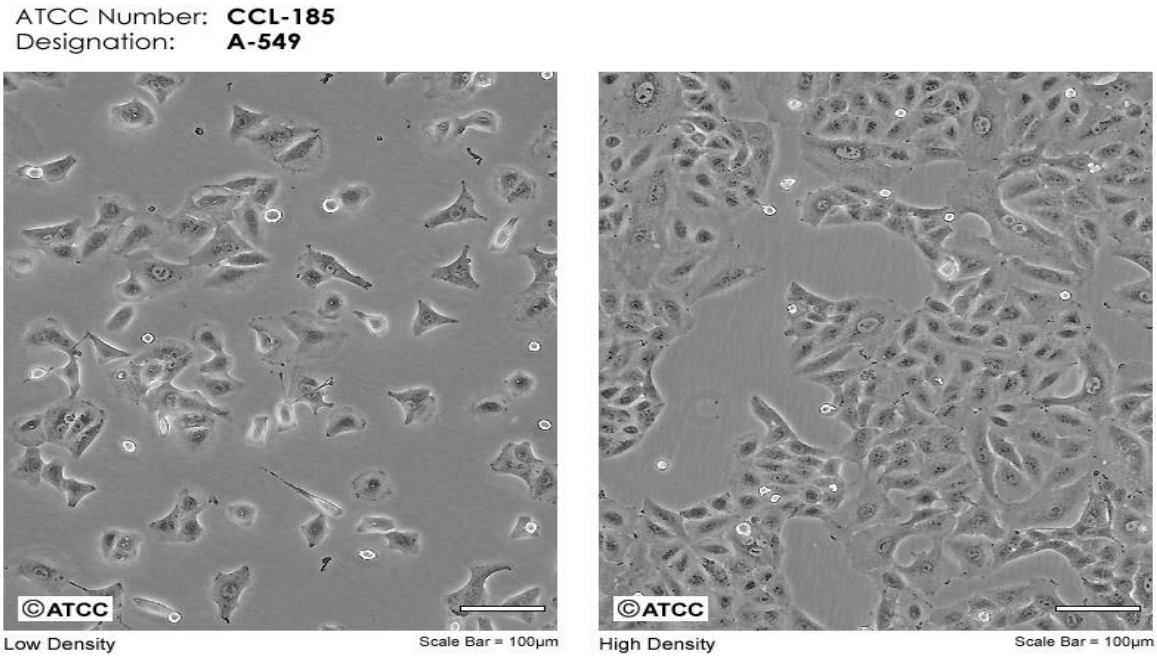
Enerji metabolizmasını yeniden düzenleme: Normal hücreler hücresel süreçler için gerekli enerjiyi üretmek için öncelikle mitokondriyal oksidatif fosforilasyona dayanan ATP üretim mekanizmasını kullanır. Farklı tipteki kanser hücreleri ise bunun yerine "Warburg etkisi" olarak adlandırılan bir fenomen olan aerobik gelikolize güvenir. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sistemi, enerji üretiminde serbest radikalların oluşumunda ve apoptozda önemli bir rol oynar. Hücresel enerji eksikliğinde çok fazla radikal üretimi ve düzensiz apoptoz, tek başına ve ya nörodejeneratif hastalıkları, felç, iskemi/repefüzyon ve kanser dahil olmak üzere hastalıkların çoğunda görülür. Sağlıklı ve normal hücrelerin aerobik koşullarda iki aşamalı olan gelikoliz gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bununla beraber anaerobik koşullarda tek aşamalı gelikolize geçerler. Kanser hücreleri ise oksijen varlığında bile tek aşamalı glikoliz gerçekleştirirler (Feron, 2009; Hüttemann, Lee, Samavati, Yu, & Doan, 2007; Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009). Glikolizdeki ara ürünleri komşu ve yeni hücrelere yönlendirebilir ve laktik asit üreterek daha asidik bir ortam oluşturabilirler. Bu değişiklik onkogenlerin aktivasyonundan veya tümör inhibitörlerinin değiştirilmesinden kaynaklanabilir (DeBerardinis, Lum, Hatzivassiliou, & Thompson, 2008; Jones & Thompson, 2009).

1.2.Akciğer Kanseri

Akciger kanseri dünya çapında önde gelen ölüm nedenidir. İki formda bulunmaktadır; küçük hücreli olmayan (dışı) akciğer kanseri KHDAK (tüm akciğer kanserinin yaklaşık %85) ve küçük hücreli akciğer kanseridir (%15). Akciğer kanseri, gelenkesel olarak hücre tipine göre 3 ana gruba ayrılır : adenokarsinoma (%50), skuamöz hücreli karsinoma (yaklaşık %35) ve büyük hücreli karsinoma (sclc). Fakat erken teşhis ve standart tedavideki gelişmelere rağmen, KHAK (küçük hücreli akciğer kanseri) genelikle ilerli bir aşamada teşhis edilir (Herbst, Heymach, & Lippman, 2008) KHDAK, üç ana histolojik alt tipe ayırılmaktadır: adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli akciğer kanseri. Sigara kullanımının her tür akciğer kanserine sebep olabileceği düşünülmektedir. Daha çok küçük hücreli akciğrle bağlantısı olduğu düşünülmektedir. Bunların arasında en sık görulen tip ise adenokarsinomdır. Epidemiyolojik çalışmalara göre akciğer kanserinin riski aile öyküsü ile bağlıdır. Kalıtsal kanser sendromunda, akciğer kanserin risk ve duyarlığıda artmaktadır ki p53 (Hwang et al., 2003), RB retinoblastoma (Sanders, Jay, Draper, & Roberts, 1989) ve diğer genlerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı ortaya konmuştur (Bell et al., 2005).



Şekil 1. 2.Beas-2b Sağlıklı akciğer hücre hattın morfolojisi



Şekil 1. 3.Akciğer kanserin adenokarsinom hücre hattın morfolojisi

1.2.1.Akciğer Kanserinin Risk Faktörleri

Akciğer kanseri için risk, gelişme, tedavi ve immünolojik kontrol seçenekleri arasındaki ilişkinin ortaya konmasına rağmen sağkalım oranlarındaki beklenen artışa ulaşılamamıştır. Sigara ve tütün kullanımı akciğer kanserin gelişiminde hala birinci risk faktörü olarak bilinmektedir. Tütün dışı risk faktörleri çevresel ve mesleki maruz kalmayı, kronik akciğer hastalığı, akciğer enfeksiyonları ve yaşam tarzı faktörlerini içermektedir. Buna bağlı olarak akciğer hastalıklarının önlemesi için tütün kullanımından kaçınma ve bırakılmasının üzerine odaklanılmıştır. Önleme tedbirleri içerisinde, fiziksel aktivite ve sağlıklı diyet uygulamaları ile sağlıklı yaşam tarzının sürdürebilmesi bulunmaktadır (Bade & Dela Cruz, 2020).

Hava kirliliği önemli başka bir kanser risk faktördür. Epidemiyolojik çalışmalara göre hava kirliliği özellikle partikül madde (PM) maruziyetinin sigara içmekten bağımsız olarak artan akciğer kanseri ve mortalite ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Epigenom, çevre ve genom arasında bir arayüz görevi yapmaktadır. PM, epigenetik değişiklere neden olan çevresel bir

faktördür. Bazı epigenetik değişiklikler, hastalık duyarlığını ve ilerlemesinin artmasına neden olur. Astım ve kardiyovasküler hastalıklarda partikül madde maruziyeti ile hastalığa özgü epigenetik değişiklikler arasındaki ilişki tespit edilmiştir. Genelikle akciğer kanserinde DNA metilasiyonu, histon modifikasyonu, ve mikroRNA ekspresiyonundaki epigenetik değişiklikler tespit edilmiş ve bu durum surekli olarak artan akciğer kanseri risk ve mortalitesi ile ilişkilidir (J. Li, Li, Bai, & Song, 2017).

1.2.2. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi

Akciğer kanserine karşı mücadelenin tütün ve sigara içmeyi önleme stratejileri, bu savaşı kazanmak için yeterli değildir. Klinik sonuçları iyileştirmek için daha karmaşık tedavilere ihtiyac duyulmaktadır. Son yirmi yılda çeşitli hedeflere yönelik tedavileri ortaya çıkmış ve bazı hasta populasyonlarında etkili bir şekilde uygulanmıştır. Bu tedavilere rağmen büyük zorluklar hala devam etmektedir. Bu nedenle sürücü genlerdeki yeni değişikliklerin tanımlanmasından yararlanarak hedefe yönelik tedavilerden, yeni ilaçlardan ve kombinasyon ilaçlarların kullanımı ile tedavideki zorlukların aşılması hedeflenmektedir. Akciğer kanseri moleküler olarak heterojen bir hastalıktır ve etkili tedavilerin geliştirilmesi için bu durum göz önüne alınmaktadır (Herbst, Morgensztern, & Boshoff, 2018).

RAS: RAS bir proto-onkojen dir. Ras ailesi (k-RAS, H-RAS, N-RAS) plazma membran proteinlerini kodlar ve nokta mutasyonlarla farkı kanser tiplerinin gelişmesinde rol alır. RAS mutasyonları daima hücre bölünmesi için devamlı uyarılara yol açar. K-RAS, akciğer kanserinde çok sık aktive edilen gen dir ve çoğu zaman kodon 12 ve kodon 31, ve kodon 61'deki mutasyonlar ile karakterize olmaktadır (Richardson & Johnson, 1993). K-RAS mutasyonları, tütün kullanımı ile bağlantılıdır (Slebos et al., 1991). Mutasyonların çoğu sigara dumanındakı polisiklik hidrokarbonlar ve nitrosaminlerin neden olduğu DNA hasarında görülen G-T transversiyonlarından oluşur (Greenblatt, Bennett, Hollstein, & Harris, 1994). K-RAS mutasyonlarının bulunması erken yada ileri evre KHDAK`inde kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Graziano et al., 1999).

MYC: myc proteini çekirdekte bulunan ve hücre büyümesi ile ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. Myc ailesinin üyeleri MYC, MYCN, MYCL

olarak bilinmektedir. Myc hem KHDAK hem de KHAK'de en sık görülen aktif genlerdir. Ailenin diğer üyeleri sadece KHAK'da aktive oldukları bilinmektedir. Aktiviteleri gen amplifikasyonu yada transkripsiyonal disregülasyonla gerçekleşmektedir. Her iki durum da proteinin aşırı anlatımı ile sonuçlanır. KHAK'lerinin %18 ile %31'inin myc ailesinden birinin amplifikasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir (Richardson & Johnson, 1993). Oysa KHDAK'lerinin sadece %8 ile %20'si myc amplifikasyonuna sahiptir. Myc amplifikasyonu daha çok kemoterapi görmekte olan KHAK alt grubunda görülmekte ve sağkalımla zıt bir korelasyona sahiptir (B. E. Johnson et al., 1996) . Tümör anjiyogenezi farklı bir uyarıcı ve baskılayıcılar ailesi tarafından yönetilir. Bunlar epiteliyal hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu düzenlemektedirler. VEGF ve FGF en önemli anjiyogenez indükleyicilerdir (Fontanini et al., 1997). VEGF ekspresyonu lenf nodu tutulumu olan akciğer kanserinde lenf nodu tutulumu olmayanlardan daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir (Ohta et al., 1997). KHDAK'de kötü bir prognozu gösterdiği bilinmektedir (Fontanini et al., 1997). Skuamöz hücreli karsinomalarda VEGF reseptörü olan Flt-1 sıklıkla eksprese edilir ve bu durum VEGF'in otokrin bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Volm, Koomägi, & Mattern, 1997). FGF KHDAK'lerinin yaklaşık %70'inde eksprese edilmesine rağmen prognostik önemi halen tartışılmaktadır (Volm, Koomägi, Mattern, & Stammler, 1997). İnterleukin 8 (IL-8), epiteliyal neutrophil attractant 78 (ENA78) gibi anjiojenik kemokinler ve gamma interferon-inducible protein 10 (IP-10) gibi anjiostatik kemokinler de akciğer kanseriyle ilişkili olduğu bilinmektedir. IL-8, KHAK için bir anjiojenik faktör olabilir. IL-8'in pasif immünizasyonla baskılanması KHDAK'inde tümörogenezi zayıflatır (Arenberg et al., 1996).

G-ışını yada karsinojenlerle oluşturulmuş DNA hasarına yanıtta "yönetici" olan TP53 genin kodlandığı protein bir transkripsiyon faktörü olarak görev alır. p53'ün kendisini c-terminal ucuyl, primer DNA hasarının yerini tespit edebildiği ve bağlanabildiği belirlenmiştir. DNA hasarı p53 aktivasyonunda önemli bir koşuldur. p53 protein ekspresyonunda hızlı artışa sebep olur. p53 aktivasyonunda bir dizi genin ekspresyonunu düzenleyen spesifik bir transkripsiyon faktörü olarak etki eder. Bu dizi genler P21, MDM2, GAAD45 ve BAX'tan oluşmaktadır. G1/S hücre siklus geçişini, G2/M DNA bozukluğu noktasını ve apoptozisi düzenlemede büyük önem arz eden bu proteinler p53geninde fonksiyon bozukluğu yaratacak bir mutasyon olması durumunda olarak hasarlı hücrelerinin uygunsuz yaşamasına, pek çok

mutasyonun toplanmasına ve kanser hücresinin gelişimine sebep olur. p53 kaciğer kanserinde çok önemli bir rol oynar. Kromozomun 17p13 lokusu sıklıkla delesyona uğrar. Geride kalan ailenin mutasyonal inaktivasyonu KHAK‘inin %75’inden fazla ve KHDAK’inin yaklaşık %50’sinden oluşur (Greenblatt et al., 1994).

P16-cyclin D1-CDK4-RB proteinlerinden oluşan yolak hücre siklusunun G1-S geçini kontrol eden santraldir. Bu yolağın komponentleri birçok kanserde fonksiyonel olarak değişmiş ya da mutasyona uğramıştır. RB’nın en önemli büyümeyi baskılayan fonksiyonu G1-S progresyonunu durdurmaktadır. Kromozom 13q14’de yerleşik RB alellerinin inaktive oluşu akciğer kanserinde yaygındır. KHAK’inin %90’ında, KHDAK’inin %15-30’unda RB protein anomalileri tespit edilir . KHDAK hücre dizilerinde RB’nin eksprese edilmemesinin kötü prognozu gösterip göstermediği halen tartışmalıdır (Dosaka-Akita et al., 1997; Geradts, Fong, Zimmerman, Maynard, & Minna, 1999). In vitro olarak doğal tip RB’nın tümör hücrelerine geri kazandırılması fonksiyonel olarak KHAK’in gelişiminin baskılar (Ookawa et al., 1993).

Cyclin D1 ve CDK4: KHDAK hücre dizilerinde RB mutasyonlarının daha az sıklıkla görülmesi RB’a bağlı hücre siklusu kontrol yolunun başka mekanizmalarla inaktive edilebildiği düşündürmektedir. Cyclin D1’in akciğer kanserinde bulunan bu yolun ikinci bir komponenti olduğu gösterilmiştir. Cyclin D1 KHDAK hücrelerinin %27-47’sinde aşırı anlatıma sahiptir ve bazi olgularda kötü prognozu göstermektedir (Mishina et al., 1999). Cyclin D1, RB’un CDK4’le fosforilasyonunu uyararak RB aktivitesini baskılar. Cyclin D1’in aşırı ekspresyonunun KHDAK hücrelerinin büyümesini kontrol eden RB’un yıkılmasında alternatif bir yol olduğu düşünülmektedir. Akciğer kanseri hücrelerinde cyclin D1 yapımının baskılanması RB dengesinin bozulmasına ve büyümenin gerilmesine neden olmaktadır (Driscoll et al., 1997).

TGF-B: sinyal oluşturan moleküllerin TGF-B ailesi pek çok hücre tipinin proliferasyonunu düzenler. TGF-B, serine/threonine kinase aktivitesiyle membran reseptörlere bağlanır. Fibroblast hücreler için de büyüme faktörü olmasına rağmen TGF-B1 çoğu epitel ve hematopoetik hücre için güçlü bir proliferasyon baskılıyıcıdır. Tümörojenik hücre dizilerinin TGF-B1’in negatif büyüme etkisine oluşturulan yanıtın kısıtlandığını gösterilmiştir. TGF-B1

gelişmekte olan akciğerin epitel hücre proliferasyonunu baskılamaktadır. TGF-B1, embriyonik gelişme sırasında epitel hücrelerden eksprese edildiği bilinen N-myc ekspresyonunu da baskılamaktadır. Ayrıca p53 düzeyinin insan bronş epitel hücresindeki TGF-B tarafından gelişimin baskılanmasıyla azalttığı gösterilmiştir .

1.2.3. Akciğer kanseri tedavisi

Akciğer kanseri oldukça invaziv ve hızlı metastaz yapan yaygın bir kanser tipidir. Hem kadınlarda ve hem de erkeklerde en çok rastlanılan kanser tipi olarak bilinmektedir. İnsidans ve mortalite oranları 20 yıl veya daha fazla tütün kullanımı ile ilişkilidir (Lemjabbar-Alaoui, Hassan, Yang, & Buchanan, 2015).

Radyoterapi: KHDAK kür elde etmek amacıyla tek başına küratif, semptomların giderilmesi amacıyla palyatif, başka bölgelerde hastalığın çıkmasının önlenmesi amacıyla profilaktik, operabilite arasında tümör küçülterek daha kolayca çıkartmak amacıyla preoperatif (neoadjuvant) olarak kullanılmaktadır. Mikroskopik hastalığın kontrolü için postoperatif (adjuvan) olarak uygulanır. Preoperatif RT teorik olarak büyük tümörlerin rezektabilite oranının arttırabilir. Rezeksiyon sınırlarının negatif olmasını sağlayabilir ve cerrahi sırasında oluşabilen olası tümör yayılımını önleyebilir. Cerrahi işlemler sırasında oluşabilen hipoksiye bağlı gelişebilecek radyorezistan tümör hücrelerinin oluşmamasına bağlı olarak daha düşük RT dozları ile etkili olabilir. Cerrahi evreleme yapılmadan tedaviye başlanmasını nedeniyle bazı olgularla gereksiz RT uygulanmış olması, ayrıca tümörün anatomik tam yayılımının bilinmeden tedaviye başlanması, ve postoperatif komplikasyon riskini yüksek olması preoperatif RT'nin dezavantajları olarak kabul edilmektedir. Preoperatif RT ile ilgili ilk çalışmalar 1955 yılında Bromley ve Szur tarafından bildirilmiştir (Bromley & Szur, 1955). Palyetif tedavinin amacı ileri malignitesi olan hastalarda yaşam kalitesinin yükseltilmesi ve semptomların en aza indirilmesidir. Akciğer kanserlerinin ileri dönemlerinde hayat kalitesini etkileyen lokal ileri hastalıkla ilgili hemoptizi, dispne ve obstrüktif pnömoni yanısıra metastazlar da palyasyon gerektirmektedir (Shinde & Dashti, 2016) .

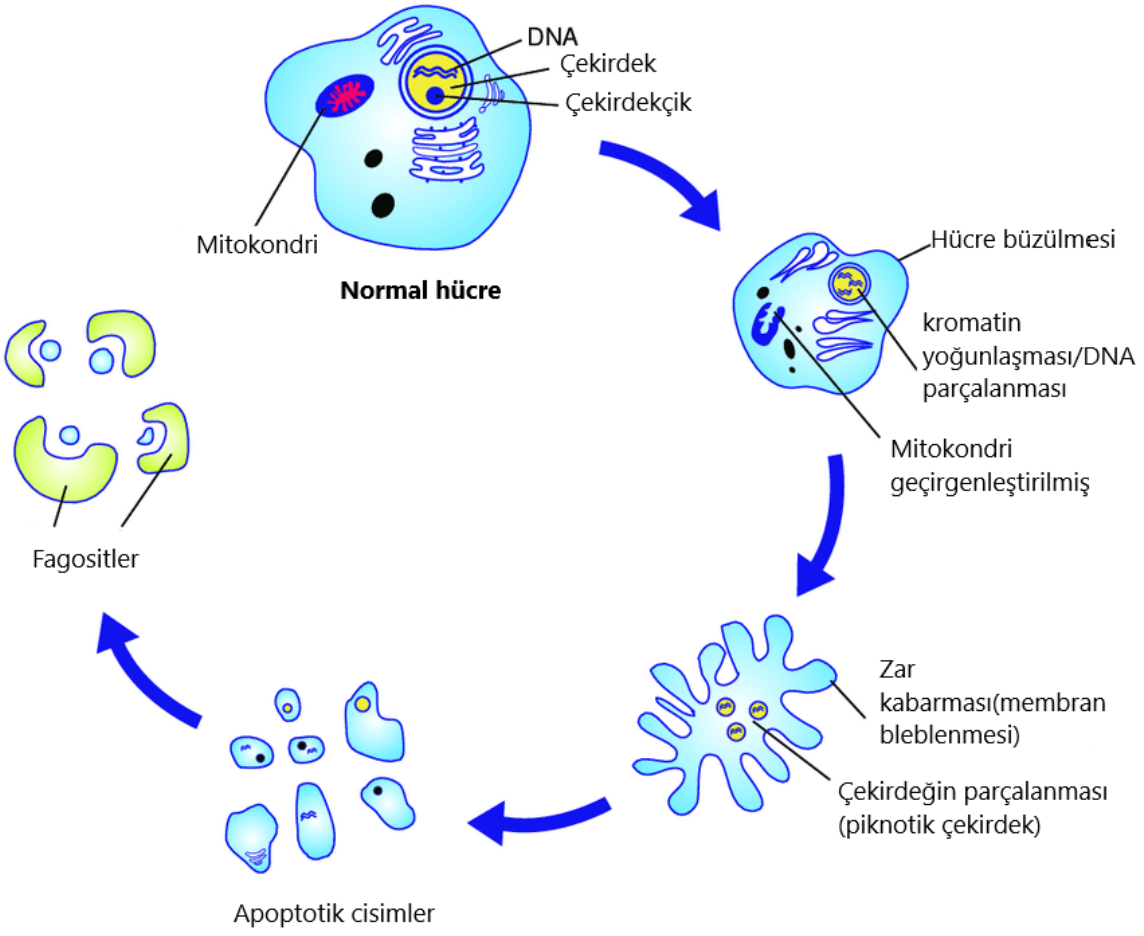
Kemoradyoterapi: Radyoterapi (RT), evre III operasyon yapılamayan KHDAK ile hastalar için uzun yıllar standart bir tedavi rejimi olarak kabul edilmiştir. Yanlızca RT ile meydan

sağkalım süresi 8-10 ay, 2 yıllık sağkalım %10-20, 5 yıllık sağkalım ise %3-8 gibi düşük oranlardır. Buna bağlı olarak yaygın hastalıkta elde edilebilen düşük sağkalım oranları araştırmacıları yeni tedavi modelleri uygulamaya yöneltmektedir (Le Chevalier et al., 1991; Mattson et al., 1988; Vyas et al., 1998). Kemoterapi ağız yoluyla verilen yada damar içine enjekte edilen anti-kanser ilaçlardan oluşmaktadır. Damar yolundan verilen anit-kanser kimyasal damar sisteminde bütün vücuda etki edebilmekte ve metastaz yapan kanserlerede tedavi alternatifi sunmaktadır. Son yıllara kadar ileri evre KHDAK'lerde etkili olduğu gösterilen birkaç kemoterapi ajanı mevcuttur. Birinci kuşak olan bu kemoterapi ajanları: Cisplatin, ifosfamide, vinblastine, vindesine, mitomycin ve kısmen etoposide'dir (D. H. Johnson et al., 1991). Cisplatin en yaygın kulanılan ajanlardan biridir. Tek ajan olarak KHDAK'inde yanıt oranı %21'dir. KHDAK'li hastalarda Cisplatinin yoğun doz uygulamaları tartışmalıdır. Bir meta-analizde, destek tedavi ile karşılaştırıldığında sağkalım gösterilmesine sebep olan tek ilaç cisplatin olarak belirlenmiştir (Group, 1995). Cerrahi tedavi, KHDAK'de pulmoner metastazların uzak metastazlara oranla cerrahi rezeksiyon sonrasında daha iyi bir prognoza sahip olduğu bilinmektedir (Kunitoh et al., 1992).

1.3.Apoptoz

Vücudumuzda her gün 10-100 milyar hücre üretilmekte ve aynı zamanda vücudumüzun hemeostazısını korumak için aynı miktarda hücre ise apoptoza uğramaktadır. Bakteri veya virüsle enfekte olan hücrelerde ölmektedir. Fizyolojik koşullar altında meydana gelen ölüm bu durumdan çok farklıdır. Sessiz, inflamatuardan bağımsız, ve bağışıklık sistemini harekete geçirmeyen ölüm tipi "apoptoz" olarak adlandırılır. Bunun karşısında patojen enfeksiyonu, bağışıklık sistemini harekete geçiren ve iltihablanmaya neden olan ölümler "nekroz ve piroptoz" adında farklı ölüm türlerdir (Nagata, 2018). Apoptoz enerjiye bağlı, fiziyolojik bir olaydır. Normal şekilde çok hücreli organizmalarda, hücre bölünmesiyle artan hücre sinyalı, hücre ölümleriyle oluşan denge ile kontrol edilmektedir. Eğer bir organizmada bir hücreye ihtiyac duyulmadıysa, hücre içi haberci sistemleri aktive edilir ve o hücrede programlanmış hücre ölümü sinyali başlatılır. Bu sureç programlanmış hücre ölümü yada yunanca yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz olarak adlandırılır (Cummings & Winterford, 1997; Güleş & Ülker, 2008; Mak, 2003). Hücre ölümleri fiziyolojik şartlar altında oluştüğü için bu ölüm

şekli fiziyolojik hücre ölüm (physiyology cell death) olarak da adlandırılır (Bellamy, Malcolmson, Harrison, & Wyllie, 1995; Cohen, 1993; Schwartzman & Cidlowski, 1993). Her canlının başarlı organ gelişimini sağlayabilmesi embriyonik gelişme sırasında programlanmış hücre ölümünün doğru kullanımına bağlıdır (Güleş & Ülker, 2008; Majno & Joris, 1995). Apoptoz, hücre populasyonu korur ve yaşlanma mekanizmasıyla kontrol edilir (Elmore, 2007; Thompson, 1995). Tüm organizmaların hücrelerinde ve bazı dokularında apoptotik hücreler yeni üretilen hücreler ile değiştirilir. Boylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir (Elmore, 2007).



Şekil 1. 4.Apoptoz aşamaları (Guerin, McKernan, O'Brien, & Cotter, 2006).

Hücrelerde apoptoz için sinyal aldıktan sonra bir çok morfolojik ve kimiyasal değişim görünür. Hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlar. Eş zamanlı olarak hücre iskeleti dağılır ve nükleus zarı da yer yer erir ve sonuçta çekirdek DNA'sı parçalara ayırılır (Cohen, 1993; Squier, Miller, Malkinson, & Cohen, 1994). Fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr organellerin korunduğunu fark edip ve bu olayı "büzüşme nekrozu" olarak adlandırılmıştır (Pompei et al., 2015). Apoptoza uğrayan bir hücrede aktin ve lamin filamentlerinin kesilmesi sonucunda sitoplazma çekilmeye ve küçülmeye başlar. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin

parçalanması sonucu kondenzasyon başlar ve çoğu zaman çekirdek kromatinin, çekirdek membranının iç yüzeyine yerleşmesi için at nalı şekilde görülür. Hücre büzülmeye ve küçülmeye devam edip ve makrofajlarının tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği şekilde membranla çevrili küçük parçalara ayırılır. Oluşan bazı parçaların içlerisinde paketlenmiş organeller, sitoplazma, ve bazı parçalarda çekirdek parçaları da görülmektedir. Oluşan bu parçalar apoptotik cisimler olarak ifade edilir (Güleş & Ülker, 2008; Mountz & Zhou, 2001; Trump, Berezesky, Chang, & Phelps, 1997). Çekirdekte hücre gibi büzüşür ve membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nüklear porlar kromatinin membrana uzak olduğu bölgelerde yoğunlaşırlar (Mountz & Zhou, 2001). Apoptoz esnasında apoptotik hücrelerin membranında değişimler olur. En önemli değişimlerden negatif yüklü fosfotidilserinin hücre membranının sitoplazma yüzeyinden hücre membranın dış yüzeyine çıkmasıdır. Bunun sonucunda kollektin (c1q) adında çeşitli proteinler apoptotik hücre zarına bağlanmaktadır. Boylece apoptoz esnasında hücre zarında gizlemiş olan N,N-diasetilsitabroz molekülleri açığa çıkar ve makrofajlar tarafından tanınırlar (Apoptoz, 2004). Hücre içi Mg ve Ca, endojen endonükleaz enzimine bağlanır ve onu aktive eder. Bu sayede kromozomal DNA'nın nokleozomal birimlere parçalar. Apoptotik hücrelerin DNA'sının ana morfolojisi merdiven şeklinde (ladder pattern) agaroz jel elektroforezinde görülmektedir. Apoptoz için tipik bir belirleme yöntemi sağlar (Bortner, Oldenburg, & Cidlowski, 1995; Carson & Ribeiro, 1993; Cohen, 1993). Apoptotik olan hücrelerde DNA fragmentasyonu esnasında DNA'nın nükleozom birimlerini ayrılmasını CAD (caspase activated Dnaz, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) proteini gerçekleştirir. CAD, Apoptotik olarak uyarılmamış hücrelerde I-CAD (inhibitor of caspase-activated deoxsyribonuclease-kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü-DNA fragmantasyon faktörü) bağli ve inaktif şekilde bulunmaktadır. Hücrede apoptoz sinyalinin iletilmesini takiben kesilmiş kaspaz 3 tarafından aktive edilir. Endonükleaz olduğu için çekirdekdeki DNA'yı hızlı bir şekilde 180-200 baz çiftlik nükleozomal fragmanlara ayrılmasına neden olur (Cohen, 1993; Güleş & Ülker, 2008; Sakahira, Enari, & Nagata, 1998). Erken apoptozda hücrelerin üzerinde gelişen cepcikler (blebs) görülmektedir. Aynı zamanda hücre sitoplazmasında vakuoller izlenmektedir. Bazı apoptotik hücrelerde, "blister" adında bir kaç tane büyük vakuol oluşur. Bu vakuoller boyutlarından ötürü sitoplazmadan dışarı taşar gibi görülürler (E Ulukaya, 2003). Hücrelerin morfolojisi apoptoz esnasında değişim gösterir. Organel bütünlüğü korunmakla birlikte hepsi

intakt bir membran içindedir. Apoptotik sürecinde veya apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılma olayında enflamatuar reaksiyon yoktur. Çünkü apoptotik hücreler çevre dokuya hücresel bileşenlerini salmazlar. Apoptotik hücrede sekonder nekrozun önlendiği bilinir. Apoptotik hücreler çevre hücreler tarafından hızla fagosite edilir, ve fagositoz yapan hücreler anti-enflamatuar sitokinler üretmez. Bu sayede sessiz ve normal bir şekilde apoptotik hücreler ortadan kaldırılır.

Normal hücrelerde proto-onkogen adında genler vardır. Hücre gelişmesi ve büyümesinde düzenleyici rol almaktadırlar. Proto-onkogenler mutasyona uğradıktan sonra onkogen adını alır (Pythoud, Rothenberger, Martínez-Sobrido, de la Torre, & Kunz, 2015). Onkogenler hücrelerin aşırı büyüme ve bölünmesine neden olurlar. Bu büyüme ve bölünmeyi aktive eden genleri baskılayan gene "tümör baskılıyıcı gen" adı verilir. Son araştırmalara göre bazı tümör baskılıyıcılar ve onkogenler programlı hücre ölümünü kontrol etmektedir. Apoptozu düzenleyen genler omurgalılarda p53, C-myc, Bcl-2 ve Bcl-xl genlerinden oluşmaktadır. Bu genlerin üretilen proteinleri de aynı genlerinin adlarını taşıdığı bilinmektedir (Annamalai et al., 2015; Pythoud et al., 2015).

P53: Apoptoz düzenleyici ve tümörü baskılayıcı p53 geni, hipoksi ve serbest radikal oluşumu ile DNA onarımını başlatır. DNA da bir hasar oluştuğunda, hücre döngüsünü S fazında durdurur ve DNA tamiri için zaman kazanır. Hasar tamir olmayacak kadar büyükse, p53 hücreyi apoptoza yönlendirir ve böylece hücre yok edilir(Pompei et al., 2015). Bax ekspresyonunu azaltarak, Bcl-2/ Bax oranını değiştirir. Apoptozun baskılanması bu şekilde gerçekleştirilir. Örneğin Epstein-barr ve insan papiloma virüsleri Bax'a bağlanarak apoptozisi bloke eder yada virüsün kendisi p53'ü inaktif eder. Virüsler enfekte ettikleri hücreleri apoptozdan kurtararak hücre çoğalmasına ve kanserogeneze destek olurlar (Goldar, Khaniani, Derakhshan, & Baradaran, 2015; Wang et al., 2015). Bir transkripsiyon düzenleyici faktör olan MDM-2 (murine double minute 2), p53'ün transkripsiyonunu inhibe eder yada p-53'e bağlanarak aktivitesini inhibe eder. DNA'nın hasar görmesi durumunda, p53'ün fosforilasyonu artar ve Mdm-2'den ayrılarak hasara cevap oluşturur (Dittz et al., 2015) .

C-myc: Transkripsiyon düzenliyici faktör olan C-myc proteini ortamda bazi faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin çoğalmasına yada apoptozise uğramasına sebep olur. C-myc proto-onkogeni bir hücrenin büyümesini programlar. Bir hücrede hem uygun büyüme faktörleri ve hem c-myc yoksa büyüme durur. Eğer ortamda her ikiside yeterli miktarda mevcut ise çoğalma gerçekleşir. Sadece c-myc var fakat büyüme faktörü yoksa apoptoz görülebilmektedir (Buzin et al., 2015).

Bcl-2 ve Bcl-x: Mitokondri apoptozu başlatan yolaklarının kesiştiği temel noktadır. Böylece apoptotik süreçte mitokondrideki membran potansiyelinin bozulması geri dönülmez noktayı göstermektedir. Mitokondrinin hasarına yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir (Annamalai et al., 2015). Bcl-2 ailesi pro-apoptotik (Bax, Bad gibi) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xl gibi) olmak üzere 2 ayrı işleve sahip proteinlerden oluşmaktadır (Papadopoulos, Yousef, & Scorilas, 2015). Anti-apoptotik grup, apoptozisi baskılamakta görev alır. Pro-apoptotik grup ise apoptozis indukleyici etkiye sahiptir. Hücrelerinin apoptotik yolağı tercih etme durumu pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 proteileri arasındakı dengeye bağlıdır. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin aşırı anlatımı apoptozisi baskılarken, pro-apoptotik üyelerin aşırı anlatımı apoptozise neden olmaktadır (J.-P. Li et al., 2015).

Kaspazlar kaskad şeklinde rol oynayan sistein proteaz ailesi proteinleridir. Sistein aspartat spesifik proteaz, apoptozisde çok önemli rolu olan bir protein ailesidir. Bu ailenin üyeleri aktif bölgelerinde sistein rezidülerine sahiptir. Aynı zamnda substrat proteinlerindeki kesim bölgesi genelikle aspartik asitten sonra gelen kısım olarak belirlenmiştir (Shoja, Reddy, Nayak, Srinivasan, & Rao, 2015). Kaspazlar sistein proteaz grubundadırlar ve hedef hücrede apoptoz sinyalinin devam ettirilmesi ile karakterize edilirler. ilk sentezlerinde inaktif pro-kaspaz veya zimojen olarak bulunurlar. Pro-kaspaz apoptozun indüklemesinden sonra kesilerek aktif kaspaz formuna dönüşürler. Tüm memelilerde ced-3, ced-4 ve ced-9 ile apoptoz mekanizmasında aynı işlevi gösterirler. Dizi homolojisi bulunan kaspaz proteinleri mevcuttur. Ced-4 geninin memelilerdeki homoloğu Apaf-1, kaspazlara bağlanarak kaskadı tetikler ve apoptozu gerçekleştirir. Ama bunun aksine ced-9 kaspaz aktivasyonunu inhibe eder. ced-9 pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri ile apoptozda düzenleyici bir rolu olduğu gösterilmiştir (Chiu et al., 2015).

Kaspazlar, kırktan fazla apoptozda rol oynayan proteazın aktifleşmesini sağlar. Kaspaz ailesinin bazi üyeleri üç gruba ayrılır:

1. Kaspaz (2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlardır.

2. kaspaz (3, 6, 7) efektör (hedef) kaspazlardır.

3. kaspaz (1, 4, 5) inflamatuar kaspazlardır.

Enflamatuar kaspazların görevi, mikrobiyal patojenlere karşı immün yantın gösterilmesini sağlamaktır ve piroptozla ilişkilidir.

Başlatıcı kaspazların rolu ise apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletmektir.

Efektör kaspazların rolu ise ilgili proteinlere proteaz aktivitesi göstermek ve apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesini sağlamaktır. Bu sayede başlatıcı ve efektör kaspazlar da apoptozisle ilişkilidir (Jeon et al., 2015).

Apoptoz iki yolla uyarılabilir:

Fiziyolojik ve patolojik apoptoziste 5 farklı yolak kulanmaktadır. Bu yolakların en yaygını, metabolik stres ile tetiklenen iç(intrinsik) ve dış uyarıyla (FAS-L , TNF-α ya tömür nekroz faktör-α) tetiklenen dış (ekstrinsik) yolakdır.

- Mitokondriden sitokrom c salınır. Sitokrom c salınması kaspaz kaskadını aktifleştirir ve içsel yolak başlatılır (Mitokondriyel).
- Hücre dışından gelen sinyaller, fas ölüm reseptörünü aktifleştirir ve dışsal yolak sinyali başlatılır.

Sinyal kaskadıyla farklı ara moleküllerin aktivasyonundan sonra her iki yolak da sonunda aktivasyon basamağına ulaşır ve genelikle farklı proteinlerin kesimine neden olur (Ghobrial, Witzig, & Adjei, 2005).

İçsel yolak Bcl-2 protein ailesi üyeleri tarafından düzenlenir ve gelişimsel olarak kontrol edilen ve genotoksik ajan aracılı apoptoz ile ilişkilidir. Bcl-2 ailesi üç alt aile içerir:

- Sadece BH3 domini içeren pro-apoptotik (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf ve Bad)
- Pro-apoptotik efektör moleküller (Bax ve Bak)
- Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteini (Bcl-2, Bcl-xl, Mc-l, A1 ve Bcl-B)

Normal ve sağlıklı hücrelerde Bak ve Bax anti-apoptotik Bcl-2 ailesi tarafından tutularak apoptozun başlatılmasını engeller. Bir hücre apoptotik sinyali aldıktan sonra yanıt olarak yanlızca BH3 domaini içeren üyelerin transkripsiyonal veya transkripsiyonal sonrası olarak düzenlenmesi sağlanır. Bu proteinler aktifleşerek Bak ve Bax'ı etkiler veya anti-apototik Bcl-2 ailesi üyelerine antagonistik olarak etki eder. Bak ve Bax homodimer ve heterodimer oluşturur. Bu sayede mitokondri membranında bir por oluşmasına neden olur. Böylece oluşan pordan sitokrom c salınır. Sitokrom c ve Apaf-1 ile birlikte dATP/ATP'ye bağımlı bir şekilde, heptametrik bir komleksi oluşturur. Bu komlekse apaptozom olarak adlandırılır. Apoptozom, monomerik pro-kaspaz 9'u dimerleşmesine neden olur. Sonunda otokatalitik bölünme gerçekleşir ve kaspaz 9 aktifleşir. Aktifleşen kaspaz 9 da, pro-kaspaz 3'ü keserek aktifleştirir (Kiraz, Adan, Yandim, & Baran, 2016; Nagata, 2018; E. Ulukaya, Acilan, & Yilmaz, 2011). Apoptozun gerçekleşmesi için kaspaz 3, 1300 den fazla hücresel substratı keser. Örneğin: apoptotik DNA fragmentasyonu için kaspazla aktive olan Dnaz inhibitörü (ICAD) kesildikten sonra, kaspazla aktive olan DNaz (CAD) serbest bırakılır (Nagata, 2005). Fosfotidil serin (PS)'in, dış membran yüzeyine çıkması için ATP11A/11C ve XKR8 kesilmektedir (Nagata, 2018). ROCK1 de apoptotik membranın bleblenmesi için kesilir (Sebbagh et al., 2001).

Ekstrinsik apoptozis:

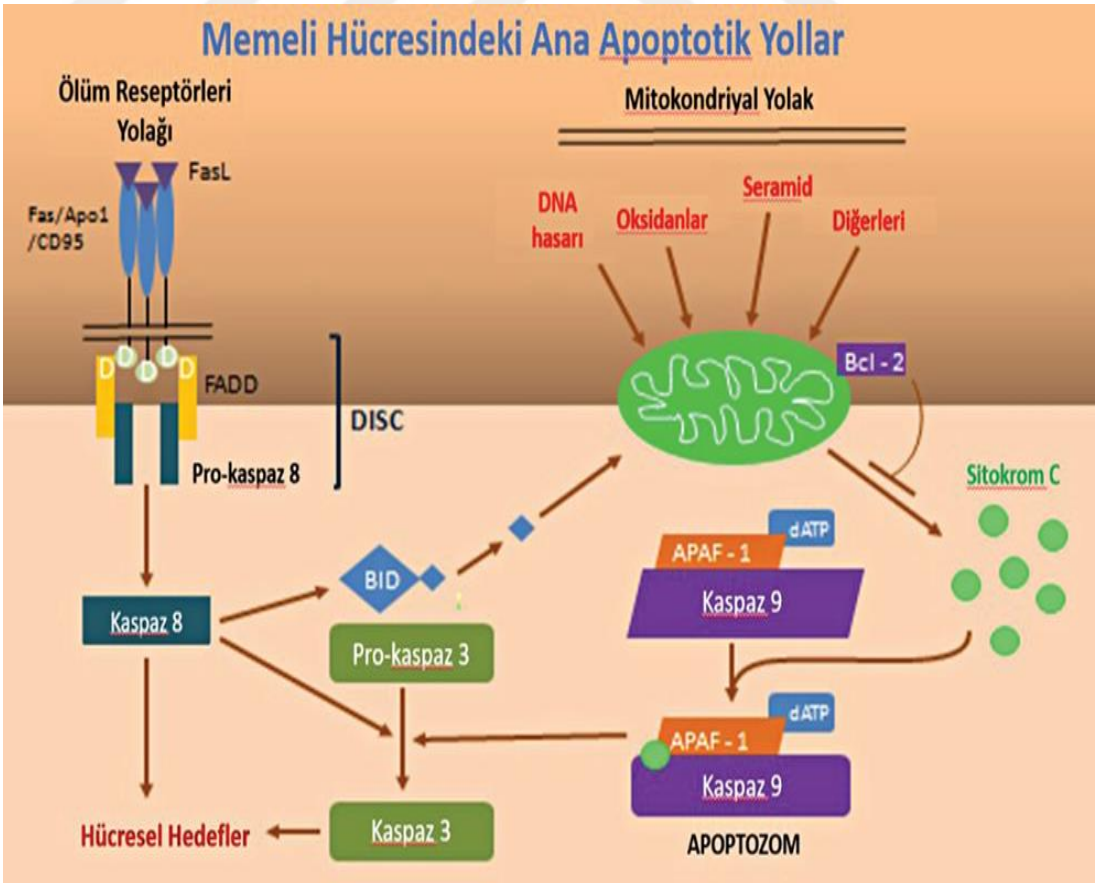
Ölüm reseptör yolu (ekstrinsik yol), aktiflenmiş T hücreler ve NK hücreler makrofajların hedef hücrelerinin membranındaki ölüm reseptörlerine bağlanması ile

başlatılır. FAS ve TNF (tümör nekroz faktörü) reseptörü integral proteinlerdir. Komplementer ölüm aktivatörleri olan FASL ve TNFα (tümör nekroz faktör alfanın) bağlanması ile pro-kaspaz 8, kaspaz 8'e dönüşmektedir ve böylece kaspaz kaskadının aktivasyonun başlatılmasına neden olur (Choo, Loh, & Chen, 2019). Ölüm reseptörleri; CD95 (Fas/Apo-1), TNFR1, DR3 (Apo3), DR4 (TNF-Related Apoptozis- inducing Ligand Reseptor 1), DR5 (TRAILR2) ve DR6'dır. Hücre ölüm sinyalleri hedef hücre zarı üzerindeki TNF ailesinden oluşan ölüm reseptörlerine bağlanarak etkili olur. TNF ailesi molekülü olan TRAIL (TNF-Related Apoptozis-Inducing Ligand)'ın hem hücre membranına bağlı hem de çözünebilir formunu birçok kanser türünde ve otoimmün hastalıklarda ölüm reseptörleri araclığı ile apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Çözülebilir TRAIL (sTRAIL) apotozisin göstergesi olarak da kullanmaktadır (Choo et al., 2019). Ölüm ligandlarından, FAS L, TNF ile ilişkili apoptozu indukleyen ligand(TRAIL), Apo-3/Apo-2 ligandı ve TNF-α sayılabilir. Bu sinyal yolunda en iyi bilinen reseptör-ligand çiftleri FASL/FASR ve TNF-α/TNFR1'dir. FAS ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) molekülleri adaptör proteini olarak görev almakta ve ölüm reseptörlerine bağlanmaktadır. Ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) oluşturmak için, pro-kaspaz 10 ve 8 adaptör proteinlere bağlanır. Kaspaz 10 ve 8 bu komleks yapı tarafından aktive edilir. Aktive olan kaspaz 10 ve 8, yürütücü (efector) kaspaz olan kaspaz 3, 6 ve 7'yi aktive eder. Kaspaz 3,6 ve 7 aktive edildiğinde, hücre ölümüne yol açan proteinlerin ve hücre iskeletinin imhası başlar. Kaspaz 10'dan farklı olan kaspaz-8, Bid'i keserek mitokondri ile interaksiyonun sağlanmasına görev alır. Buna bağlı olarak mitokondri membran potansiyelinin bozulmasını takiben sitokrom C salınmasına neden olur ve intrinsik yolu aktive eder (Choo et al., 2019).

Hücre ölümü adlandırma komitesi tarafından yeni güncelleme yapılmış ve bir çok yeni ölüm türü hücre ölüm türlerine dahil edilmiştir. Bunlar; ekstrinsik apoptoz, intrinsik apoptoz, mitokondriyal geçirgenliğe bağlı nekroz, nekrozis, piroptozis, feroptozis, parthanatos, entotik hücre ölümü, lizozoma bağlı bir hücre ölümü, netotik hücre ölümü, immonojenik hücre ölümü, otofaji bağımlı hücre ölümü, hücresel senesens ve mitotik katastrofidir (Galluzzi et al., 2018). Nekroz ve apoptozisde çok

fark görülebilir. Nekroz nedenlerine örnek olarak litik viral enfeksiyonlar, hipoksi, iskemi, toksik maddelerin yüksek konsantrasyonu, şiddetli oksidatif stres ve hiperterimini sayabilir. Apoptozis nedenlerinde ise hücre yaşlanması, antineoplastik ilaçlar, yüksek glukokortiko düzeyi, ölüm reseptörü ailesine ait bir memebran proteini olan fas ve tömür nekroz faktör reseptörü -1 (TNFR-1) reseptör aktivasyonu, tümör hücreleri, büyüme hormon eksikliği, insan bağşıklık eksikliği virüs (human immunodefency virus -HIV) ve radyasyon örnek verilebilir (D'Arcy, 2019). Memeli hücresinde apoptozis yolakları. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolaklar.

(Şekil 1.5) BID: BH3 etkileşim alan ölüm agonisti (BH3 interacting-domain death agonist); APAF1: Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (Apoptotic protease activating factor 1); DISC: Ölüme neden olan sinyal kompleksi (Death-inducing signaling complex).



Şekil 1. 5.Memeli hücrelerde Apotozis yolakları.

1.4.Nekroz

Nekroz bir tür hücre ölümüdür. Apoptoz ile Nekroz arasında temel morfolojik farklar vardır. Mikroskopta morfolojiklerine bakarsak, apoptotik hücre etrafındaki halo ile kolayca tanılır. Nekrotik hücrelerde membran kaybı, hücre şişmesi, kromatin flokülasyonu, organellerin disintegrasyonu, büyük vakuolların oluşması, endoplazmik retikulum dilatasyonu ve hücre lizisi görülmektedir. Apoptozda morfolojik değişimler ise hücre küçülmesi ve hücrenin membranında blebler oluşması ile membranın intakt bir şekilde bulunmasıdır. Aynı zamanda kromatin nükleer membran etrafında toplanmış ve yoğunlanmış şekilde görünmektedir. Organellerde disintegrasyon yoktur. Apoptoz sürecin sonunda apoptotik cisimcikler görünmektedir. Bu cisimler hücre organellerin membranla sıkıca paketlenip kaplanmış şekilde gözlemlenir ve apoptotik body olarak ifade edilir. Nekroz için ATP (adenozintrifosfat) gerekmez ama apoptozda ATP ihtiyacı görülür. DNA fragmantasyonu, apoptozda DNA nükleozomunda 180b çiftinin katları olacak şekilde mono ve oligo nükleozomlara ayrılması ile karakterize edilir. Fakat nekrozda DNA parçalanması rastgele olacak şekilde postlitik dönemde olur. Apoptozda DNA parçalanmasının prelitik dönemde gerçekleştiği bilinmektedir. Hücreler nekrozda gruplar halinde ölürken, apoptozda hücrelerin tek tek ölümü görünmektedir. Nekrozun aksine apoptozda enflamasyon görülmez (Fink & Cookson, 2005).

Tablo 1. 1. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar (Engin, Ceyda, & Yusuf, 2011).

Karakteristikleri	Apoptoz	Nekroz
Neden olan faktörler	▪ Büyüme faktörlerin eksikliği ▪ Kemotrapi ▪ Radyasyon ▪ Orta seviye oksidatif sters ▪ HIV ▪ Sitotoksik T hücreleri ▪ Ölüm reseptörlerinin uyarılması	▪ İskimi ▪ Kemotrapi ▪ Aşırı oksidatif stres ▪ Hipoksi ▪ Yüksek doz toksik madde ▪ Hipertermi
Morfolojik özellikleri	▪ Blebler içeren intakt membranı ▪ Apoptotik body formasyonu ▪ Kromatin kondenzasyonu ▪ Hücre büzülmesi	▪ Membran hasarı ▪ Hücre parçalanması ▪ Kromatin topaklanması ▪ Hücre şişmesi ▪ Organellerin dağılması
Biyokimiya ve immünolojik özellikleri	▪ Nükleozomlar arası DNA fragmentasyonu ▪ ATP gereklidir ▪ Enflamasyon görülmez ▪ Agaroz jelde merdiven modeli görülür ▪ M30 antijeni salınır	▪ Lizozomal enzimler salınması ▪ ATP gerekli değildir ▪ Enflamasyon görülür ▪ Agaroz jelde DNA süründüo larak görülür ▪ Bozulmuş iyon dengesi ▪ LDH ve M65 gibi hücre ölüm belirteçleri salınır

1.5. Epiteliyal-Mezankimal Geçiş (EMT)

EMT kanser invazyonunda kilit olaylardan biridir. Bir çok düzenleyici molekül EMT'nin indüklemesinden sorumludur. Epitel hücrelerinin hücre polaritesi ve hücre-hücre adezyonu kaybederek invaziv ve metastatik özellikler kazanarak mezankimal hücrelere dönüştüğü tersinir işlemdir. Aslında EMT emberiyogenetik morfogenez sırasında ortaya çıkar. Son yıllarda kanserde ve fibrozda daha fazla gösterilmiştir. E-kaderin ablasyonu nedeniyle hücreler hücre-hücre temasını kaybederek kanser hücrelerinin uzak dokulara veya çevre dokulara yayılması ile sonuçlanır. EMT karsinom ve metastaz için önemli rol oynar. Mezankimal hücrelerde yüksek seviyede N-kaderin, fibronektin ve vimentin eksprese ederken, yüksek düzeylerde E-kaderin epiteliyal hücrelerde eksprese edilir. E-kaderin bir transmembran proteinidir. Hücre yapışmasında önemli rol oynar ve EMT de önemli bir faktör olarak görülmektedir. EMT ise kanser metastazı için kritik bir basamağı oluşturmaktadır. Düşük E-kaderin ekspresyonu kanser hücrelerinde gözlemlenmiş ve hastalığın ilerlemesiyle ilişkili olduğu görünmüştür. E-kaderin ekspresyon kaybı prognostik olarak kötüye gidiş olarak değerlendirmektedir (Giannelli, Koudelkova, Dituri, & Mikulits, 2016).

1.6.Baicalein veTimokinon (Thymoquinone) İlaçlar

1.6.1.Baicalein



Şekil 1. 6.Baicalein bileşiğinin doğl ve kimiyasa şekli

Baicalein; Nepal, Çin ve Japonya da bulunan ham ilaçların flavonoid bileşenidir. Geleneksel olarak anti-inflamatuar ve anti-kanser tedavisi olarak kullanmıştır. Ayrıca anti-viral, anti-piretik, anti-hipersensitivite ve anti-tümör özellikleride görunmektedir. Baicalein'in kanser önleyici etkisi KHDAK daha önce çalışmalarda da görünmüştür. Bu flavonoid apoptozu indükler ve KHDAK'de tümör hücrelerinin büyümesini inhibe etmektedir. Bu durum Bcl-2/Bax, kaspaz-3 ve p53 gibi, hücre döngüsünü etkileyen apoptoz proteinleri tarafından düzenlemektedir. Baicalein kaspaz-3 ve -9 aktivasyonu ile sitokrom C salınımının artmasını takiben apoptozu indükler. Baicalein doza bağlı bir şekilde akciğer kanseri hücre proliferasyonunu önemli ölçude azaltır. Fonksiyonel düzeyde azalmış hücresel f-aktin içeriği ile ilişkili apoptozda doza bağımlı bir indüksiyon görülmektedir. Aynı zamanda nükleer yoğunlaşmasında ve mitokondriyal kütle potansiyelinde artış gözlnmektedir. Scutellariae baicalensis'in önemli bir flavonu olan baicalein, kanser hücresi proliferasyonunu inhibe eden ve apoptozu indükleyen araşidonik asit metabolizmasının 12-lipoksijenaz (12-LOX) yolağını inhibe eder. Baicaleini spesifik olarak kanserdeki tek bileşiklerin proliferasyonu ve metastazını inhibe edici özellikleri gözlemlenmiştir. Baicalein ile kısa süreli tedavi (48saat) insan yumurtalık kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder. Taxol ile kombine edildiğinde kanserli hücre ölümünde artış gözlenmiştir. Baicalein zaman ve doza bağımlı bir şekilde meme kanseri hücrelerinin invazyonunu bastırmaktadır. Meme kanserinin metastazını baskılama potansiyeli de vardır. Baicalein yutulduğunda metabolize olur ve insan kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyonu inhibe ettiği ortaya konmuştur

(Kim et al., 2013). Anjiyogenez anahtar modülatörü VEGF olarak kabul edilmektedir. VEGF, endoteliyal hücre büyümesini uyarmakta ve G_0 da bulunan hücreleri yeniden aktive etmektedir. Hücre döngusunu G_1 fazının süresini azaltarak mödüle etmektedir. Böylece bir flavonoid olan Baicalein'in VEGF ile indüklenmiş anjiyogenezi inhibe edebilmektedir (Cathcart et al., 2016; Pan, Xue, Xiao, Wan, & Xu, 2016).

1.6.2.Timokinon(Thymoquinone)



Şekil 1. 7.Thymoquinone bileşiğinin doğal ve kimyasal şekli

Timokinon (TQ), Nigell a Sativa Linn tohumu yağının birincil biyoaktif bileşenidir. Timokinon ilk olarak 1963 yılında EL-Dakhakhany tarafından çörek otu ekstraktlardan izole edilmiştir. Bu ilaçın netleşmesi için birçok preklinik çalışma, farmakolojik, ve tibbi faaliyeler gerçekleştirilmiştir. Nigella sativa, kara kimon tohumu diye de adlandırılmaktadır. Timokinon (TQ,2-izopropil-5-meyil-1,4benzokinon) N.Sativa linn'in birinci biyoaktif bileşenidir. Timokinon anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-neoplastik, ajan olarak kullanılmakla birlikte anti-diyabetik, anti-hipertansif, anti-mikrobiyal, immünomodülatör özellikleri görülmektedir. Önceki çalışmalarda TQ'nun farklı kanser tipleri üzerinde engelliyici etkileri göstermiştir (Hosseinzadeh & Parvardeh, 2004; Wanner, Koomen, & Dung, 1993; Woo, Kumar, Sethi, & Tan, 2012). Apoptoz, invazyon, metastaz, anjiogenez ve proliferasyon da dahil olmak üzre birçok kanser süreci etkilenmektedir. Çeşitli araştırmalara göre TQ, A549 (KHDAK hücre hattı) hücrelerinin büyümesini inhibe etmektedir. Özetle, A549 hücrelerinin proliferasyonu ve invazyonu üzerinde TQ, ERK1/2 yolağını modüle etmektedir (Jafri et al., 2010). Timokinon'un kanser hücrelerinde DNA sentezi ve proliferasyonu inhibe edebildiği de görülmüştür

(Gurung et al., 2010; Salem, El Haty, Abdou, & Mu, 2015). Oksidatif stresin farklı kanser tiplerinin patogenezinde hayati rolleri vardır. Genellikle anti-oksidan sistemler serbest radikalleri temizleyerek oksidatif DNA hasarını önlemek ve hücreleri korumak için Timokinon'un anti-oksidan aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Chowdhury, Hossain, Mostofa, Akbor, & Bin Sayeed, 2018; Khan, Tania, Zhang, & Chen, 2010; Nagi, Almakki, Sayed-Ahmed, & Al-Bekairi, 2010). Timokinon Bax/Bak gibi pro-apoptotik genleri ve proteinleri düzenleyebilir veya Bcl-2 gibi anti-apoptotik genleri ve proteinleri aşağı regüle eder. Bcl-xl, diğerlerinin arsında kaspaz yolunu modüle etmektedir. Bu sayede apoptozu indükleyerek kanser hücrenin büyümesini kontrol eder (Dajani, Shahwan, & Dajani, 2016; Gali-Muhtasib, Abou Kheir, Kheir, Darwiche, & Crooks, 2004) . Timokinonun apoptozu indüklediği de açıktır. p53 ifadesine müdahale edebilen molekülleri hedefler; peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör (PPAR)-g, fosfataz ve tensin homologu (PTEN), transkripsiyon aktivitörü (STAT)3, ve reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretilmesi yolu ile bu durum gerçekleşir (Woo et al., 2012). Timokinon bazı tümör baskılıyıcı genlerin ve proteinlerin aşırı anlatımına sebep olmaktadır. Örneğin, p53, PTEN, p21, p27 ve meme kanseri tip1 duyarlılık proteini (BRCA1), diğerleri arasında, belirli onkogen moleküller, fosfoinositid 3 kinaz (PI3K)/Akt, ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/ERK'in timokinon tarafından inhibe edildiği ortaya konmuştur(Gali-Muhtasib et al., 2004; Mostofa, Hossain, Basak, & Bin Sayeed, 2017; Şakalar et al., 2016). Timokinon kanser hücresinin büyümesini engelleyerek ve ek olarak farklı moleküler yolları hedefleyerek kanser hücresi metastazını kontrol etme potansiyeline sahiptir. Ayrıca Timokinon neovaskülarizasyonun temel basamaklarına müdahale ederek anjiogenez gelişimini de inhibe edebilmektedir (Kolli-Bouhafs et al., 2012). Genetik ve epigenetik değişiklikler anormal genlerin oluşumuna neden olabilirler. Böylece anormal ekspresyon ve protein fonksiyonları gelişebilmektedir. Doğal bileşikler kanserde mükemmel adaylardır. Kanserin önlemesi ve terapötik özelliklere sahip olması durumda bileşeklerin doğurdan veya dolaylı olarak genoma müdahale ederek genetik ifadeyi düzenlediği ve epigenetik makineleri hedefleyebileceği ifade edilmiştir (Kar et al., 2014; Patra & Szyf, 2008; Stefanska, Karlic, Varga, Fabianowska-Majewska, & Haslberger, 2012). Timokinon

umut verici bir anti-kanser molekül olarak kabul görmektedir. Farklı hücre sinyallerini hedefleyerek modülasyona da dahil olmak üzere karsinogenezde yer alan modifikasyonlar; histon asetilasyonu, epigenetik veya deasetilasyon, DNA metilasyonu, ve demetilasyonlar gösterilmiştir (Arafa et al., 2011; Paluszczak, Krajka-Kuźniak, & Baer-Dubowska, 2010). Timokinon, DNA'daki metilasyon süreciniN bir modülatörü olarak önerilmiştir. Timokinon'un metilasyon ve demetilasyon ajanı olarak hareket ettiği tahmin edilmektedir (Khan, Zheng, & Fu, 2019). HDAC'lar genelikle MCF-7 meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilmektedir. Timokinon bir HDAC inhibitörü(HDACİ) gibi çalışarak histonların asetilasyonunu indüklemekte ve histon deasetilasyonunu inhibe ederek güçlü bir şekilde apoptozu indüklemektedir. Ayrıca Timokinon HDAC hedefini indükleyen genleri yeniden etkinleştirmektedir. Bax yukarı regülasyonunu ve Bcl-2 aşağı regülasyonunu indükleyerek hücre döngüsünü G_2/M fazında durdurur (Arafa et al., 2011; Parbin et al., 2016) .

2.MATERYAL METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler

-Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco.ABD.

-Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya.

-% 0.05 Tripsin – Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin EDTA),Gibco.ABD.

-L- glutamin,Gibco.ABD.

-Tripan mavisi (%0.5), Biyological industries.

-Fetal sığır serumu (FBS), Gibco. ABD.

-Roswell Park Memorial Institute Medium(RPMI), Gibco.

-Penisilin-streptomisin solüsyon(10.000u/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco.ABD.

-Asetik asit, isolab.

-Baicalein

-Thymoquinone

-Muse® caspase-3/7 Assay(katalog No:MCH100108),Luminex corporation.

-Muse® Annexin V & Dead cell Assay kit (Cat: MCH100101), Luminex corporation

-Trikoloroasetik asit, sigma Aldrich.

-SRB(Sulforhodamine B), santa cruz.ABD.

-Tris Base, sigma.

2.1.2. Sarf Malzemeler

- 25cm² ve 75cm² ‘lik flask,Thermo scientific.

- 2ml’lik cam pastor pipetler, Isolab.

- 1000µl’lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya.

- 100µl’lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya.

- 10µl’lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya.

- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler,Genject.

- 96 kuyulu flat plate, constar.

- 24 kuyulu plate, constar.

- 6 kuyulu plate, constar.

- Kriyovial,corning, ABD.

- Thoma lamı, Neobauer improved, Isolab.

- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab.

- serolojik pipetler (5ml, 10ml, 25ml, 50ml), CLEAR line ,Biosigma.

-Steril tek kullanımllık filtreler (0.2 mikron çapında), orgaan scientifie.

- steril santrifüj tüpleri (15ml, 50ml),Nest, ABD.

-Eppendorf tüpleri (0.5ml, 2ml, 5ml),sigma,Aldrich Milipore®.

2.1.3.Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre-plate okuyucu, Spectrostar, BMG Labtech.

- Hassas terazi, ABJ-NM/ABS-N, KERN.

- Laminar hava kabini calssII, Telstar, Biovangurd.

- CO_2 inkübatörü, MCO-230AIC-PE, Panasonic, Japonya.

- Buzdolabı (+4˚C ve -20˚C), MPR-721-PE-Panasonic, Japonya.

-Muse cell Analyzer, Merc Milipore Sigma, Kanada.

- Santrifüj, CF16RN, Hitachi, Japonya.

- -80˚C Buzdolabı, MDF-U5386S-PE, Pnasonic, Japonya.

- Inverted mikroskop, Eclipse T52, Nikon Japonya.

- Otoklav, OT90L, Nüve.

- Kuru sterilizatör, MOV-212-PE, Panasonic, Jponya.

- Çok kanallı pipet (200µl) Brand.

- Pipet seti (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl) ,Brand.

2.2. Metot

2.2.1. Bicalein ve Timokinin Bileşiklerin Hazırlanması

Baicalein bileşiği 50mM stok konsantrasyonda hazırlandı. Bunun için 13,51 mg baicalein bileşiği 1000 µl DMSO içerisinde çözdürülmüştür ve -20℃ dolabında saklandı. Timokinon bileşiği 25mM stok konsantrasyonda hazırlandı. Bunun için 4,1 mg Timokinon bileşiği 1000 µl DMSO içerisinde çözdürülmüştür ve -20℃ dolabında saklandı.

2.2.2. Hücre Kültürü

Labratuvarımızda bulunan A549 Akciğer adenokarsinom ve Beas-2b normal akciğer hücre hatları kriyovial tüpler içerisinde -80˚C dolapta saklandı. Bu hücre hattı 1972 yılında D.J Giard tarafından, 58 yaşındaki beyaz bir erkekten akciğer kanserli doku eksplant kültür yoluyla alınmıştır. A549 akciğer dokusundan alınan adenokarsinomdur. A549 aslında bir epiteliyal hücredir ve genelikle 3D hücre kültüründe, kanser araştırmalar ve yüksek verim tarama toksikoloji uygulamalarda kullanır. Sıvı nitrojen buhar fazında yada -80˚C dolaplarda depolanır. Bu hücre hattı, uygun bir transfeksiyon konakçısıdır. A549 büyüme özelliği (adherent) yüzeye yapışık şekildedir. Beas-2b hücre hattıda tam A549 gibi uygun bir transfeksiyon konakçısıdır. Bu hücreler seruma yanıt olarak skuamöz farklaşmaya girme yeteneği korur ve farklaşma veya kasinojenezi indükleme ve etkileme yeteneği açısından kimiyasal ve biyolojik ajanlar taramak için kullanabilir. Beas-2b hücre hattının büyüme özelliğide yüzeye yapışarak yani adherent şeklindedir. Bu epiteliyal hücreleri, kanserli olmayan bireylerin otopsisinden elde edilen normal insan bronşiyal epitelinden izole edilmektedir.

2.2.3. Hücre stoklanması

Flasklardaki hücreler yoğun olduklarında besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile yıkandı. Adherent hücrelerin bulundukları yüzeyden kalkmaları için %0.05 Tripsin-EDTA solüsyonu ile 5 dakika inkübatörde bekletildi. Tripsin inhibisyonu için

tripsinin on katı besiyeri ilave edildi. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. Sallanan kovalı rötarlı santrifüjde 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmını aspire edildi ve hücreler 1ml de dondurma mediumu (%5-10) DMSO+ %10 FBS + %80 DMEM) içinde 1×10^6 hücre olacak şekilde her bir kriyovial içine konuldu. Daha sonra hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.4.Hücre Soyların Stoktan Çıkarılması

Hücreleri -80°C'den çıkartılarak su banyosunda hızlı şekilde çözdürülür. Hücre süspansiyonu 15ml'lik falkona alınır ve dondurucu medyumu inhibe etme amacıyla %5 FBS, %1penisilin-glutamin içeren 5ml RPMI (besiyeri) falkona ilave edilir ve 5dakika 800rpm'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edilir ve kalan pellet 1ml besiyeri eklenerek süspanse hale getirilir. 1ml hücre süspansiyonu 25cm² flaska alınır ve 4ml hazırlanan besiyeri ilave edilerek 37°C, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilir.

2.2.5.kullanılan besiyerini hazırlanması

A549 ve Beas-2b hücrelerinin besiyeri şu şekilde hazırlandı: RPMI 1640 (Gibco) besiyerine %10 Fetal Bovine serum (Gibco) ve %1 Penisilin-Streptomisin solüsyonu (10.000µ/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin,Gibco) ilave edildi.

2.2.6.Hemositometre ile hücre sayımı

Önce hücrelerimizi tiripsinle kaldırıyoruz. Tripsinle hücreleri suspanse hale getirdikten sonra, suspansemizden 10µl alınarak, 96 kuyulu plate içerisinde 10µl %5 tripan mavisi (Sigma) ile karıştırdık. Sonra bu karışımdan 10µl alıp ve hemasitometre lamın üzerine bırakıp ve mikroskopta hemositometri üzerinde beş alanda hücre sayımı yaptık. Bulunan sayı sulandırma kat sayı ile çarpılarak 1ml besiyerindeki hücre sayısını hesapladık.

2.2.7.Sulforhodamin B (SRB) testi ile canlılık Tayini

SRB testi, 1990'da skehan ve ark. tarafından hücre tabanlı çeşitli tarama çalışmalarında sitotoksite deneyini ucuz bir şekilde yapmak için kullanılmıştır

(Skehan et al., 1990; Vichai & Kirtikara, 2006). Bü yöntem, hafif asidik koşullar altında proteinlerle stokiyometrik olarak bağlanan ve daha sonra bazik koşullarda çözünen SRB boyasının özelliğine dayanır. Bu nedenle bağlı boya miktarı, hücre çoğalmasını ölçmek için varsayımsal olarak hücre canlılığını hakkında bilgi vermektedir. SRB protokolu dört ana aşamaya ayrılabilir:

- Tedavinin hazırlanması
- Tercih edilen tedaviyle hücrelerin inkübasyonu
- Hücre fiksasyonu ve SRB boyaması
- Absorbans ölçümü

SRB boyası, %0,4 (kütle/hacim) olacak şekilde %1 asetik asit çözeltisi ile hazırlandı. Stok boya solüsyonu 4 ̊C'de saklandı. Trikoloroasetik asit (TCA) %50(kütle/hacim) olacak şekilde distile su ile hazırlandı ve 4 ̊C'de saklandı.

Doz tayin etmek için tekli kimiyasal uygulaması yapıldı ve TZE petrisi hazırlanarak hücre büyüme profili belirlendi.

SRB testi için baicalein farklı konsantrasyonlar (100-3,1µM) ve thymoquinone farklı konsantrasyonlar (50-1,5µM) seri dilüsyon yaparak hazırlandı ve üç 96 kuyulu petri birbirinden bağımsız şekilde her kuyu 2500 hücre/100µl besiyeri olacak şekilde ekilen ve 24 saat yapışıp ve morfolojisini alması amacıyla inkübe edilen hücreler 100µl (1:2 dilüsyon) hacimde uygun dozlarda ilaç uygulandı. Kontrol gurubu kuyuları tedavi uygulamadan 2500 hücre/200µl besiyeri olacak şekilde ve kör sadece 200µl besiyeri ile ekildi. Tedavi uygulanan petriler 24/48/72 saat olacak şekilde 37̊C, %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi(Her tekli doz, NK ve kör için birbirinden bağımsız olarak 3 tekrar olacak şekilde uygulama yapıldı). İnkübasyon süresinin sonunda SRB yöntemi uygulandı.

TZE uygulamasında A549 ve Beas-2b hücreleri dahil olmak üzere, 96'lık petride 2500 hücre/100µl besiyeri ve kör için sadece 100µl besiyeri (3 tekrar olacak şekilde) ekim yapıldı. Ekim sonrası 24 saat, 37 °C, %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda SRB yöntemi uygulandı.

Doz seçiminden sonra kombinasyon tedavi uygulamasi

Baicalein (100-12.5µM) ve timokinon (50-6.25µM) konsantrasyonları seri dilüsyon yöntemiyle hazırlandı. Tekli tedavide olduğu gibi A549 ve beas-2b her hücre üç 96 kuyulu petride her kuyu 2000 hücre/100µl besiyeri olacak şekilde ekim yapıdı. Morfolojisini alması ve yüzeye yapışması adına 24 saat inkübe edildi. Süre tamamlandıktan sonra hazırlanan tedaviler her doz için 50µl kimyasal (1:4 dilüsyon) ve kombinasyon için her birinden 50µl (1:4 dilüsyon) olacak şekilde uygulandı. Tekli tedavilere 50µl besiyeri ilave ederek her kuyu 200µl hacim alacak şekilde tamamlandı. Kontrol grubu kuyularına sadece 2000 hücre/200µl besiyeri ve kör kuyularına sadece 200µl besiyeri eklendi (kör, kontrol, tekli ve kombinasyon 3 tekrar olacak şekilde uygulandı). Tedavi uygulanan hücreler 24, 48, ve 72 saat 37 °C, %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda SRB yöntemi uygulandı.

SRB yöntemin uygulanması

İnkübasyon süresi tamamlanmış 96'lık petriye fiksasyon işlemi için her kuyuya 50µl ve TZE petrisi için her kuyuya 25µl olmak üzere TCA eklendi ve 1 saat 4 °C'de inkübe edildi. Sonra TCA kuyulardan uzaklaştırılıp 5 kez distile su ile yıkama yapıldı. Kuyular kurutulduktan sonra her kuyuya 50µl SRB boyası eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi. Süre sonunda SRB boyası uzaklaştırılıp 5 kez %1 asetik asit ile yıkama yapıldı. Petri kuruduktan sonra boya çözdürülmesi amacıyla her kuyuya 150µl (10mM, pH:10) Tris bazı eklendi ve 10 dakika 100 rpm'de orbital çalkalıyıcıya karıştırılması amacıyla bırakıldı. Sonra elde edilen renk spektromu spektrofotometrede (Plate Reader-spectrofotometre, BMG Labantech, spectrostar) 564 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı ve elde edilen absorbans değerleri hücrenin canlılık oranları olarak tanımlandı. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak değerlendirildi ve tedavi uygulanan hücrenin canlılığı bu formüle göre hesaplandı.

%Canlılık = [100× (Kimyasal uygulanan grubun abrorbans ortalaması - kör absorbans ortalaması) / (kontrol grubun absorbans ortalaması - kör absorbans ortalaması)]

TZE pleyti için : GI50 için $100 \times (T - T_0) / (C - T_0) = 50$

TGI için $100 \times (T - T_0) / (C - T_0) = 0$

LC50 için $100 \times (T - T_0) / T_0 = -50$

GI50 (anti proliferatif etki): Hücre popülasyonunda kontrole kıyasla büyümede %50 oranında azalma göstermiştir.

TGI (sitostatik etki): Toplam büyüme inhibisyonunu gösteren bu parametre kontrol ile kıyasla hücre popülasyonunu öldürmeden %100 önlendiğini belirtir.

LC50 (sitotoksik etki): Hücre popülasyonunu kontrole kıyasla %50 öldürdüğünü gösteren bir parametre olarak tanımlanır.

2.2.8.Akım sitometrisi ile AnneksinV/7-Amino aktinomisin(7AAD) Belirlenmesi

Erken ve geç dönem apoptozu belilemek için kullanılan bu yöntemde canlı hücrelerin hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunun fostotidilserinler (PS) apaoptozun erken evresinde hücre zarının dış yüzeyine transloke olurlar. Erken evre apoptozda membranın bütünlüğü korunurken fagositik yanıt tetiklenir ve hücre makrofajlar tarafından tespit edilerek yutulur. Anneksin V hücre membranından geçemeyen bir protein olup dış yüzeye transloke olan PS'lere bağlanır. Anneksin V eğer FITC gibi floresan bir probe ile işaretlenirse apoptotik hücre görünür hale gelir ve florometrik bir yöntem ile hücre apoptozu analiz edilebilir (Bratton et al., 1997; Gatti et al., 1998; Koopman et al., 1994; Overbeeke, Steffens-Nakken, Vermes, Reutelingsperger, & Haanen, 1998; Tesarik, Greco, Cohen-Bacrie, & Mendoza, 1998; Zhang, Gurtu, Kain, & Yan, 1997). 7-AAD DNA'ya bağlanan bir boyadır ve membran bütünlüğü korundukca hücre içerisine giremez. Geç dönem apoptoz ve nekrotik hücre ölümünde

membran bütünlüğü kaybedildiği için hücre içine girebilir. Akım sitometrisinde hücrelerin tek tek flow cell diye tanımlanan kapilar borudan geçip lazere maruz kalıp ve cihazın ölçüm yapılabilmesi için hücrelerin önce suspanse hale olmaları gerekmektedir. Hücreler lazer ışığının bir kısmını saptırır ve bu saptırma bize hücre boyutu hakkında bilgi verir. Ayrıca eğer hücreler floresan işaretli bir boya ile muamele edilmişse ilgili lazer ışığı tarafından uyarıldıkları zaman floresan ışıma yaparlar. Böylece bu işaretleme hücre yüzeyindeki veya içindeki proteinlere spesifik antikor bağlanması yada hücredeki moleküller (ROS gibi) veya organeller spesifik boyalar kullanılarak gerçekleştirilir. Söz konusu spesifik antikorlar FITC, PE veya 7-AAD (7-Amino Aktinomisin D) gibi floresan boyalar eklenir. İlgili boya yada antikor ile işaretlenen hücre lazer ışınyla uyarıldığında floresan ışıması cihaz tarafından belirlenir (Karaboz, Kayar, & Akar, 2008).

Anneksin V'in FITC gibi floresan bir maddeyle işaretlendiğinde apoptotik hücreler belirlenebilir hale gelirler. Erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrozu ayırt etmek için propidyum iyodid (PI) ya da 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) boyaları kullanılmaktadır.

	Anneksin V	7-AAD
Sağlıklı hücre popülasyonu	–	–
Erken dönem apoptotik hücre popülasyonu	+	–
Geç dönem apoptotik hücre popülasyonu	+	+
Nekrotik hücre popülasyonu	–	+

Tablo2. 1. Anneksin V , 7-AAD'de saptanma sonuçlar

Muse anneksin V ve dead cell kiti kullanarak ölçüm yapabilmemiz adına A549 hücrelerini iki 6'lık kuyulu petride her kuyu 5×10^4 hücre/1ml besiyeri olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin morfolojisini kazanması adına 24 saat 37 °C, %5 CO_2'li

ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda Baicalein 50µM ve Timokinon 25µM olacak şekilde hazırlanan tedaviler tekli doz için birbirinden bağımsız 1ml ve 1ml besiyeri(1:2 dilüsyon), kombinasyon 1ml Baicalein ve 1ml T Timokinon ilgili ekilen hücre kuyusuna uygulandı, kontrol grubu hücrelerine kimyasal eklemeden 5×10^4 hücre/2ml besiyeri içinde ekim yapıldı. İki plate 24 ve 48 saat olmak üzere 37 °C, %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon suresi tamamlanınca kontrol grubu hariç kimyasal uygulanan hücrelerin üstündeki besiyeri aspire edildi. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra Tripsin-EDTA eklenerek hücreler kaldırıldı. Kalkan hücreler ilgili santrifüj tüpüne aktarıldı ve 500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 100µl %1 FBS içeren PBS ile süspanse hale getirildikten sonra 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Üstüne 100µl muse anneksin & dead cell solüsyonu eklenerek iyice vorteks yapıldı ve sonra 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip sonra Muse ™ cell analyzer cihazı yardımıyla ölçüldü.

2.2.9. Akım Sitometrisi ile Kaspaz 3/7 Aktivasyon Analizi

Apoptoz sürecinde etkili olan kaspaz 3/7 (efektör kaspazlar)'nin aktivasyonu, kaspaz bağımlı apoptoz ve membran bütünlüğü hakkında bilgi vermektedir. Aslında bu test membran bütünlüğü ve kaspaz bağımlı apoptozu ölçmek için yapılır. Bu test için de A549 hücreleri anneksin V testinde olduğu gibi ekildi ve 24 saat inkübe edildikten sonra hazırladığımız Baicalein ve Timokinon kimyasalı uygulandı. 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra hücreler toplandı ve santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant aspire edilerek kalan pellete 50µl %1 FBS içeren PBS ile süspanse hale getirildi. 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 5µl kaspaz 3/7 reagent eklenerek iyice vorteks yapıldı. Sonra kapağı açık şekilde 30 dakika inkübatörde bekletildi. Sürenin sonunda 150µl 7-AAD boyası eklendi, vorteks yapıldı ve sonra 5 dakika oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edilir. İnkübasyon süresinin sonunda Muse™ cell azalyzer cihazı yardımıyla ölçüldü.

Tablo2. 2. kaspaz 3/7 , 7-AAD saptanan sonuçlar

	Kaspaz 3/7	7_AAD
Sağlıklı hücre popülasyonu	–	–
Erken dönem apoptotik hücre popülasyonu	+	–
Geç dönem apoptotik hücre popülasyonu	+	+
Nekrotik hücre popülasyonu	–	+

2.2.10. Migrasyon (yara iyileştirmesi) Testi Analizi

Yara iyileştirme veya ″kazıma″ testi, toplu hücre göçünü izlemek ve ölçmek için en çok kullanılan in vitro yöntemlerden biridir. Bu test özellikle cildin restorasyonunda çok önemli rolü olan yara iyileştirmesi farklı hücre tiplerinin katılımıyla organize edilir. Homeostaz, inflamasyon, proliferasyon, migrasyon ve yeniden biçimlendirme olarak 5 aşamaya ayrılabilir. Bu çalışmalar in vitro deneylerde büyük önem taşır ve etik sebeplerden dolayı yaygın olarak kullanmaktadır. 2D yara iyileştirme yönteminde temel prensip tek katlı konfluent bir hücre yapısını bozmak ve hücre migrasyonu için hücresiz bir ortam yaratmaktır. Bu 2D yöntem üç temel aşamadan oluşur:

- Hücre yaralanması
- İyileştirme sürecinin takibi
- Toplanan verilerin analizi

Öncelikle migrasyon testi için 24 kuyulu hücre ekim kaplarına kuyu başı 6×10^4 hücre /500µl besiyeri içerisinde olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. Sonra hücreler 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda kuyulara 200µl'lik pipet uçları ile düz çizikler atıldı ve kuyulardaki besiyerleri aspire edildi. Çizilme sonrası kalkan hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için kuyuların yüzeyi 200µl 1X PBS (Gibco) solüsyonu ile yıkandı ve aspire edildi. Ardından ilaç uygulamasına geçildi. İlaçların istenen dozları, totalde kuyu başı 500µl hacim besiyeri içerisinde olacak şekilde hesaplansı. İlaçlar ekledikten sonra kültür

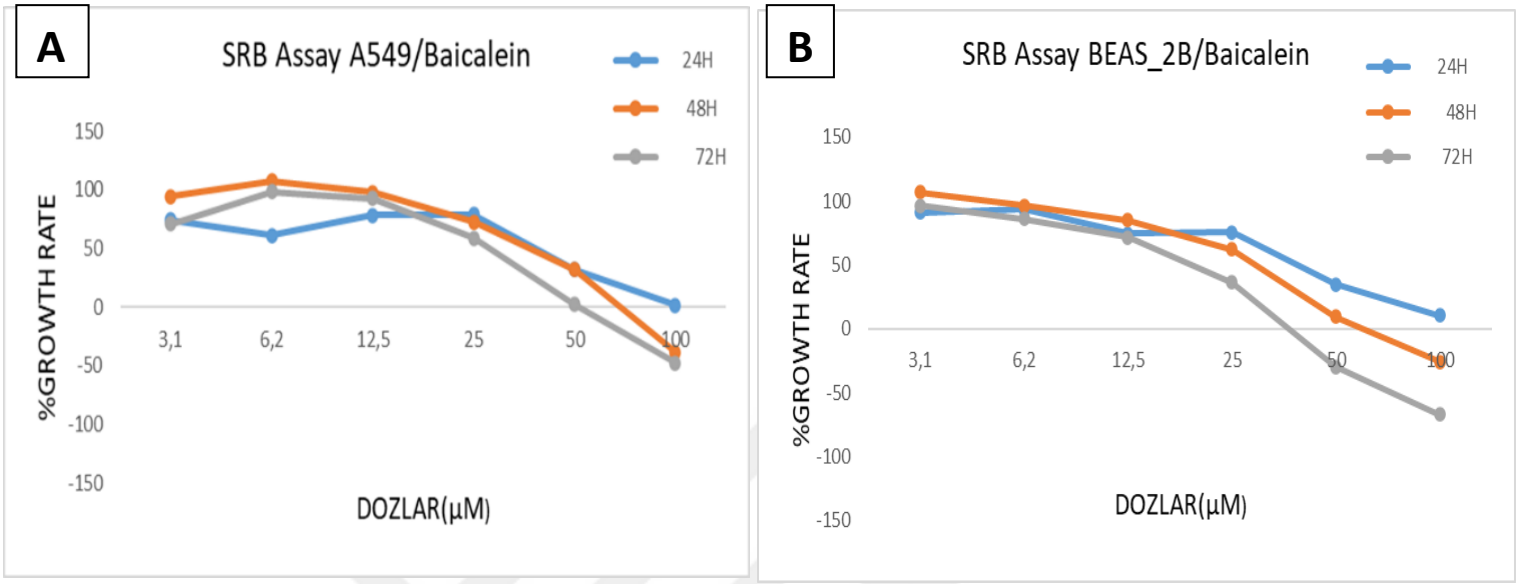
kapları ilgili süreleri kadar zaman boyunca 37℃, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona tâbi tutuldu. Etki değerlendirmesi için 24, 48, 72 saat sonrası kapanmalar incelendi.

3.BUGULAR

3.1. SRB Canlılık Testi Sonuçları(etkin doz belirlemesi için)

3.1.1.Baicaleinin % Büyüme Oranı (growth rate) Üzerindeki Etkinin İncelenmesi

Baicalein'in büyüme oranı ve hücre canlılık üzerindeki etkisini incelemek için 6 farklı doz (3,1-100µM) aralığında SRB canlılık testi yapıldı. Altı farklı konsantrasyon 24, 48, ve 72 saat olmak üzere A549 (Akciğer kanseri) ve Beas-2b (Sağlıklı akciğer) hücre hatlarına uygulandı. Uygulanan tekli tedavi absorbans ve TZE (hücre büyümesinin sıfır noktası) değerleri göz önunde bulunarak % büyüme oranıyla ve oran baz alınarak GI50 (anti proliferatif etki), TGI (sitostatik etki) ve LC50 (sitotoksik etki) değerleri hesaplandı. Bu hesaplamalarla kombinasyon için uygun doz (100µM)'a karar verildi (şekil 3.1).



Şekil 3. 1.A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı(B) uygulanan Baicalein hücre canlılığının doz ve zamana bağlı şekilde değişıklık gösterdiği belirlenmiştir.her doz için birbirine bağımlı 3 tekra olacak şekilde tedavi uygulandı ve hesapladığımız GI50, TGI ve LC50 değerlerini tablo (3.1) de görunmektedir

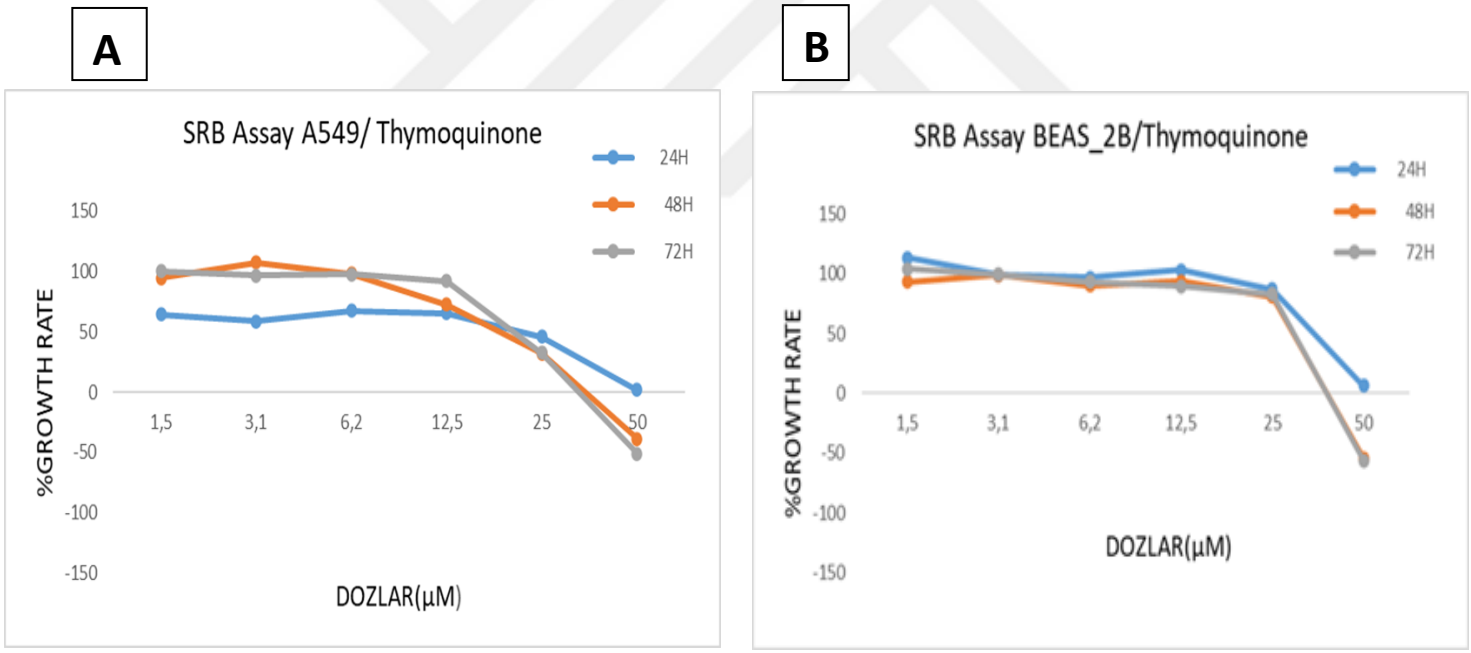
Tablo 3. 1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında Baicalein'in farklı konsantrasyonlarının uygulandıktan sonra hesaplanan GI50 (anti proliferatif etki), TGI (sitostatik etki), LC50 (sitotoksik etki) değerleri görünmektedie.

A549 BAİ	24s	48s	72s
GI50	40,36	38,96	28,96
TGI	>100	72,63	52,39
LC50	>100	>100	>100

Beas-2b BAİ	24s	48s	72s
GI50	19,52	30,64	20,18
TGI	>100	63,09	38,71
LC50	>100	>100	76,72

3.1.2. Timokinin'un %büyüme oranı üzerindeki etkisinin incelenmesi

Timokinon'un hücre canlılığı ve büyüme oranı üzerindeki etkisini incelemek için (1,5-50 µM) 6 farklı konsantrasyonundaki dozlar 24, 48, ve 72 saat olmak üzere A549 ve Beas-2b hücre hatlarına uygulandı (her doz için kendi içerisinde bağımlı 3 tekrar olarak uygulandı). Uygulanan tekli tedavi absorbans ve tze değerleri göz önünde bulundurarak %büyüme oranı ve bu oran baz alınarak GI50, TGI ve LC50 etki değerleri hesaplandı. Bu hesaplamaya göre kombinasyon için uygun doz (50 µM)'a karar verildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3. 2. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı (B) uygulanan timokinon hücre canlılığının doz ve zamana bağlı şekilde değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Her doz için birbirine bağımlı 3 tekrar olacak şekilde tedavi uygulandı ve ve hesapladığımız GI50, TGI ve LC50 değerlerini tablo (3.2) de görunmektedir.

Tablo 3. 2. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında Thymoquinone'nin farklı konsantrasyonlarının uygulandıktan sonra hesaplanan GI50 (anti proliferatif etki), TGI (sitostatik etki), LC50 (sitotoksik etki) değerleri görünmektedie.

A549 Timo (TQ)	24s	48s	72s
GI50	22,44	19,48	21,32
TGI	>50	36,32	34,70
LC50	>50	>50	49,64

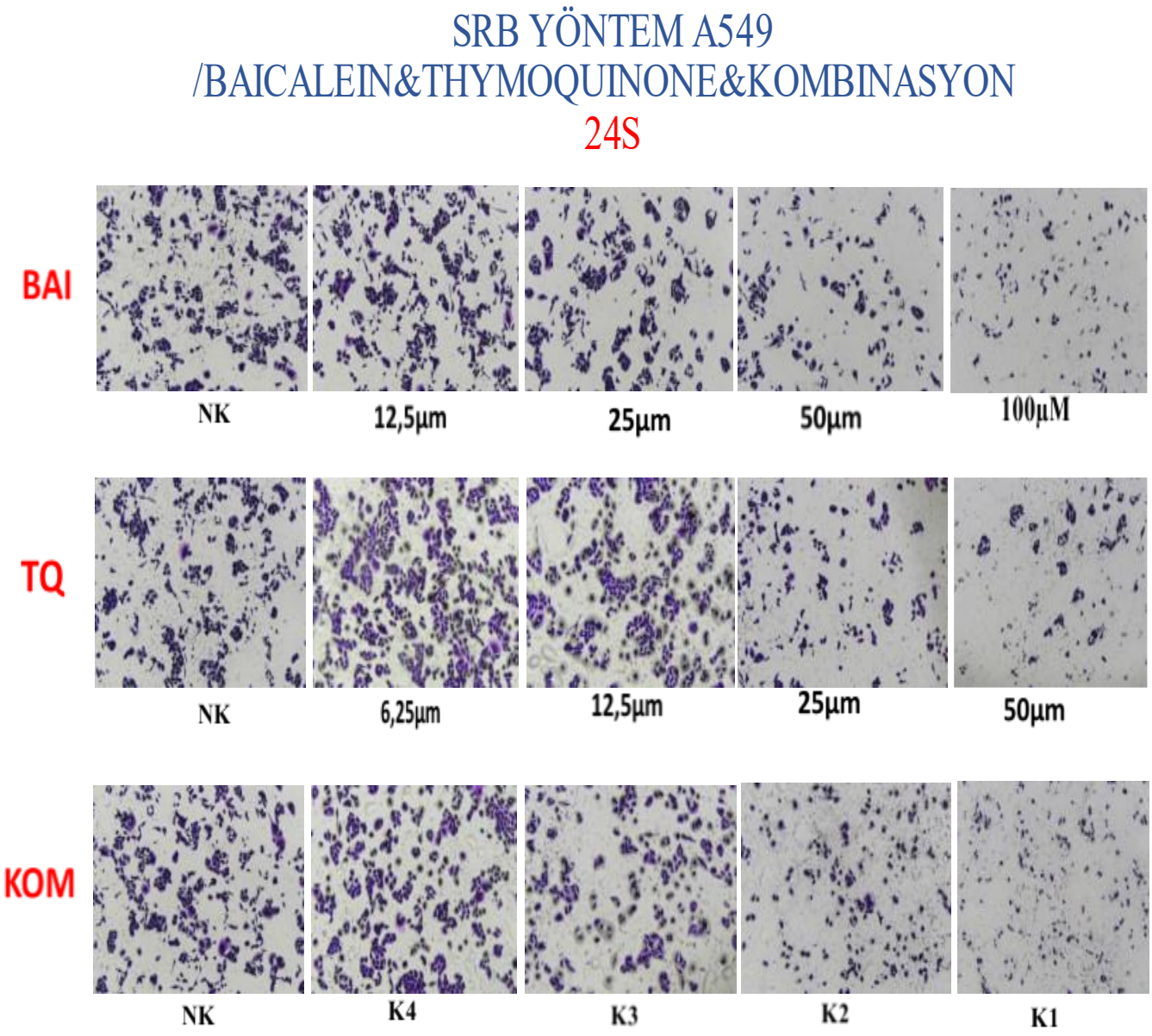
Beas-2b Timo(TQ)	24s	48s	72s
GI50	36,40	30,66	30,92
TGI	>50	39,93	39,89
LC50	>50	49,20	48,86

3.1.3. Kombinasyon çalışmaları

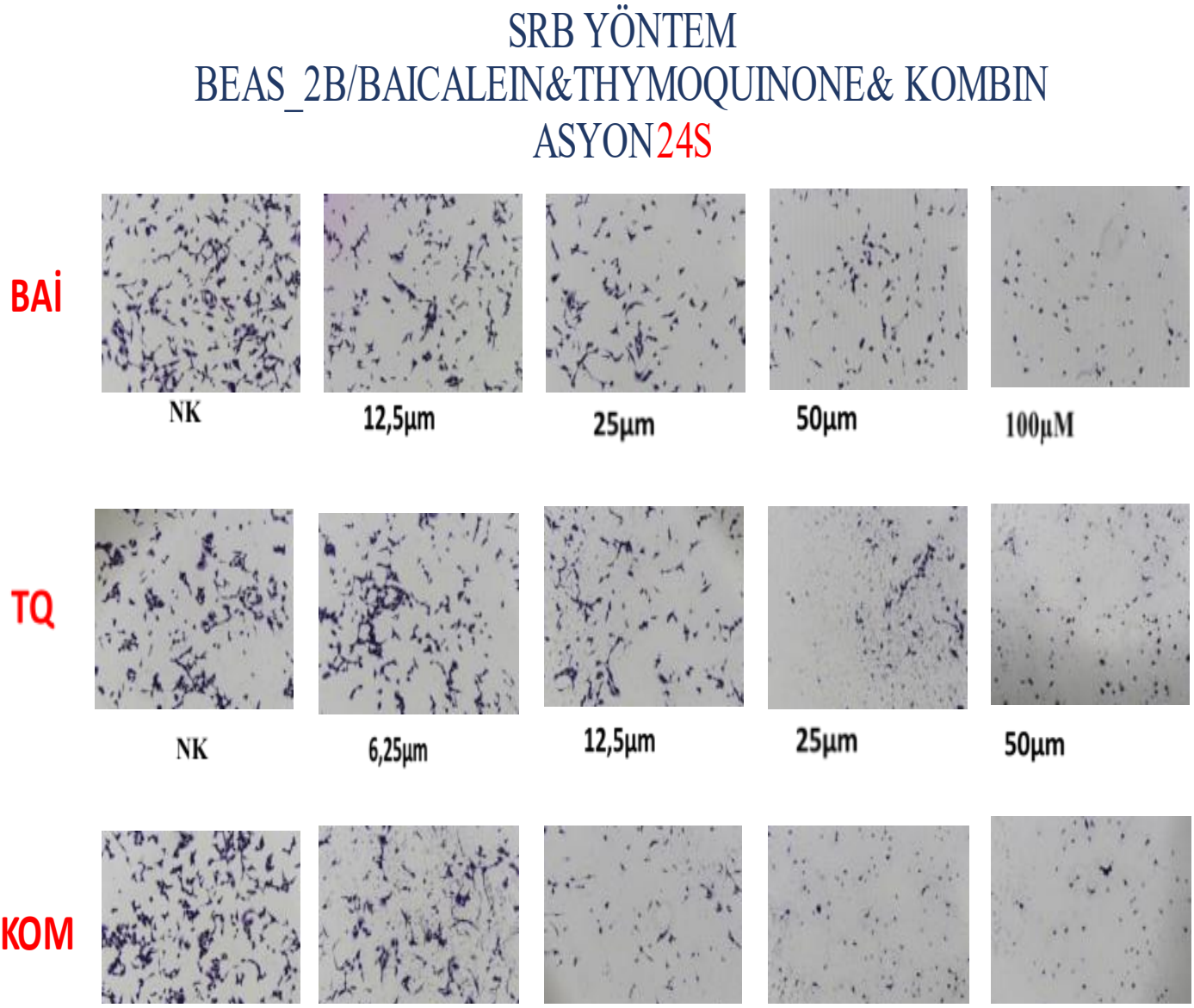
İlgili doz belirledikten sonra A549 ve Beas-2b için Bai bileşeni farklı konsantrasyonlar (12,5-100 µM) ve Timokinon bileşiği farklı konsantrasyonlar (6,25-50 µM) ve kombinasyonda etkili dozu (100+50 µM) belirlemek adına; başlatarak dört doz azaltıldı (12,5+6,25 µM) ve tamamlandı. İlgili dozlar uygulandıktan sonra 24, 48, ve 72 saatlerde SRB canlılık testi uygulandı. Bu analiz sonucunda hem tekli uygulanmış bileşikler hem de kombinasyonda her iki hücre hattında doz ve zamana bağlı olarak ters orantılı bir şekilde hücrelerin canlılık yüzdesinin istatistiksel olarak azalmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu deneyde söz konusu akciğer hücre hatlarında %50 canlılık (IC50) ve %10 canlılık (IC90)'ı gösteren dozun belirlenmesi amaçlandı. Bu deneylerin sonucunda kombinasyon etkisine göre için IC90'a en yakın doz (50µM BAİ + 25µM TQ) ve IC50'ye en yakın doz (25µM BAİ + 12.5µM TQ ve 12.5 BAİ +6.25 TQ) olarak seçildi ve ileri analizler bunlar baz alınarak gerçekleştirildi. Belirlenen tedavi dozu kombinasyon uygulandıktan sonra elde edilen veriler kombinasyon indeksi (CI;Combination index) değerleri, Calcusyn version 2.1 (Biosoft,UK) yazılım kulanılarak Chou-Talay

metoduna göre hesaplandı ve buna göre A549'da Beas-2b ile kıyasla daha sinerji ve aditif etki gösterdiği saptanmıştır.

A

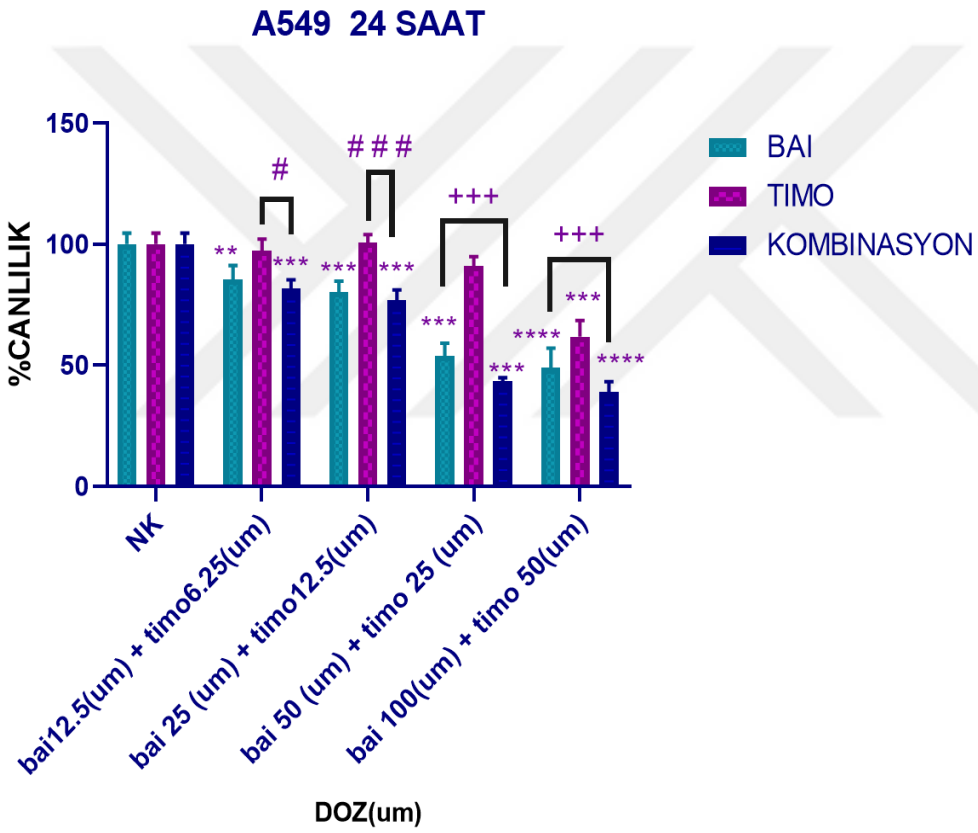


B

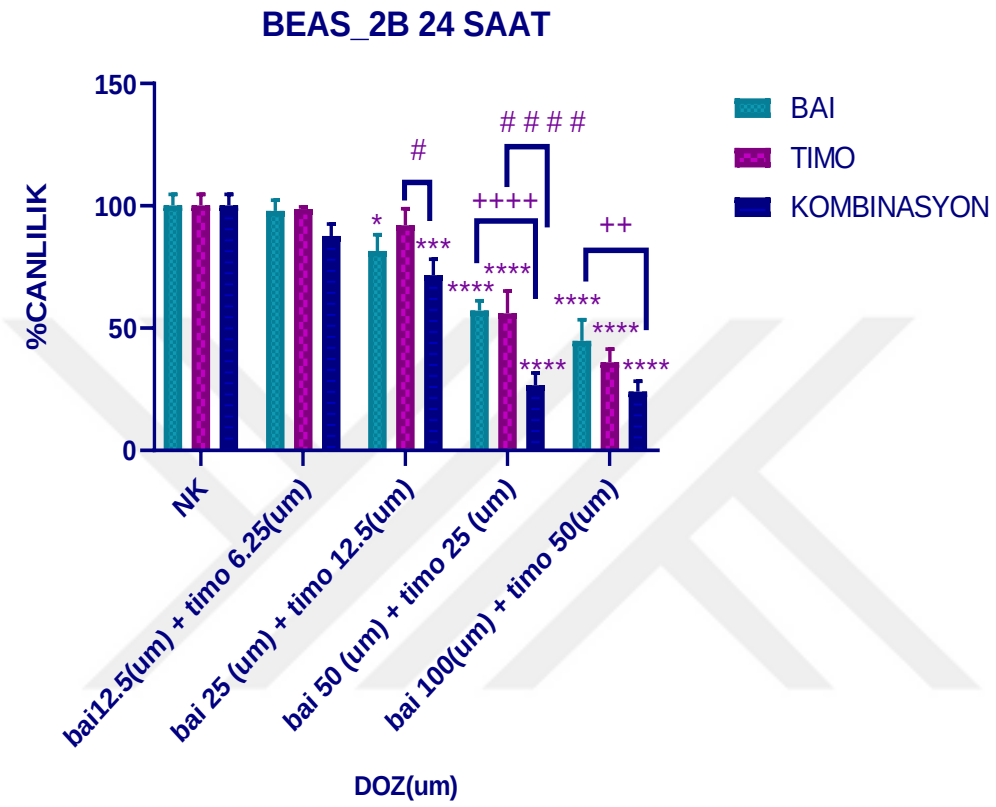


Şekil 3. 3. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı (B) Timokinon ve Baicalein farklı konsantrasyonlarında uygulanarak 24saat inkübe edildi ve sonrasında SRB metodu gerçekleştirildi. SRB boyalı kontrast mikroskobu (4X) görüntülenerek doza bağlı olarak ters orantılı azalma gösterdiği saptandı.

A


A549 24 SAAT
%CANLILIK
150
100
50
0
BAI
TIMO
KOMBINASYON
NK
bai12.5(um) + timo6.25(um)
bai 25 (um) + timo12.5(um)
bai 50 (um) + timo 25 (um)
bai 100(um) + timo 50(um)
DOZ(um)

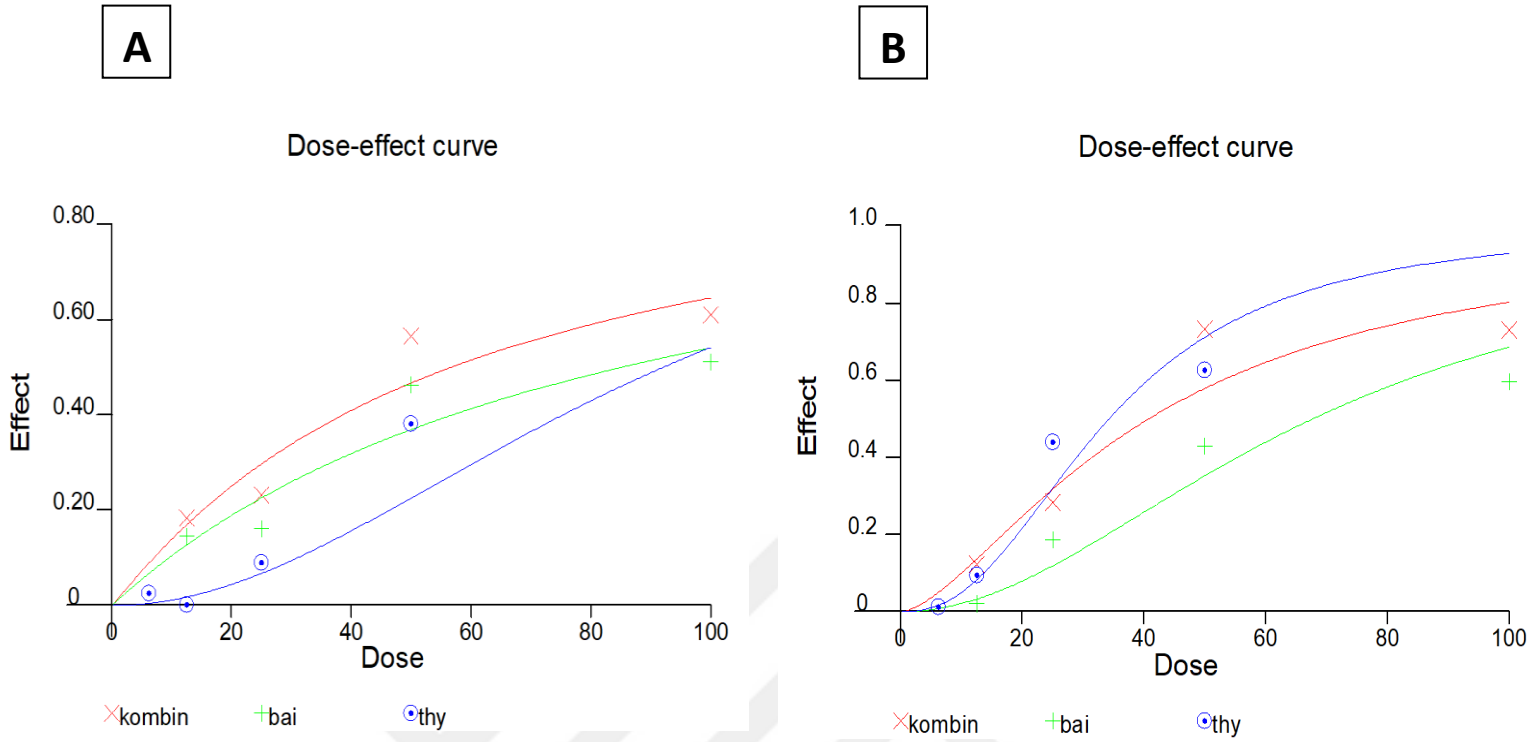
B



Şekil 3. 4. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı (B) Bicalein ve Timokinon farklı konsantrasyonlarda uygulanarak 24 saat sonrasında SRB canlılık metodu gerçekleştirilerek, doza bağlı olarak ters orantılı canlılığın azaldığı tespit edildi. Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (:*p<0,05; *:* p<0,01; ***:p<0,001), kombinasyonun bai'a göre (+:p<0,05; ++:p<0.01; +++:p<0.001) ve kombinasyonun Timo'ya göre (#:p<0,05 ##:p<0,01; ###; p<0.001) karşılaştırılığında istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak hesaplandı.

Tablo 3. 3. A549 ve Beas-2B hücrelerinde uygulanan BAİ ve TİMO 24s tedavi sonrası IC50 ve IC90 değerleri

DOZLAR		IC50			IC90		
TEDAVİLER		Bai(µM)	Timo(µM)	KOM(µM+ µM)	Bai(µM)	Timo(µM)	KOM(µM+ µM)
24s	A549	88,59	>50	45,18 + 22,59	>100	>50	>100+>50
	Beas-2B	71,36	33,15	37,05 + 18,52	>100	>50	>100+>50



Şekil 3. 5. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B (B) için 24 saat tedavi uygulandıktan sonra CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazalımı kuşşanşlarak Chou-Talalay metoduna göre calcusyn grafikleri çizildi.

Tablo 3. 4. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B hücre hattı (B) için 24 saat tedavi uyguladıktan sonra Kombinasyon indeksi (CI; combination index) değerleri, CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazılımı kullanılarak Chou-Talalay metoduna göre hesaplandı.

A

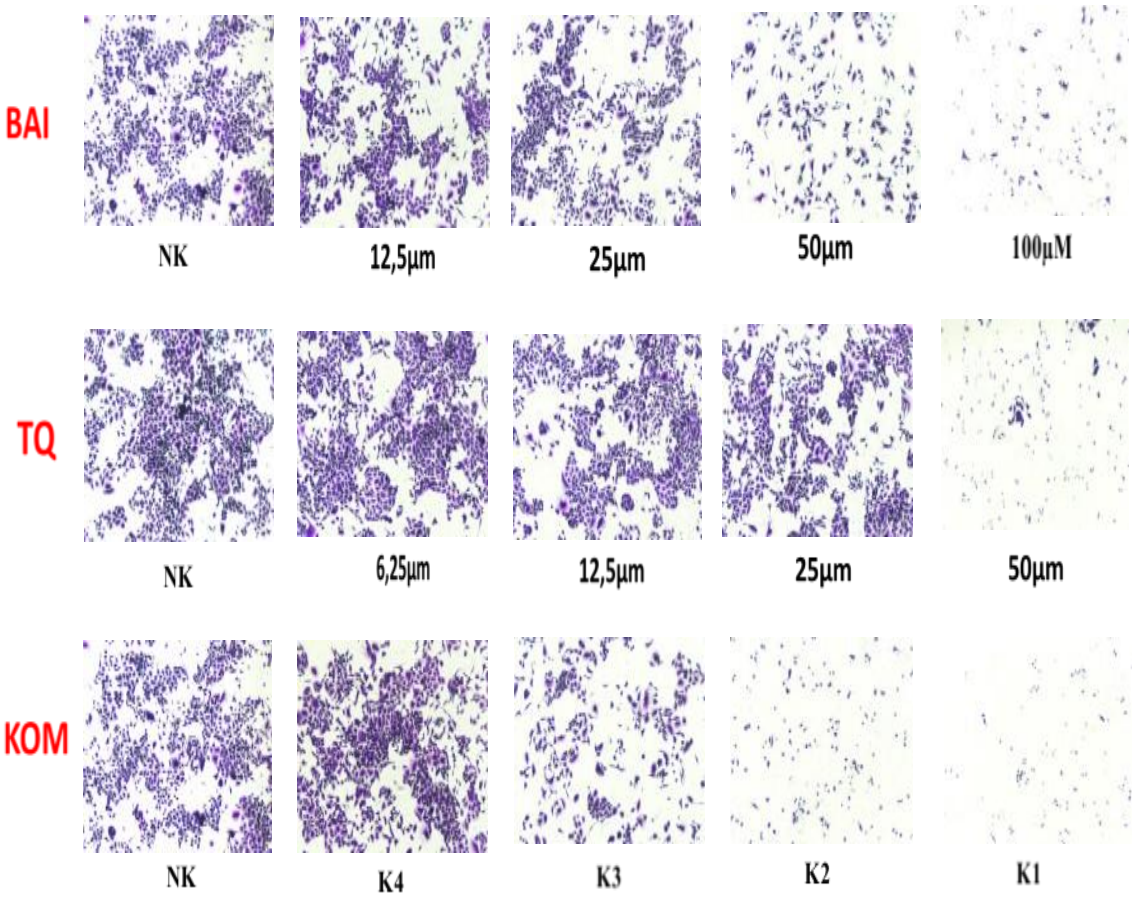
Kombinasyon(A-549)24S	CI değerleri	sembol	Tanımlanan Etki
100µM BAİ + 50µM TQ	1.185	-	Hafif antagonistik
50µM BAİ + 25µM TQ	0.692	+++	sinerjistik
25µM BAİ + 12.5µM TQ	1.216	-	Hafif derecede antagonestik
12.5µM BAİ + 6.25µM TQ	0.792	+++	Orta derecede sinerjistik

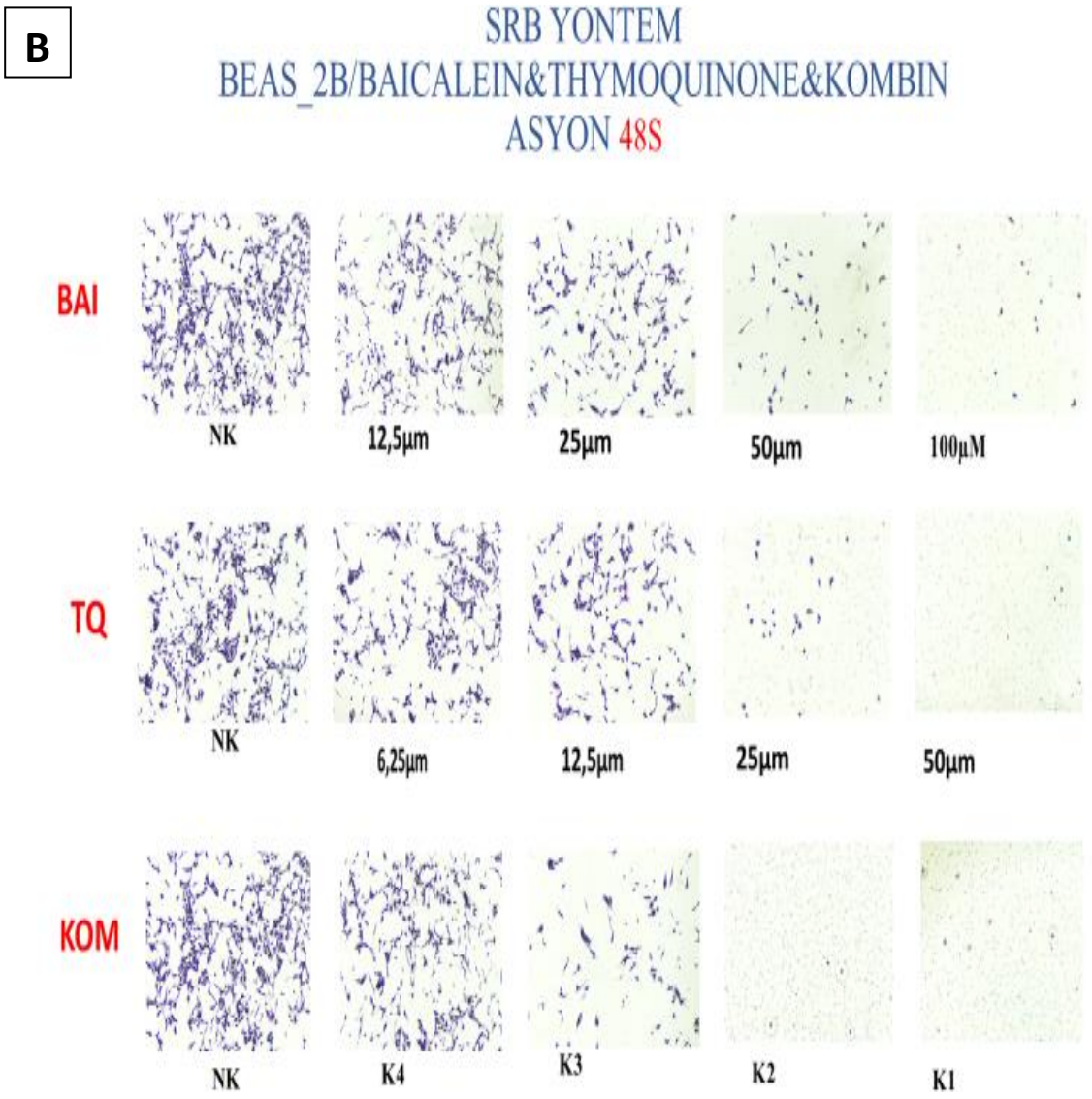
B

Kombinasyon(Beas-2B) 24S	CI değerleri	sembol	Tanımlanan Etki
100µM BAİ + 50µM TQ	1.863	- - -	Antagonistik
50µM BAİ + 25µM TQ	0.923	±	Yaklaşık aditif
25µM BAİ + 12.5µM TQ	1.125	-	Hafif derecede antagonestik
12.5µM BAİ + 6.25µM TQ	0.907	±	Yaklaşık aditif

A

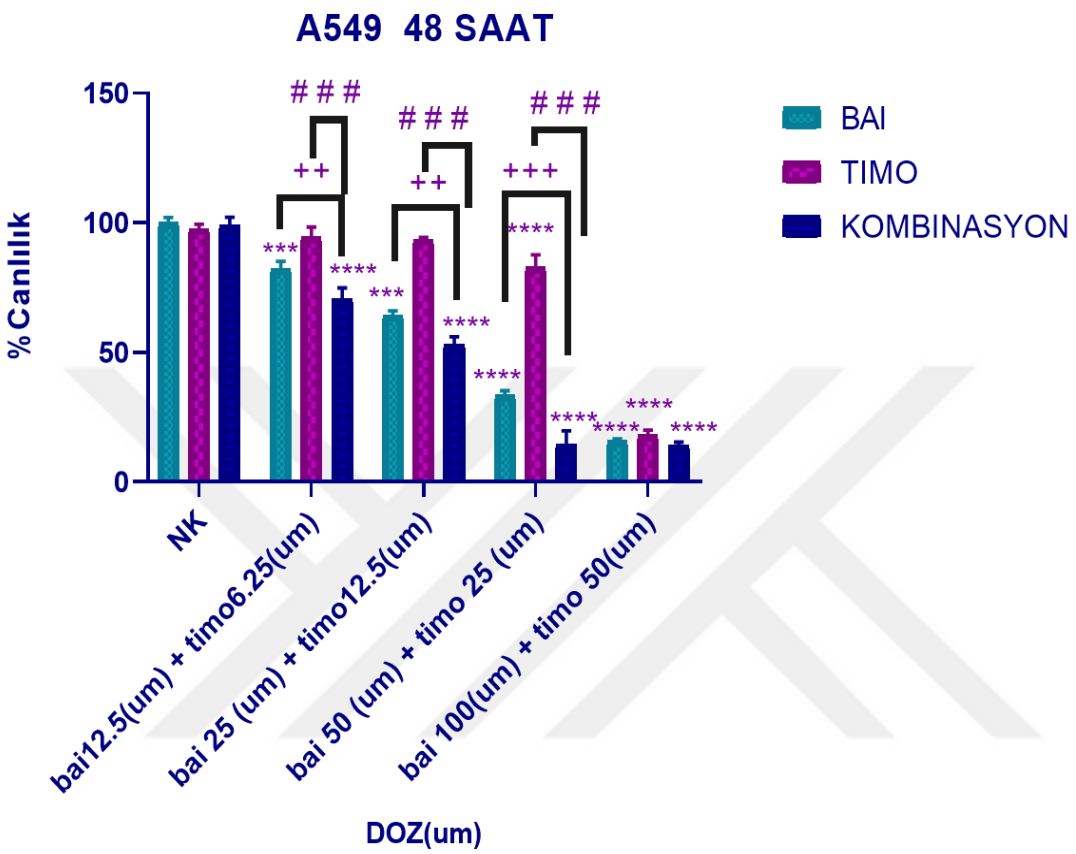
SRB YÖNTEM A549
/BAICALEIN&THYMOQUINONE&KOMBINASYON
48S

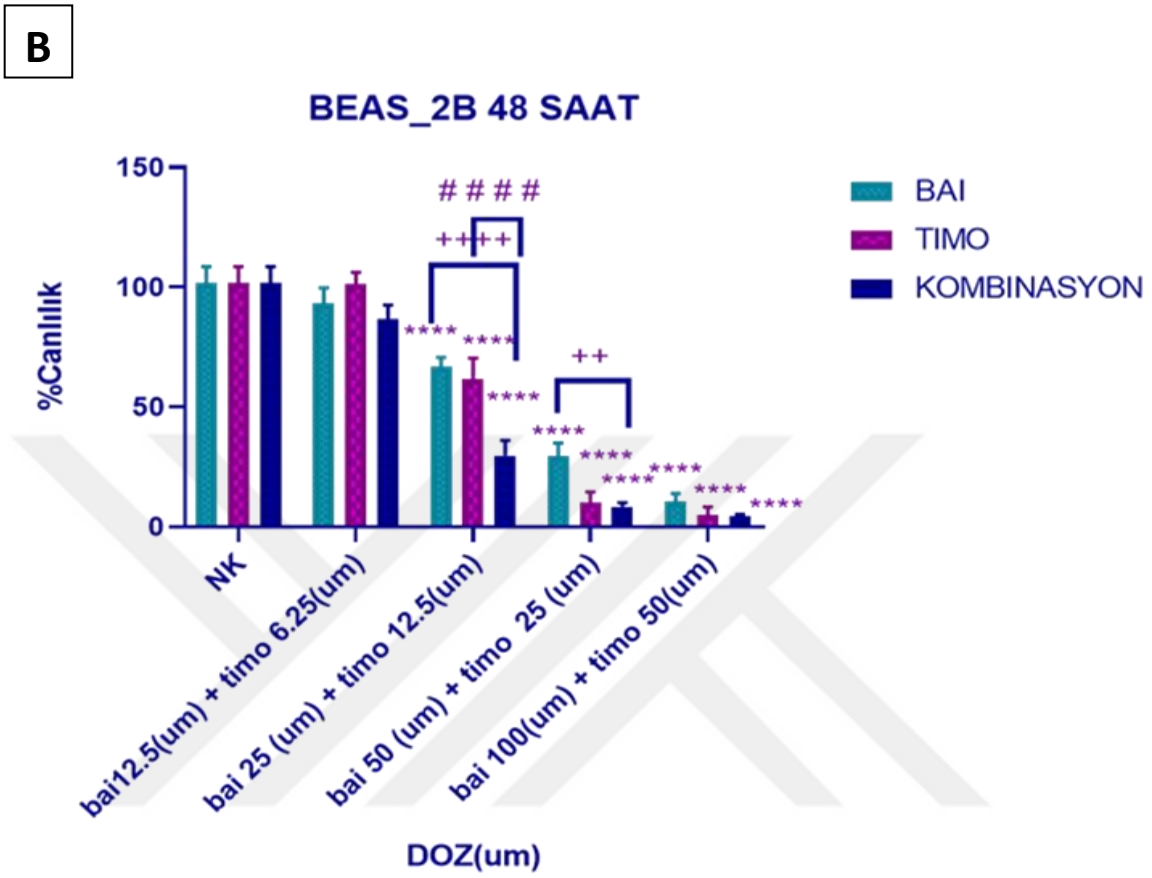




Şekil 3. 6. . A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B hücre hattı(B) Baicalein ve Timokinon farklı konsanrasyonlarda uygulanarak 48saat inkübe edileldi ve sonrasında SRB metodu gerçekleştirildi. SRB boyalı faz kontrast mikroskobu (4X) görüntülenerek doza bağli olarak ters orantılı azalma gösterdiği saptandı.

A

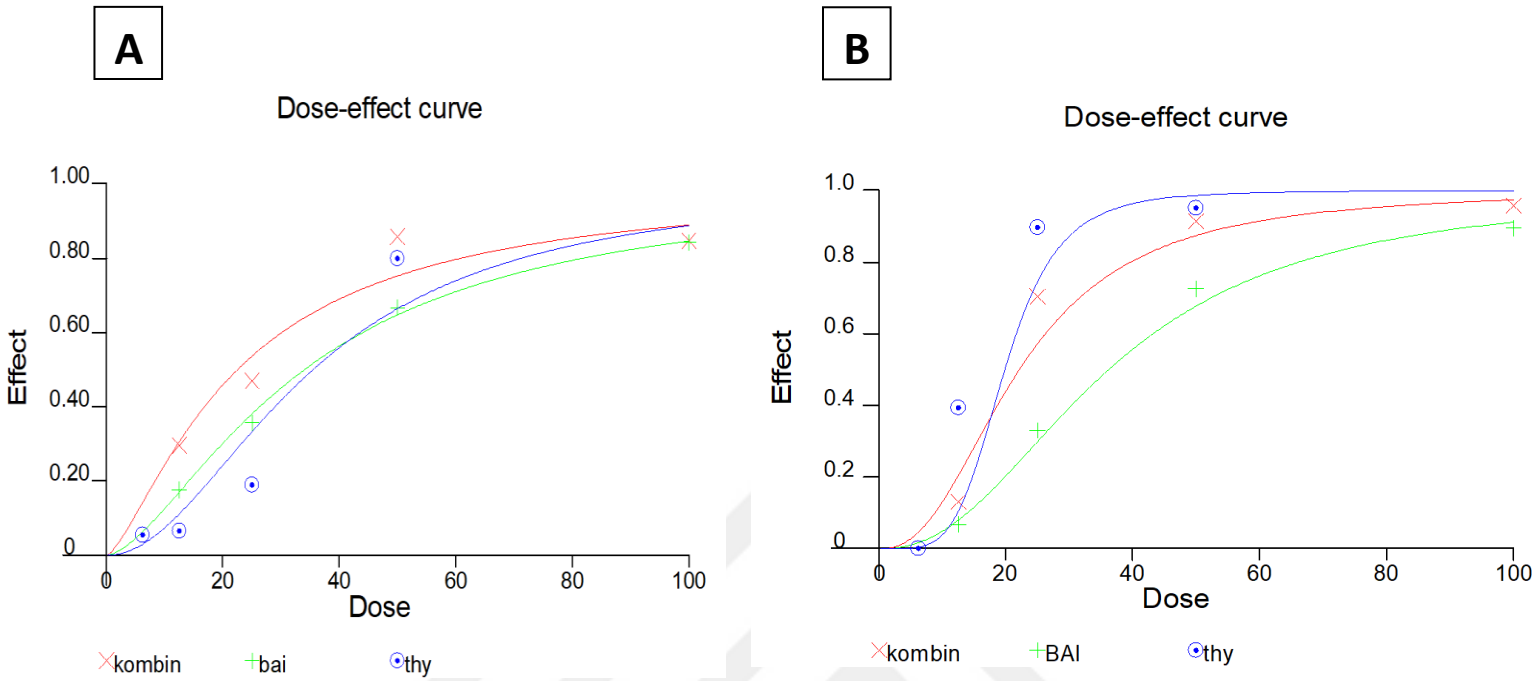

A549 48 SAAT
150
100
50
0
% Canlılık
###
###
###
++
++
+++
***
****
***
****
****
****
****
****
****
BAI
TIMO
KOMBINASYON
NK
bai12.5(um) + timo6.25(um)
bai 25 (um) + timo12.5(um)
bai 50 (um) + timo 25 (um)
bai 100(um) + timo 50(um)
DOZ(um)



Şekil 3. 7 . A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı (B) Bicalein ve Timokinon farklı konsantrasyonlarda uygulanarak 48 saat sonrasında SRB canlılık metodu gerçekleştirilerek, doza bağlı olarak ters orantılı canlılığın azaldığı tespit edildi. Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (:*p<0,05; *:* p<0,01; ***:p<0,001), kombinasyonun bai'a göre (+:p<0,05; ++:p<0.01; +++:p<0.001) ve kombinasyonun Timo'ya göre (#:p<0,05 ##:p<0,01; ###; p<0.001) karşılaştırılığında istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak hesaplandı.

Tablo 3. 5. A549 ve Beas-2B hücrelerinde uygulanan BAİ ve TİMO 48s tedavi sonrası IC50 ve IC90 değerleri.

DOZLAR		IC50			IC90		
TEDAVİLER		Bai(µM)	Timo(µM)	KOM(µM+ µM)	Bai(µM)	Timo(µM)	KOM(µM+ µM)
48s	A549	36,54	37,72	26,91 + 13,45	>100	>50	>100+>50
	Beas-2B	35,70	15,12	20,55 + 48,18	>100	25,88	8,18 + 24,09



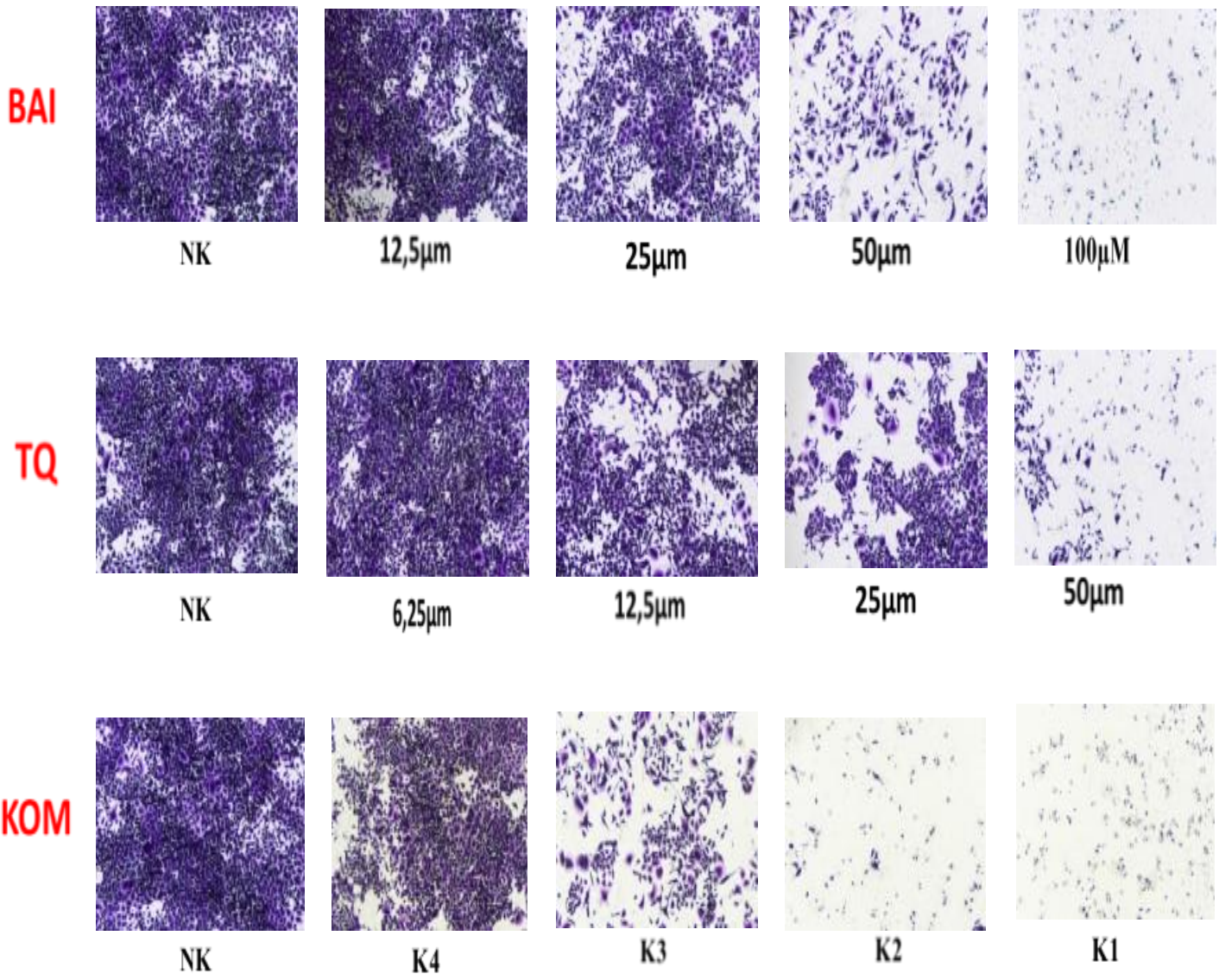
Şekil 3. 8. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B (B) için 48 saat tedavi uygulandıktan sonra CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazalımı kuşşanşlarak Chou-Talalay metoduna göre calcusyn grafikleri çizildi.

Tablo 3. 6. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B hücre hattı (B) için 48 saat tedavi uyguladıktan sonra Kombinasyon indeksi değerleri, CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazılımı kullanılarak Chou-Talalay metoduna göre hesaplandı.

	Kombinasyon(A-549) 48S	CI değerleri	sembol	Tanımlanan Etki
A	100µM BAİ + 50µM TQ	1.588	- - -	Antagonistik
	50µM BAİ + 25µM TQ	0.758	+ +	Orta derecede sinerjistik
	25µM BAİ + 12.5µM TQ	1.168	-	Hafif derecede antagonestik
	12.5µM BAİ + 6.25µM TQ	0.909	±	Yaklaşık aditif
	Kombinasyon(Beas-2b) 48S	**CI değerleri**	**sembol**	**Tanımlanan Etki**
B	100µM BAİ + 50µM TQ	2.009	- - -	Antagonistik
	50µM BAİ + 25µM TQ	1.247	-	Hafif derecede antagonestik
	25µM BAİ + 12.5µM TQ	0.998	±	Yaklaşık aditif
	12.5µM BAİ + 6.25µM TQ	1.256	-	Hafif derecede antagonestik

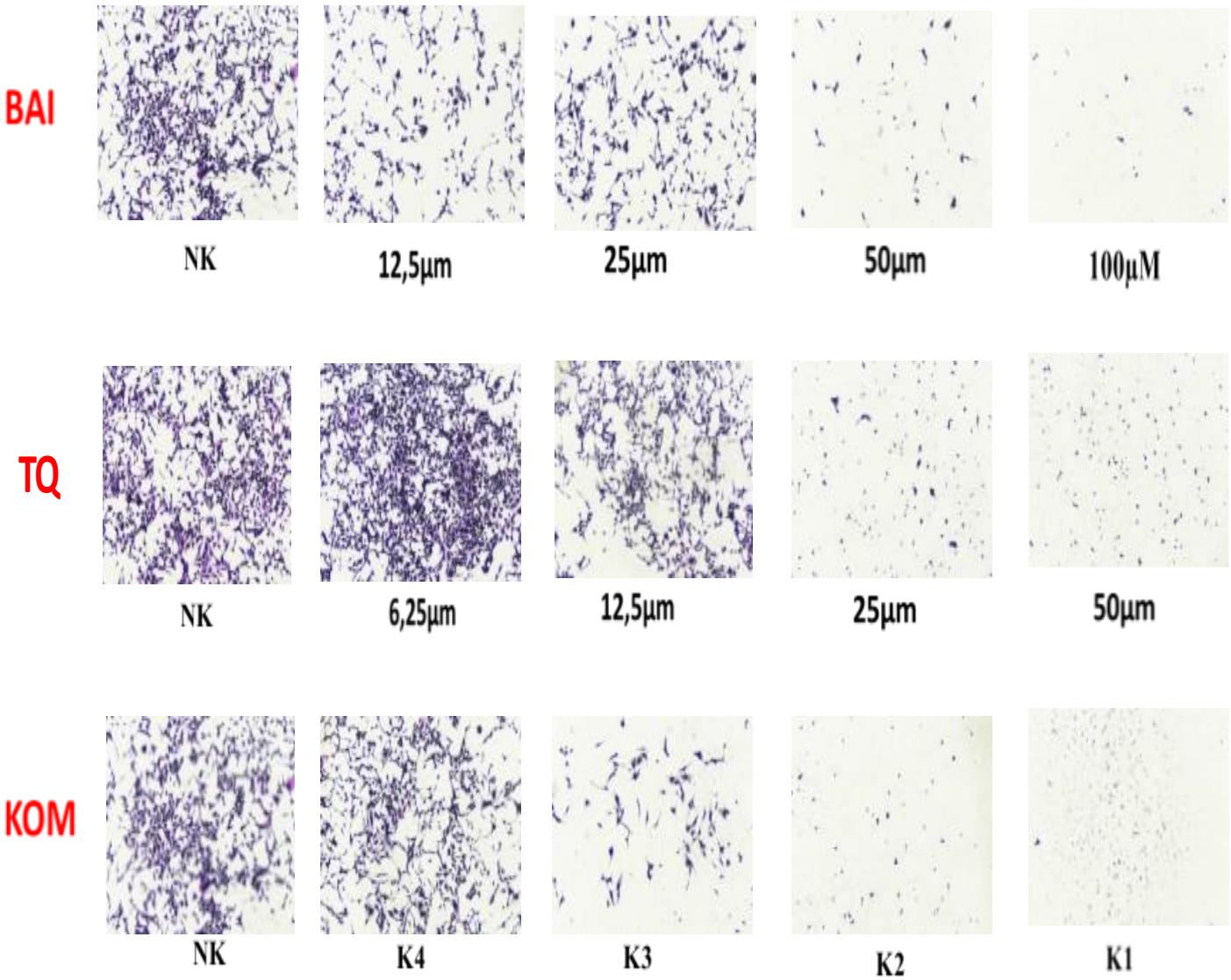
A

SRB YÖNTEM A549 /BAICALEIN&THYMOQUINONE&KOMBINASYON 72S



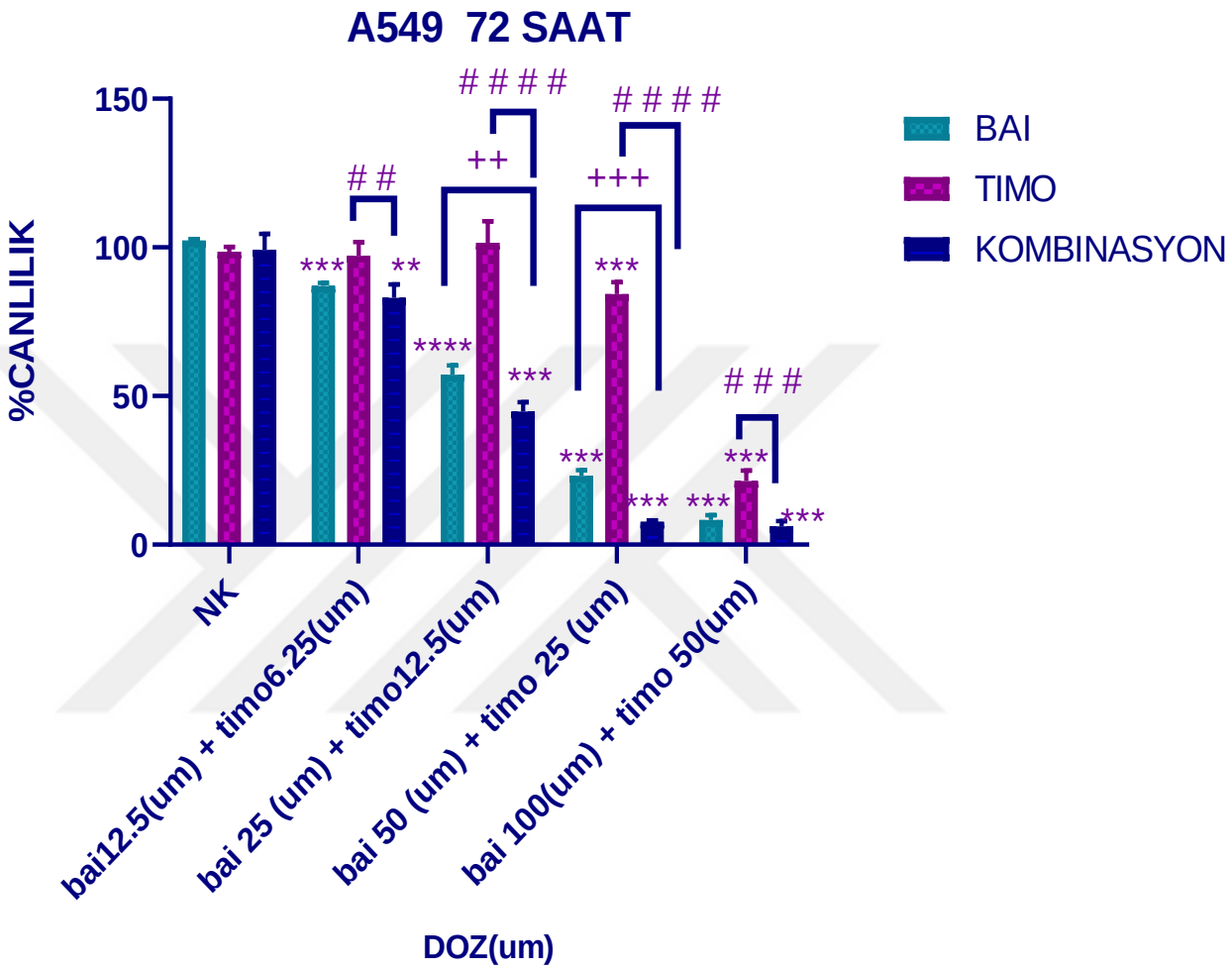
B

SRB YÖNTEM
BEAS_2B/BAICALEIN&THYMOQUINONE&KOMBIN
ASYON 72S

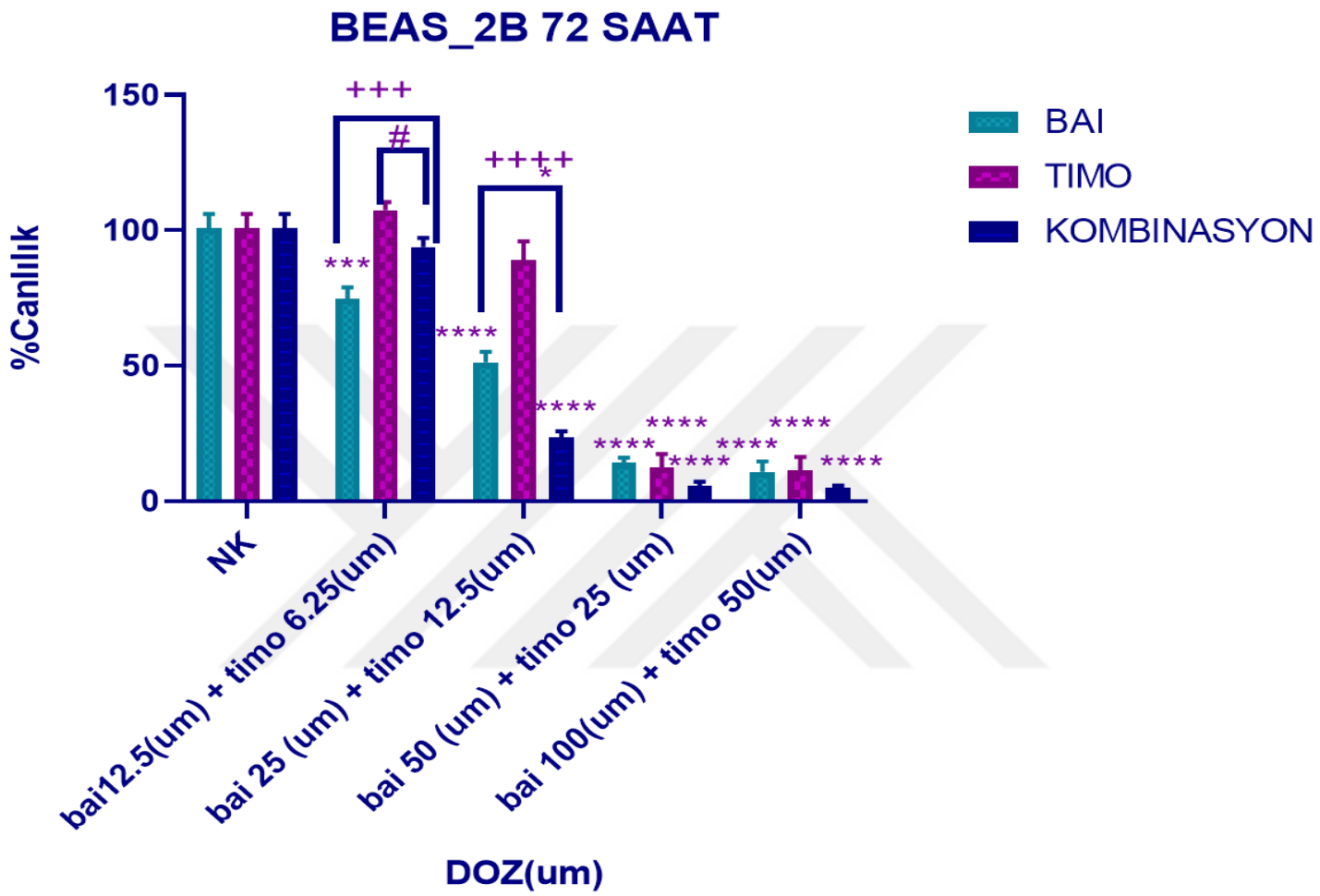


Şekil 3. 9. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B hücre hattı(B) Baicalein ve Timokinon farklı konsanrasyonlarda uygulanarak 72 saat inkübe edileldi ve sonrasında SRB metodu gerçekleştirildi. SRB boyalı faz kontrast mikroskobu (4X) görüntülenerek doza bağli olarak ters orantılı azalma gösterdiği saptandı.

A


A549 72 SAAT
%CANLILIK
150
100
50
0
BAI
TIMO
KOMBINASYON
NK
bai12.5(um) + timo6.25(um)
bai 25 (um) + timo12.5(um)
bai 50 (um) + timo 25 (um)
bai 100(um) + timo 50(um)
DOZ(um)

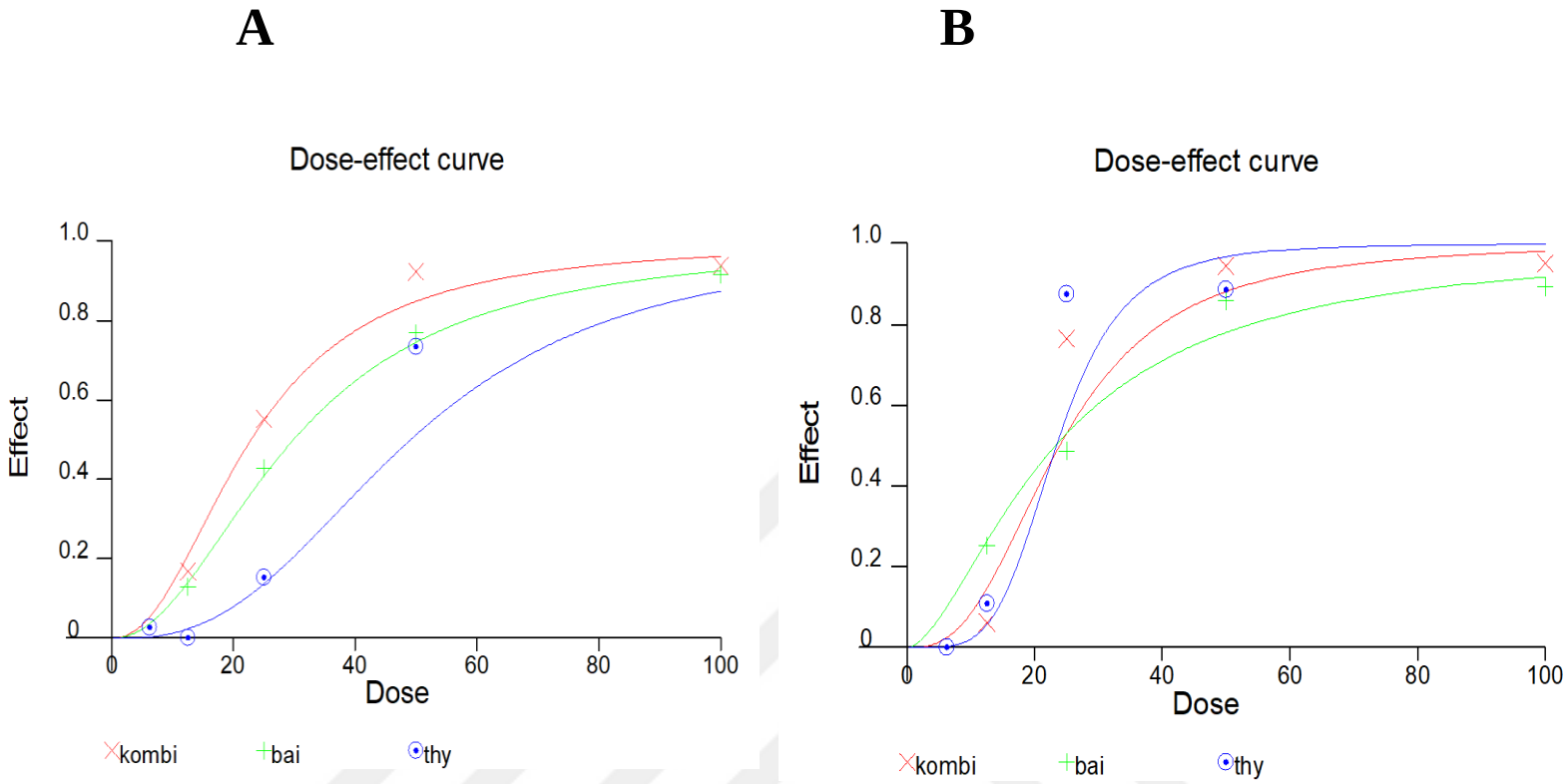
B



Şekil 3. 10. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2b hücre hattı (B) Bicalein ve Timokinon farklı konsantrasyonlarda uygulanarak 72 saat sonrasında SRB canlılık metodu gerçekleştirilerek, doza bağlı olarak ters orantılı canlılığın azaldığı tespit edildi. Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (:*p<0,05; *:* p<0,01; ***:p<0,001), kombinasyonun bai'a göre (+:p<0,05; ++:p<0.01; +++:p<0.001) ve kombinasyonun Timo'ya göre (#:p<0,05 ##:p<0,01; ###; p<0.001) karşılaştırılığında istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak hesaplandı.

Tablo 3. 7. A549 ve Beas-2B hücrelerinde uygulanan BAI ve TIMO 72s tedavi sonrası IC50 ve IC90 değerleri.

DOZLAR		IC50			IC90		
TEDAVİLER		Bai(µM)	Timo(µM)	KOM(µM+ µM)	Bai(µM)	Timo(µM)	KOM(µM+ µM)
72s	A549	30,29	39,91	23,28 + 11,36	94,29	>50	48,44 + 24,22
	Beas-2B	25,92	18,87	20,30 + 10,13	>100	>50	43,91 + 21,95



Şekil 3. 11. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B (B) için 72 saat tedavi uygulandıktan sonra CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazalımı kuşşanşlarak Chou-Talalay metoduna göre calcusyn grafikleri çizildi.

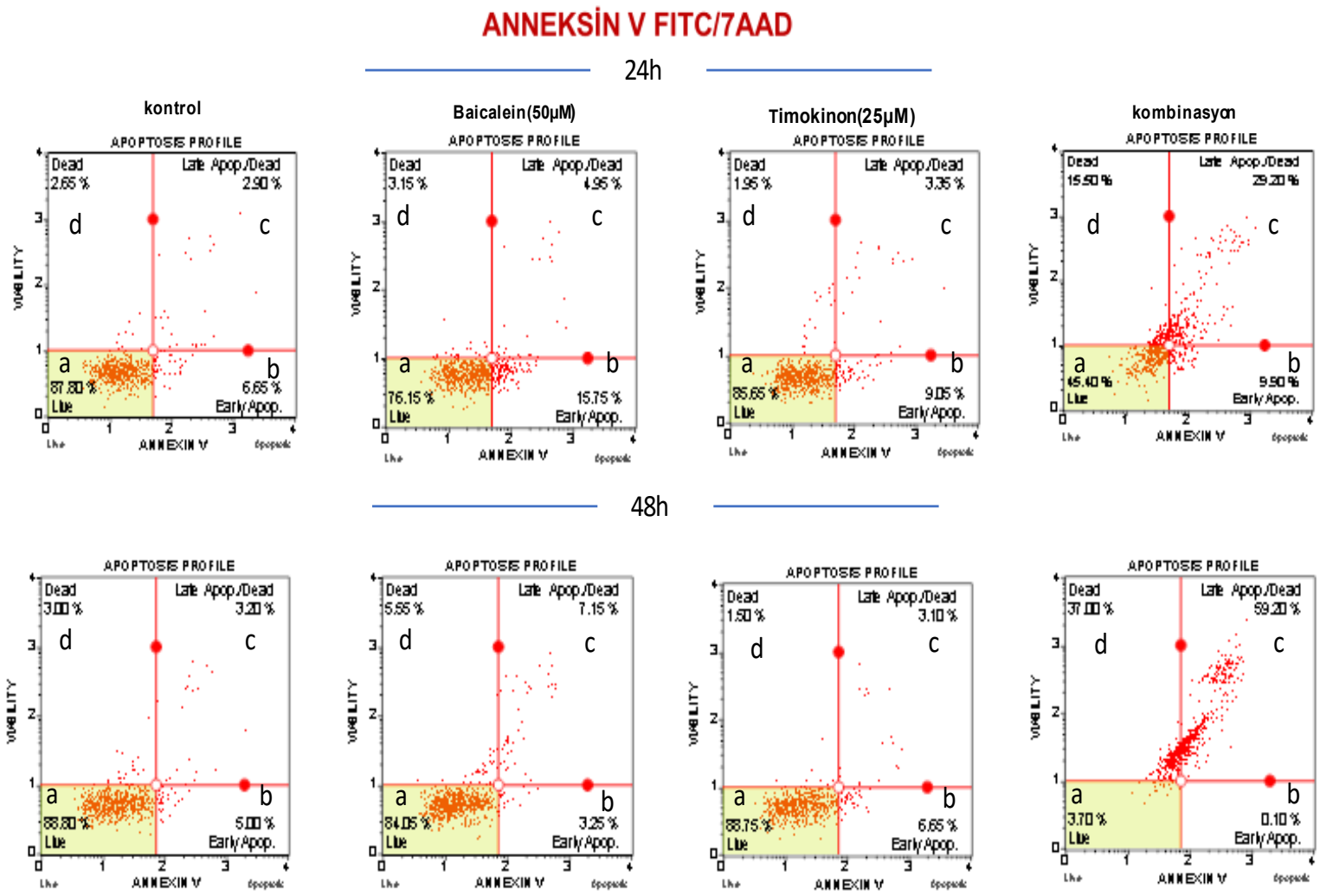
Tablo 3. 8. A549 hücre hattı (A) ve Beas-2B hücre hattı (B) için 72 saat tedavi uyguladıktan sonra Kombinasyon indeksi (CI; combination index) değerleri, CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazılımı kullanılarak Chou-Talalay metoduna göre hesaplandı.

	Kombinasyon(A-549) 72S	CI değerleri	sembol	Tanımlanan Etki
A	100μM BAİ + 50μM TQ	1.274	-	Hafif derecede antagonestik
	50μM BAİ + 25μM TQ	0.712	+ +	Orta derecede sinerjistik
	25μM BAİ + 12.5μM TQ	0.993	±	Yaklaşık aditif
	12.5μM BAİ + 6.25μM TQ	1.128	-	Hafif derecede antagonestik
	Kombinasyon(Beas-2b) 72S	**CI değerleri**	**sembol**	**Tanımlanan Etki**
B	100μM BAİ + 50μM TQ	1.798	- - -	Antagonistik
	50μM BAİ + 25μM TQ	0.956	±	Yaklaşık aditif
	25μM BAİ + 12.5μM TQ	0.939	±	Yaklaşık aditif
	12.5μM BAİ + 6.25μM TQ	3.314	- - -	Antagonistik

3.2. Akım Sitometrisi Bulguları

3.2.1. Anneksin V Testi

Baicalein ve Timokinon bileşikler, ve bunların kombinasyonları, A549 hücre hattında sebep olduğu apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde Anneksin-V testi ile araştırıldığında bulunan sonuçlar şekil 3.12'de gösterilmiştir. AnneksinV-FITC ve 7-AAD düşük olan bölge sağlıklı hücreleri (a), Anneksin V-FITC yüksek ve 7-AAD düşük olan bölge erken apoptotik hücreleri (b), Anneksin V-FITC ve 7-AAD yüksek olan bölge geç apoptotik hücreleri (c) ve Anneksin FITC düşük ve 7-AAD yüksek olan bölge nekrotik hücreleri (d) göstermektedir. A549 hücre hattında, Baicalein (50µM) ve Timokinon (25µM) dozların kombinasyonlarında, zamana bağlı olarak apoptozu indüklediği tespit edilmiştir, iki bileşenin kombinasyonun uygulaması sonrna, A549 hücrelerinde geç apoptozu ve nekrozu indüklediği görülmektedir. A549 hücrelerinde kombinasyon ile bileşiklerin tek başına yarattığı etki kıyasladığında, kombinasyonun nekrotik ölümü ve geç apoptozu indüklediği görünmektedir.



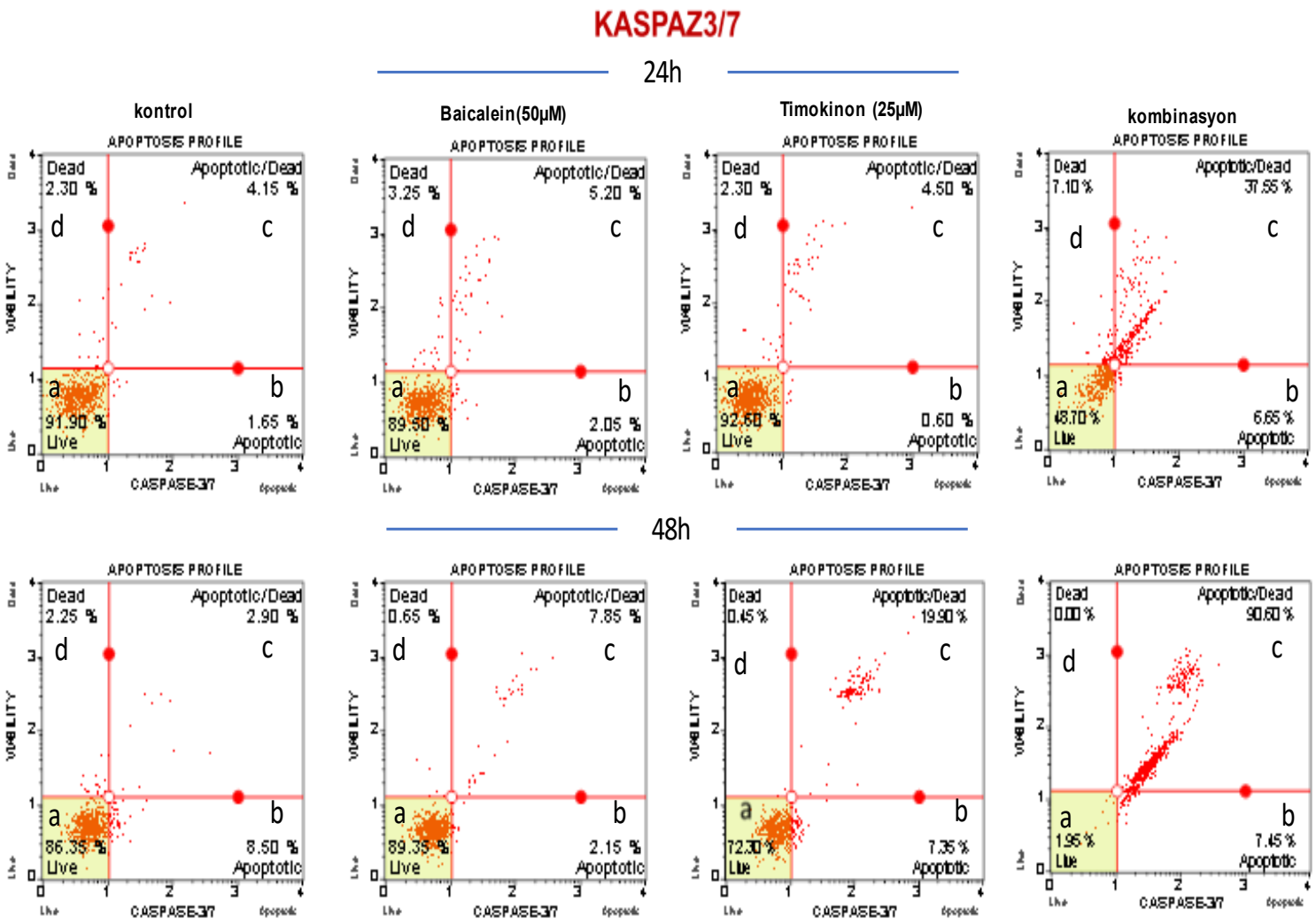
Şekil 3. 12. Baicalein (50µM), timokinon (25µM) ve bu iki dozun kombinasyonu (Bai 50µM+Timo 25µM), A549(insan akciğer kanser hücrelerinde), Anneksin-V değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 ve 48 saatlık histogramları (a: sağlıklı hücreler, b:erken apoptotik hücreler, c: geç apoptotik hücreler, d: nekrotik hücreler).

Tablo 3.9. Baicalein ve Timokinon ve bunların kombinasyonların bileşiğinin 24 ve 48 saat boyunca uygulaması sonrası A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde anneksin-V değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi.

Hücre	zaman	dozlar	Canlı popülasyon(a)	Erken apoptotik popülasyon (b)	Geç apoptotik popülasyon (c)	Nekrotik popülasyon (d)
A549	24 SAAT	NK	% 87,80	% 6,65	% 2,90	% 2,65
		Bai (50µM)	% 76,15	% 15,75	%4,95	%3,15
		Timo(25µM)	% 85,66	% 9,05	% 3,36	% 1,96
		Kombin (Bai+timo)	% 45,40	% 9,90	% 29,30	% 15,50
	48 SAAT	NK	% 88,80	% 5,00	% 3,20	% 3,00
		Bai (50µM)	% 84,05	% 3,25	% 7,15	% 5,55
		Timo(25µM)	% 88,75	% 6,65	% 3,10	% 1,50
		Kombin (Bai+timo)	% 3,70	% 0,10	% 59,20	% 37,00

3.2.2.Kaspaz 3/7 Testi

Yapılan SRB ve Anneksin-V deneylerin souçları Baicalein ve Timokinon bileşiğinin ve onların kombinasyonlarının A549 hücre hattında 24 ve 48 saat apoptoza sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu sebepten apoptoz yolağının efektör kaspazlarından, kaspaz 3/7 değerlenirilmesi sonucunda elde edilen veriler Şekil 3.13, Tablo 3.10'da gösterilmiştir. Kaspaz 3/7 ve 7-AAD düşük olan bölge sağlıklı hücreleri (a), kaspaz 3/7 akivasyonu yüksek ve 7-AAD düşük olan bölge erken apoptotik hücreleri (b), kaspaz 3/7 aktivasyonu ve 7-AAD yüksek olan bölge geç apoptotik hücreleri (c) ve kaspaz 3/7 aktivasyonu düşük ve 7-AAD yüksek olan bölge nekrotik hücreleri (d) göstermektedir. Baicalein ve Timokinon bileşenler ve kombinasyonlarıyla A549 hücrelerinde uyumlu olarak zamana bağlı bir şekilde kaspaz 3/7 aktivasyon artış görülmektedir. Ayrıca iki bileşiğin kombinasyonu zamana bağlı olarak bileşiklerin tek başına yarattığı etkiye kıyasla geç apoptotik popülasyonda artış göstermiştir.



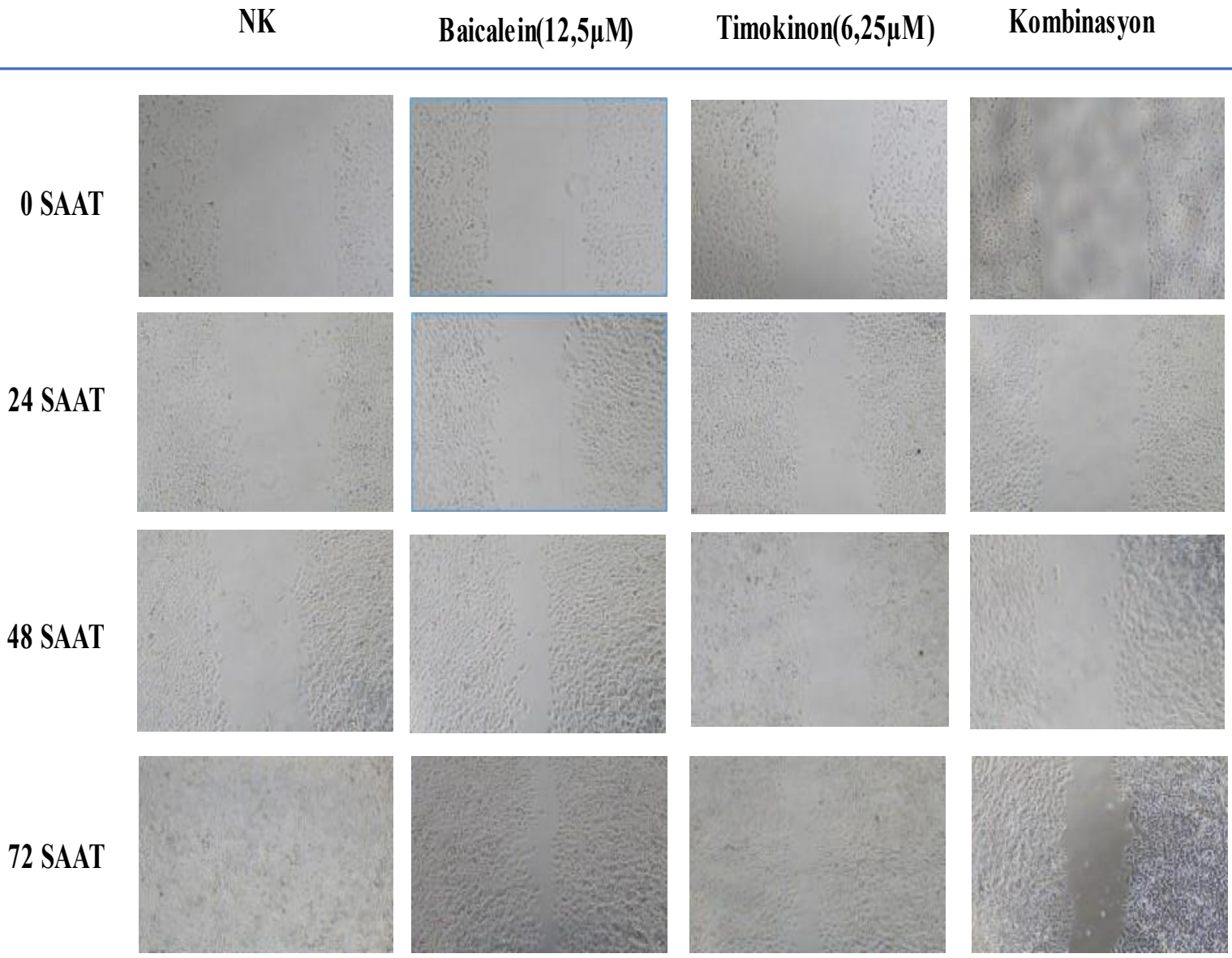
Şekil 3. 13. Baicalein (50µM), Timokinon (25µM) ve bu iki dozun kombinasyonu(Bai 50µM+Timo 25µM), A549(insan akciğer kanser hücrelerinde), kaspaz 3/7 değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 24 ve 48 saatlık histogramları (a: sağlıklı hücreler, b: kaspaz 3/7 aktif olan erken apoptotik hücreler; c: kaspaz 3/7 aktif olan geç apoptotik hücreler; d: kaspaz 3/7 aktif olmayan nekrotik hücreler).

Tablo 3. 10. Baicalein ve Timokinon bileşiğinin ve bunların kombinasyonların 24 ve 48 saat boyunca uygulaması sonrası A549 insan akciğer kanseri hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesinden elde edilen verilen tabloda gösterilmesi.

Hücre	zaman	dozlar	Canlı popülasyon(a)	Erken apoptotik popülasyon (b)	Geç apoptotik popülasyon (c)	Nekrotik popülasyon (d)
A549	24 SAAT	NK	% 91,90	% 1,65	% 4,15	% 2,30
		Bai (50µM)	% 89,50	% 2,05	% 5,20	% 3,25
		Timo(25µM)	% 92,60	% 0,60	% 4,50	% 2,30
		Kombin (Bai+timo)	% 48,70	%6,65	% 37,55	% 7,10
	48 SAAT	NK	% 86,35	% 850	% 7,85	% 0,65
		Bai (50µM)	% 89,35	% 2,15	% 7,85	% 0,65
		Timo(25µM)	% 72,30	% 7.35	% 19,90	% 0,45
		Kombin (Bai+timo)	% 1,95	% 7,45	% 90,60	%0,00

3.3. Migrasyon Testi Bulguları

A549 hücre hattından Baicalein ve Timokinonun ve kombinasyon halinde uygulanmasının metastatik sürece olan etkisini değerlendirmek amacıyla migrasyon testi gerçekleştirildi. Kontrole göre kıyasladığında her iki ilacın da hem tekli uygulamasında hemde kombinasyon tedavisinde hücrelerin migrasyon yeteneklerini azalttığı gözlendi. Kombinasyon tedavisinin, bileşiklerin tek başlarına uygulanmasına kıyasla migrasyon yeteneklerini daha etkin olarak azalttığı görüldü. A549 akciğer kanser hücrelerinin tedavi sonrası migrasyon yeteneklerini değerlendirmek amacıyla, Baicalein 12,5µM ve Timokinon 6,25 µM dozlarının kombinasyonlarının, migrasyon testinde nasıl etki gösterdiği için 24, 48, 72 saatlerde görüntü alındı ve göreceli olarak tekli ilaçlar kontrole göre ve kombinasyon teklilere göre hücre migrasyon hızı daha da azalmış görünmektedir. Kombinasyon tedavisinin, tekli ajan uygulamalarına kıyasında da yara kapanması üzerine anlamlı azalmalar sergilediği belirlendi.



Şekil 3. 14. Baicalein (12,5µM), Timokinon (6,25µM) ve bu iki doz ilaçın kombinasyonıyla, A549 (insan akciğer kanser) hücre hattı üzerindeki uygulanan tedavi etkisinin 24, 48, 72 saatte yara iyileştirme testinde görüntüleri.

4.TARTIŞMA

Bu tezde A549 insan akciğer kanser hücre hattı ve Beas-2B sağlıklı akciğer hücre hattı, Baicalein (100-3.1µM), Timokinon (50-1.5µM) ve onların kombinasyonlarıyla sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonunda söz konusu olan bileşiklerin ve kombinasyon büyüme oranı (growth rate) hesaplamalara göre 24 saatta sitostatik; 48 ve 72 saatta sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Günümüzde kanser dünya çapında en ciddi ve ölümcü hastalıklardan biridir. Kanser hücrelerinin tedaviye direnç geliştirebilmesi ise onu daha da önemli bir sağlık sorunu haline getirmektedir. Hücre ölümünden kaçabilmeklerinin ve büyümelerini kontrol edebilmelerinin yanısıra immün sistemden de kaçabilmektedir (Mougiakakos et al., 2010).

Kanser tedavisinde kemotrapi ilaçları ve/veya hedefe yönelik ilaçlar kullanılmasına karşın hala istenilen düzeyde tedavi sonucu alınmamaktadır. Bunun iki temel sebebi vardır: Kanser hücrelerinin moleküler düzeyde birbirinden farklı olması ve ilaca direnç geliştirmesi. Baicalein ve Timokinin ilaçların tek başlarına klinikte kullanılmaktadır. Fakat yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı yeterince etkili olmaması araştırmacıları bu bileşikleri kanser ilaçları veya çeşitli bileşiklerle kombine etmeye yöneltmiştir (Yu, Qi, Xiaoxiang, Xu, & Liu, 2017).

Bu bigiler doğrultusunda baicalein ve Timokinin bileşiklerin kombinasyonu, kanser tedavisinde potansiyel yeni bir tedavi yaklaşımı olup olmayacağı araştırılmıştır. Bu kombinasyonda hücre ölümü incelendiğinde IC50 (%50 hücre canlılığı değerleri) olarak iki farklı doz kombinasyonu (12.5µM Bai + 6.25µM TQ ; 100µM Bai + 50µM TQ) seçilmiştir. Literatüre benzer şekilde sisplatine dirençli A549 hücre hattında baicalein bileşiği tek başına ve kombine kullanılması bu direnci kırarak hücreleri sisplatine daha duyarlı hale getirmiştir. Söz konusu tedavi şekli A549 hücrelerinde hem apoptozu indüklemiş hem de migrasyonu hızını düşürmüştür (Yu et al., 2017).

Bu tez çalışmasında A549 ve Beas-2B hücre hatlarında Baicelein, Timokinon ve kombinasyonları doza ve zamana SRB testi yapılarak hücre canlılığı incelenmiştir. SRB testi ile 24 ve 48 saat için elde edilen IC50 değerleri, çalışmanın devamında hücredeki ölüm mekanizmasının incelenmesi açısından hücre hatlarına uygulanmıştır. İlk olarak hücre ölüm modunun belirlenmesi için Anneksin-V/PI

değerlendirilmiştir. A549 akciğer kanser hücre hattında Baicalein (50µM), Timokinon (25µM) ve bunların kombinasyonları ile zamana bağlı olarak geç apoptozun indüklendiği görülmektedir. Apoptoz konusunda daha detaylı bilgi edinebilmek için kaspaz 3/7 aktivasyonu incelenmiştir. AnneksinV/PI değerlendirilmesinde olduğu gibi, A549 hücre hattı kaspaz 3/7 aktivasyonu zamana bağlı olarak özellikle 48 saatte dramatik oranda artmıştır. Bu tez çalışmasının bulgularıyla uyumlu olarak Dera ve ark. Timokinonun A549 hücre hattında apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Dera, Rajagopalan, Al Fayi, Ahmed, & Chandramoorthy, 2020). Baicalein için de Gong ve ark. A549 hücre hattında baicalein tedavisi sonrası apoptozun indüklendiği Anneksin-V/PI ve kaspaz aktivitesi belirlenmesi ile gösterilmiştir (Gong et al., 2014) .

Migrasyon testi için de A549 akciğer kanser hücre hattında Baicalein, Timokinon ve kombinasyon halinde uygulamasının metastatik sürece olan etkisini değerlendirilmek amacıyla migrasyon testi yapıldı ve kontrole kıyaslandığında bileşiklerin tekli ve kombinasyon olarak hücrelerin migrasyon yeteneklerini azalttığı görülmektedir. Bu tezde Baicalein (12 µM), Timokinon (6.25 µM) ve bunların kombinasyonuyla yapılan migrasyon testi için 24, 48 ve 72 saatte çekilen fotoğraflara göre ilaçların tek başlarına kullanılması sonucu hücre göç hızının azaldığı tespit edilmiştir. Bileşiklerin tekli kullanımının kombinasyona kıyasladığımızda kombinasyonun migrasyonu aşırı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir. Başka bir çalışmada Yang ve ark. benzer şekilde Timokinonun A549 hücre hattı üzerinde bir migrasyon deneyi yapmış ve onların bulguları bu tezin bulgularıyla uyumlu şekilde görünmektedir (J. Yang, X. R. Kuang, P. T. Lv, & X. X. Yan, 2015). Baicalein uygulaması sonrası 72 saatte hücre göçünün hızını azalarak yara kapanmasını önlenmiştir. Başka bir çalışmada da A549 hücre hattında Baicaleinle uygulaması sonrası migrasyonu testinde hücre göçünün azaldığı saptanmıştır. (Gong et al., 2014) .

5. SONUÇ:

Bu tez çalışmasında A549 akciğer kanser hücre hattı ve Beas-2B sağlıklı akciğer hücre hattı üzerinde Baicalein ve Timokinon bileşiklerinin hem tekli hem kombinasyon şekilde uygulaması yapılmış ve antikanser özelliği araştırılmıştır. İki bileşik tekli tedavide akciğer kanseri hücreleri üzerinde etkili bir şekilde hücre proliferasyonu azaltmaktadır. Ayrıca hücre migrasyonu (göç) hızını azaltmış ve akciğer kanser hücresini geç dönem apoptoza gitmesini sağlamış. Bu tezin sonucuna benzer başka çalışmalara uyumlu bir şekilde görünmektedir. Ayrıca Baicalein ve Timokinon kombinasyonun etkisi bileşiklerin tekli halinden daha fazla etkili görünüyor ve bu nedenle bu kombinasyon kanser ilaç için uygun olabileceğini görünmektedir.

KAYNAKÇA

Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene, 26*(9), 1324-1337. doi:10.1038/sj.onc.1210220

Annamalai, P., Thayman, M., Rajan, S., Raman, L. S., Ramasubbu, S., & Perumal, P. (2015). Ethyl acetate extract from marine sponge Hyattella cribriformis exhibit potent anticancer activity by promoting tubulin polymerization as evidenced mitotic arrest and induction of apoptosis. *Pharmacognosy magazine, 11*(42), 345.

Apoptoz, Ö. H. (2004). ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Hast Derg, 14*(1), 1-20.

Arafa, E.-S. A., Zhu, Q., Shah, Z. I., Wani, G., Barakat, B. M., Racoma, I., . . . Wani, A. A. (2011). Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 706*(1-2), 28-35.

Arenberg, D. A., Kunkel, S. L., Polverini, P. J., Glass, M., Burdick, M. D., & Strieter, R. M. (1996). Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J Clin Invest, 97*(12), 2792-2802. doi:10.1172/jci118734

Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2000). Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nat Med, 6*(8), 852-855. doi:10.1038/78595

Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis, 31*(1), 9-18. doi:10.1093/carcin/bgp268

Bade, B. C., & Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med, 41*(1), 1-24. doi:10.1016/j.ccm.2019.10.001

Bell, D. W., Gore, I., Okimoto, R. A., Godin-Heymann, N., Sordella, R., Mulloy, R., . . . Haber, D. A. (2005). Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet, 37*(12), 1315-1316. doi:10.1038/ng1671

Bellamy, C. O., Malcolmson, R. D., Harrison, D. J., & Wyllie, A. H. (1995). *Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis.* Paper presented at the Seminars in cancer biology.

Berx, G., & van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol, 1*(6), a003129. doi:10.1101/cshperspect.a003129

Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature, 432*(7015), 332-337. doi:10.1038/nature03096

Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet, 6*(8), 611-622. doi:10.1038/nrg1656

Bortner, C. D., Oldenburg, N. B., & Cidlowski, J. A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in cell biology, 5*(1), 21-26.

Bouck, N., Stellmach, V., & Hsu, S. C. (1996). How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res, 69*, 135-174. doi:10.1016/s0065-230x(08)60862-3

Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A., & Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry, 272*(42), 26159-26165.

Bromley, L. L., & Szur, L. (1955). Combined radiotherapy and resection for carcinoma of the bronchus; experiences with 66 patients. *Lancet, 269*(6897), 937-941. doi:10.1016/s0140-6736(55)92787-2

Burkhart, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer, 8*(9), 671-682. doi:10.1038/nrc2399

Buzin, A. R., Pinto, F. E., Nieschke, K., Mittag, A., de Andrade, T. U., Endringer, D. C., . . . Lenz, D. (2015). Replacement of specific markers for apoptosis and necrosis by nuclear morphology for affordable cytometry. *Journal of immunological methods, 420*, 24-30.

Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology, 69 Suppl 3*, 4-10. doi:10.1159/000088478

Carson, D. A., & Ribeiro, J. M. (1993). Apoptosis and disease. *The Lancet, 341*(8855), 1251-1254.

Cathcart, M. C., Useckaite, Z., Drakeford, C., Semik, V., Lysaght, J., Gately, K., . . . Pidgeon, G. P. (2016). Anti-cancer effects of baicalein in non-small cell lung cancer in-vitro and in-vivo. *BMC Cancer, 16*(1), 707. doi:10.1186/s12885-016-2740-0

Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res, 6*(10), 1521-1533. doi:10.1158/1541-7786.mcr-07-2203

Chiu, Y.-S., Cheng, Y.-H., Lin, S.-W., Chang, T.-S., Liou, C.-J., & Lai, Y.-S. (2015). Bupivacaine induces apoptosis through caspase-dependent and-independent pathways in canine mammary tumor cells. *Research in veterinary science, 100*, 232-238.

Choo, Z. e., Loh, A. H. P., & Chen, Z. X. (2019). Destined to die: Apoptosis and pediatric cancers. *Cancers, 11*(11), 1623.

Chowdhury, F. A., Hossain, M. K., Mostofa, A., Akbor, M. M., & Bin Sayeed, M. S. (2018). Therapeutic potential of thymoquinone in glioblastoma treatment: Targeting major gliomagenesis signaling pathways. *BioMed research international, 2018*.

Cohen, J. J. (1993). Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *Chest, 103*(2), 99S-101S.

Cummings, M., & Winterford, C. (1997). Walker N1. *Am J Surg Pathol, 21*(1), 88-101.

D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international, 43*(6), 582-592.

Dajani, E., Shahwan, T., & Dajani, N. (2016). Overview of the preclinical pharmacological properties of Nigella sativa (black seeds): a complementary drug with historical and clinical significance. *J Physiol Pharmacol, 67*(6), 801-817.

DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab, 7*(1), 11-20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002

DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev, 29*(2), 309-316. doi:10.1007/s10555-010-9223-6

Dera, A. A., Rajagopalan, P., Al Fayi, M., Ahmed, I., & Chandramoorthy, H. C. (2020). Indirubin-3-monoxime and thymoquinone exhibit synergistic efficacy as therapeutic combination in in-vitro and in-vivo models of Lung cancer. *Archives of Pharmacal Research, 43*(6), 655-665.

Deshpande, A., Sicinski, P., & Hinds, P. W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene, 24*(17), 2909-2915. doi:10.1038/sj.onc.1208618

Dittz, D., Figueiredo, C., Lemos, F. O., Viana, C. T., Andrade, S. P., Souza-Fagundes, E. M., . . . Lopes, M. T. (2015). Antiangiogenesis, loss of cell adhesion and apoptosis are involved in the antitumoral activity of Proteases from V. cundinamarcensis (C. candamarcensis) in murine melanoma B16F1. *International journal of molecular sciences, 16*(4), 7027-7044.

Dosaka-Akita, H., Hu, S. X., Fujino, M., Harada, M., Kinoshita, I., Xu, H. J., . . . Benedict, W. F. (1997). Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer: its synergistic effects with altered ras and p53 protein status on prognosis. *Cancer, 79*(7), 1329-1337.

Driscoll, B., Wu, L., Buckley, S., Hall, F. L., Anderson, K. D., & Warburton, D. (1997). Cyclin D1 antisense RNA destabilizes pRb and retards lung cancer cell growth. *Am J Physiol, 273*(5), L941-949. doi:10.1152/ajplung.1997.273.5.L941

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

Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science, 281*(5381), 1317-1322. doi:10.1126/science.281.5381.1317

Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol, 92*(3), 329-333. doi:10.1016/j.radonc.2009.06.025

Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity, 73*(4), 1907-1916.

Fontanini, G., Vignati, S., Lucchi, M., Mussi, A., Calcinai, A., Boldrini, L., . . . Bevilacqua, G. (1997). Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Br J Cancer, 75*(9), 1295-1301. doi:10.1038/bjc.1997.220

Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y. X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol, 14*(10), 1014-1022. doi:10.1038/ni.2703

Gali-Muhtasib, H. U., Abou Kheir, W. G., Kheir, L. A., Darwiche, N., & Crooks, P. A. (2004). Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anti-cancer drugs, 15*(4), 389-399.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., . . . Andrews, D. W. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation, 25*(3), 486-541.

Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G., Bussolati, O., Dall'Asta, V., & Gazzola, G. C. (1998). Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 46*(8), 895-900.

Geiger, B., & Yamada, K. M. (2011). Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol, 3*(5). doi:10.1101/cshperspect.a005033

Geradts, J., Fong, K. M., Zimmerman, P. V., Maynard, R., & Minna, J. D. (1999). Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res, 5*(4), 791-800.

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians, 55*(3), 178-194.

Giannelli, G., Koudelkova, P., Dituri, F., & Mikulits, W. (2016). Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol, 65*(4), 798-808. doi:10.1016/j.jhep.2016.05.007

Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 16*(6), 2129-2144.

Gong, W.-Y., Wu, J.-F., Liu, B.-J., Zhang, H.-Y., Cao, Y.-X., Sun, J., . . . Dong, J.-C. (2014). Flavonoid components in Scutellaria baicalensis inhibit nicotine-induced proliferation, metastasis and lung cancer-associated inflammation in vitro. *International journal of oncology, 44*(5), 1561-1570.

Graziano, S. L., Gamble, G. P., Newman, N. B., Abbott, L. Z., Rooney, M., Mookherjee, S., . . . Poiesz, B. J. (1999). Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol, 17*(2), 668-675. doi:10.1200/jco.1999.17.2.668

Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., & Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res, 54*(18), 4855-4878.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell, 140*(6), 883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025

Group, N.-s. C. L. C. C. (1995). Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *Bmj, 311*(7010), 899-909.

Guerin, M. B., McKernan, D. P., O'Brien, C. J., & Cotter, T. G. (2006). Retinal ganglion cells: dying to survive. *Int J Dev Biol, 50*(8), 665-674. doi:10.1387/ijdb.062159mg

Gurung, R. L., Lim, S. N., Khaw, A. K., Soon, J. F. F., Shenoy, K., Mohamed Ali, S., . . . Hande, M. P. (2010). Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. *Plos one, 5*(8), e12124.

Güleş, Ö., & Ülker, E. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19*(2), 73-78.

Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell, 86*(3), 353-364. doi:10.1016/s0092-8674(00)80108-7

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell, 100*(1), 57-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell, 144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Harbour, J. W., & Dean, D. C. (2000). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol, 2*(4), E65-67. doi:10.1038/35008695

Haupt, S., Raghu, D., & Haupt, Y. (2016). Mutant p53 Drives Cancer by Subverting Multiple Tumor Suppression Pathways. *Front Oncol, 6*, 12. doi:10.3389/fonc.2016.00012

Hausman, D. M. (2019). What Is Cancer? *Perspect Biol Med, 62*(4), 778-784. doi:10.1353/pbm.2019.0046

Herbst, R. S., Heymach, J. V., & Lippman, S. M. (2008). Lung cancer. *N Engl J Med, 359*(13), 1367-1380. doi:10.1056/NEJMra0802714

Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature, 553*(7689), 446-454. doi:10.1038/nature25183

Hosseinzadeh, H., & Parvardeh, S. (2004). Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa seeds, in mice. *Phytomedicine, 11*(1), 56-64.

Hüttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H., & Doan, J. W. (2007). Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim Biophys Acta, 1773*(12), 1701-1720. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.10.001

Hwang, S. J., Cheng, L. S., Lozano, G., Amos, C. I., Gu, X., & Strong, L. C. (2003). Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: association between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk. *Hum Genet, 113*(3), 238-243. doi:10.1007/s00439-003-0968-7

Jafri, S. H., Glass, J., Shi, R., Zhang, S., Prince, M., & Kleiner-Hancock, H. (2010). Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 29*(1), 1-11.

Jeon, S.-R., Lee, J.-W., Jang, P.-S., Chung, N.-G., Cho, B., & Jeong, D.-C. (2015). Anti-leukemic properties of deferasirox via apoptosis in murine leukemia cell lines. *Blood research, 50*(1), 33-39.

Johnson, B. E., Russell, E., Simmons, A. M., Phelps, R., Steinberg, S. M., Ihde, D. C., & Gazdar, A. F. (1996). MYC family DNA amplification in 126 tumor cell lines from patients with small cell lung cancer. *J Cell Biochem Suppl, 24*, 210-217. doi:10.1002/jcb.240630516

Johnson, D. H., Strupp, J., Greco, F. A., Stewart, J., Merrill, W., Malcolm, A., . . . Hainsworth, J. D. (1991). Neoadjuvant cisplatin plus vinblastine chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Cancer, 68*(6), 1216-1220.

Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev, 23*(5), 537-548. doi:10.1101/gad.1756509

Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer, 9*(4), 239-252. doi:10.1038/nrc2618

Kar, S., Parbin, S., Deb, M., Shilpi, A., Sengupta, D., Rath, S. K., . . . Patra, S. K. (2014). Epigenetic choreography of stem cells: the DNA demethylation episode of development. *Cellular and molecular life sciences, 71*(6), 1017-1032.

Karaboz, İ., Kayar, E., & Akar, S. (2008). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 6*(2), 1-18.

Kazerounian, S., Yee, K. O., & Lawler, J. (2008). Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci, 65*(5), 700-712. doi:10.1007/s00018-007-7486-z

Khan, M. A., Tania, M., Zhang, D.-z., & Chen, H.-c. (2010). Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese Journal of Cancer Research, 22*(2), 87-92.

Khan, M. A., Zheng, M., & Fu, J. (2019). Epigenetic modification of oncogenes or tumor suppressor genes by thymoquinone in triple negative breast cancer. In: AACR.

Kim, D. H., Hossain, M. A., Kang, Y. J., Jang, J. Y., Lee, Y. J., Im, E., . . . Kim, N. D. (2013). Baicalein, an active component of Scutellaria baicalensis Georgi, induces apoptosis in human colon cancer cells and prevents AOM/DSS-induced colon cancer in mice. *International journal of oncology, 43*(5), 1652-1658.

Kiraz, Y., Adan, A., Yandim, M. K., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology, 37*(7), 8471-8486.

Kolli-Bouhafs, K., Boukhari, A., Abusnina, A., Velot, E., Gies, J.-P., Lugnier, C., & Rondé, P. (2012). Thymoquinone reduces migration and invasion of human glioblastoma cells associated with FAK, MMP-2 and MMP-9 down-regulation. *Investigational new drugs, 30*(6), 2121-2131.

Koopman, G., Reutelingsperger, C., Kuijten, G., Keehnen, R., Pals, S., & Van Oers, M. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis.

Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol, 16*(7), 393-405. doi:10.1038/nrm4007

Kunitoh, H., Eguchi, K., Yamada, K., Tsuchiya, R., Kaneko, M., Moriyama, N., & Noguchi, M. (1992). Intrapulmonary sublesions detected before surgery in patients with lung cancer. *Cancer, 70*(7), 1876-1879.

Le Chevalier, T., Arriagada, R., Quoix, E., Ruffie, P., Martin, M., Tarayre, M., . . . Laplanche, A. (1991). Radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in nonresectable non-small-cell lung cancer: first analysis of a randomized trial in 353 patients. *J Natl Cancer Inst, 83*(6), 417-423. doi:10.1093/jnci/83.6.417

Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y. W., & Buchanan, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta, 1856*(2), 189-210. doi:10.1016/j.bbcan.2015.08.002

Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell, 141*(7), 1117-1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011

Li, J.-P., Yang, Y.-X., Liu, Q.-L., Pan, S.-T., He, Z.-X., Zhang, X., . . . Qiu, J.-X. (2015). The investigational Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) induces cell cycle G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK and Akt/mTOR signaling pathways in human breast cancer cells. *Drug design, development and therapy, 9*, 1627.

Li, J., Li, W. X., Bai, C., & Song, Y. (2017). Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer. *Clin Respir J, 11*(5), 539-546. doi:10.1111/crj.12389

Lipinski, M. M., & Jacks, T. (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene, 18*(55), 7873-7882. doi:10.1038/sj.onc.1203244

Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature, 432*(7015), 307-315. doi:10.1038/nature03098

Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology, 146*(1), 3.

Mak, T. (2003). The E. Donnall Thomas lecture apoptosis:"'Tis death that makes life live". *Biology of Blood and Marrow Transplantation, 9*(8), 483-488.

Mattson, K., Holsti, L. R., Holsti, P., Jakobsson, M., Kajanti, M., Liippo, K., . . . et al. (1988). Inoperable non-small cell lung cancer: radiation with or without chemotherapy. *Eur J Cancer Clin Oncol, 24*(3), 477-482. doi:10.1016/s0277-5379(98)90020-7

Mishina, T., Dosaka-Akita, H., Kinoshita, I., Hommura, F., Morikawa, T., Katoh, H., & Kawakami, Y. (1999). Cyclin D1 expression in non-small-cell lung cancers: its association with altered p53 expression,

cell proliferation and clinical outcome. *Br J Cancer, 80*(8), 1289-1295. doi:10.1038/sj.bjc.6990500

Mostofa, A., Hossain, M. K., Basak, D., & Bin Sayeed, M. S. (2017). Thymoquinone as a potential adjuvant therapy for cancer treatment: evidence from preclinical studies. *Frontiers in pharmacology, 8*, 295.

Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., & Johansson, C. C. (2010). Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res, 107*, 57-117. doi:10.1016/s0065-230x(10)07003-x

Mountz, J., & Zhou, T. (2001). Apoptosis and autoimmunity (in) A Textbook of Rheumatology: Artritis and allied conditions. WJ Kopman (Editör). In: Lippincott-Williams&Wilkins.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., & Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer, 8*(8), 618-631. doi:10.1038/nrc2444

Nagata, S. (2005). DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol., 23*, 853-875.

Nagata, S. (2018). Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annual review of immunology, 36*, 489-517.

Nagi, M. N., Almakki, H. A., Sayed-Ahmed, M. M., & Al-Bekairi, A. M. (2010). Thymoquinone supplementation reverses acetaminophen-induced oxidative stress, nitric oxide production and energy decline in mice liver. *Food and Chemical Toxicology, 48*(8-9), 2361-2365.

Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol, 11*(3), 220-228. doi:10.1038/nrm2858

Ohta, Y., Watanabe, Y., Murakami, S., Oda, M., Hayashi, Y., Nonomura, A., . . . Sasaki, T. (1997). Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer. *Br J Cancer, 76*(8), 1041-1045. doi:10.1038/bjc.1997.505

Ookawa, K., Shiseki, M., Takahashi, R., Yoshida, Y., Terada, M., & Yokota, J. (1993). Reconstitution of the RB gene suppresses the growth of small-cell lung carcinoma cells carrying multiple genetic alterations. *Oncogene, 8*(8), 2175-2181.

Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., & Haanen, C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis, 3*(2), 115-121.

Paluszczak, J., Krajka-Kuźniak, V., & Baer-Dubowska, W. (2010). The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicology letters, 192*(2), 119-125.

Pan, Q., Xue, M., Xiao, S. S., Wan, Y. J., & Xu, D. B. (2016). A Combination Therapy with Baicalein and Taxol Promotes Mitochondria-Mediated Cell Apoptosis: Involving in Akt/β-Catenin Signaling Pathway. *DNA Cell Biol, 35*(11), 646-656. doi:10.1089/dna.2016.3312

Papadopoulos, E. I., Yousef, G. M., & Scorilas, A. (2015). Gemcitabine impacts differentially on bladder and kidney cancer cells: distinct modulations in the expression patterns of apoptosis-related microRNAs and BCL2 family genes. *Tumor Biology, 36*(5), 3197-3207.

Parbin, S., Shilpi, A., Kar, S., Pradhan, N., Sengupta, D., Deb, M., . . . Patra, S. K. (2016). Insights into the molecular interactions of thymoquinone with histone deacetylase: evaluation of the therapeutic intervention potential against breast cancer. *Molecular BioSystems, 12*(1), 48-58.

Patra, S. K., & Szyf, M. (2008). DNA methylation-mediated nucleosome dynamics and oncogenic Ras signaling: Insights from FAS, FAS ligand and RASSF1A. *The FEBS journal, 275*(21), 5217-5235.

Pompei, L., Cunha, E., Steiner, M., Theodoro, T., Mader, A., Petri, G., . . . Fernandes, C. (2015). Effects of estradiol, progestogens, and of tibolone on breast proliferation and apoptosis. *Climacteric, 18*(4), 518-522.

Pythoud, C., Rothenberger, S., Martínez-Sobrido, L., de la Torre, J. C., & Kunz, S. (2015). Lymphocytic choriomeningitis virus differentially affects the virus-induced type I interferon response and mitochondrial apoptosis mediated by RIG-I/MAVS. *Journal of virology, 89*(12), 6240-6250.

Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell, 141*(1), 39-51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014

Richardson, G. E., & Johnson, B. E. (1993). The biology of lung cancer. *Semin Oncol, 20*(2), 105-127.
Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer, 53*(3), 441-442. doi:10.4103/0019-509x.200658
Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature, 391*(6662), 96-99.
Salem, A. A., El Haty, I. A., Abdou, I. M., & Mu, Y. (2015). Interaction of human telomeric G-quadruplex DNA with thymoquinone: a possible mechanism for thymoquinone anticancer effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1850*(2), 329-342.
Sanders, B. M., Jay, M., Draper, G. J., & Roberts, E. M. (1989). Non-ocular cancer in relatives of retinoblastoma patients. *Br J Cancer, 60*(3), 358-365. doi:10.1038/bjc.1989.285
Schwartz, A. G., & Cote, M. L. (2016). Epidemiology of Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol, 893*, 21-41. doi:10.1007/978-3-319-24223-1_2
Schwartzman, R. A., & Cidlowski, J. A. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine reviews, 14*(2), 133-151.
Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., & Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol, 3*(4), 346-352.
Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol, 1*(1), 72-76. doi:10.1038/35036093
Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell, 2*(2), 103-112. doi:10.1016/s1535-6108(02)00102-2
Shinde, A. M., & Dashti, A. (2016). Palliative Care in Lung Cancer. *Cancer Treat Res, 170*, 225-250. doi:10.1007/978-3-319-40389-2_11
Shoja, M., Reddy, N. D., Nayak, P. G., Srinivasan, K., & Rao, C. M. (2015). Glycosmis pentaphylla (Retz.) DC arrests cell cycle and induces apoptosis via caspase-3/7 activation in breast cancer cells. *Journal of ethnopharmacology, 168*, 50-60.
Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., . . . Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 82*(13), 1107-1112.
Slebos, R. J., Hruban, R. H., Dalesio, O., Mooi, W. J., Offerhaus, G. J., & Rodenhuis, S. (1991). Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst, 83*(14), 1024-1027. doi:10.1093/jnci/83.14.1024
Squier, M. K., Miller, A. C., Malkinson, A. M., & Cohen, J. J. (1994). Calpain activation in apoptosis. *Journal of cellular physiology, 159*(2), 229-237.
Stefanska, B., Karlic, H., Varga, F., Fabianowska-Majewska, K., & Haslberger, A. (2012). Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components–the implications in cancer prevention. *British journal of pharmacology, 167*(2), 279-297.
Sun, W., & Yang, J. (2010). Functional mechanisms for human tumor suppressors. *J Cancer, 1*, 136-140. doi:10.7150/jca.1.136
Şakalar, Ç., İzgi, K., İskender, B., Sezen, S., Aksu, H., Çakır, M., . . . Canatan, H. (2016). The combination of thymoquinone and paclitaxel shows anti-tumor activity through the interplay with apoptosis network in triple-negative breast cancer. *Tumor Biology, 37*(4), 4467-4477.
Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P., & Mendoza, C. (1998). Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Molecular human reproduction, 4*(8), 757-762.
Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science, 267*(5203), 1456-1462.
Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 25*(1), 16-27.

Trump, B. E., Berezesky, I. K., Chang, S. H., & Phelps, P. C. (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic pathology, 25*(1), 82-88.

Ulukaya, E. (2003). Apoptozis ders notları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı*, 15-26.

Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Funct, 29*(6), 468-480. doi:10.1002/cbf.1774

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science, 324*(5930), 1029-1033. doi:10.1126/science.1160809

Veikkola, T., & Alitalo, K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol, 9*(3), 211-220. doi:10.1006/scbi.1998.0091

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols, 1*(3), 1112-1116.

Volm, M., Koomägi, R., & Mattern, J. (1997). Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J Cancer, 74*(1), 64-68. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19970220)74:1<64::aid-ijc11>3.0.co;2-i

Volm, M., Koomägi, R., Mattern, J., & Stammler, G. (1997). Prognostic value of basic fibroblast growth factor and its receptor (FGFR-1) in patients with non-small cell lung carcinomas. *Eur J Cancer, 33*(4), 691-693. doi:10.1016/s0959-8049(96)00411-x

Vyas, R. K., Suryanarayana, U., Dixit, S., Singhal, S., Bhavsar, D. C., Neema, J. P., & Baboo, H. A. (1998). Inoperable non-small cell lung cancer: palliative radiotherapy with two weekly fractions. *Indian J Chest Dis Allied Sci, 40*(3), 171-174.

Wang, J. H., Zhou, W. W., Cheng, S. T., Liu, B. X., Liu, F. R., & Song, J. Q. (2015). Downregulation of Sprouty homolog 2 by microRNA-21 inhibits proliferation, metastasis and invasion, however promotes the apoptosis of multiple myeloma cells. *Molecular medicine reports, 12*(2), 1810-1816.

Wanner, M., Koomen, G., & Dung, N. X. (1993). Thymoquinone from Eupatorium ayapana. *Planta medica, 59*(01), 99-99.

Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda), 25*(2), 85-101. doi:10.1152/physiol.00045.2009

Woo, C. C., Kumar, A. P., Sethi, G., & Tan, K. H. B. (2012). Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical pharmacology, 83*(4), 443-451.

Yang, J., Kuang, X.-r., Lv, P.-t., & Yan, X.-x. (2015). Thymoquinone inhibits proliferation and invasion of human nonsmall-cell lung cancer cells via ERK pathway. *Tumor Biology, 36*(1), 259-269.

Yang, J., Kuang, X. R., Lv, P. T., & Yan, X. X. (2015). Thymoquinone inhibits proliferation and invasion of human nonsmall-cell lung cancer cells via ERK pathway. *Tumour Biol, 36*(1), 259-269. doi:10.1007/s13277-014-2628-z

Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell, 14*(6), 818-829. doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009

Yang, S. Y., Miah, A., Pabari, A., & Winslet, M. (2011). Growth Factors and their receptors in cancer metastases. *Front Biosci (Landmark Ed), 16*, 531-538. doi:10.2741/3703

Yu, M., Qi, B., Xiaoxiang, W., Xu, J., & Liu, X. (2017). Baicalein increases cisplatin sensitivity of A549 lung adenocarcinoma cells via PI3K/Akt/NF-κB pathway. *Biomed Pharmacother, 90*, 677-685. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.001

Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., & Yan, G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques, 23*(3), 525-531.

Zumsteg, A., & Christofori, G. (2009). Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. *Curr Opin Oncol, 21*(1), 60-70. doi:10.1097/CCO.0b013e32831bed7e

İNTİHAL FORMU

16.09.2021 15:44 Turnitin

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 16-Eyl-2021 15:39 +03
NUMARA: 1649829275
Kelime Sayısı: 20911
Gönderildi: 1

Tez Sonya Tez tarafından

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%15	İnternet Sources: %14 Yayınlar: %5 Öğrenci Ödevleri: %3

4% match (28-Haz-2021 tarihli internet) https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/1244/10330812.pdf?isAllowed=y&sequence=1
2% match (20-Oca-2021 tarihli internet) http://guncel.tgv.org.tr/journal/82/pdf/100641.pdf
2% match (08-Nis-2016 tarihli internet) http://dergipark.ulakbim.gov.tr/arsiv/article/download/5000157730/5000158452
1% match (18-May-2021 tarihli internet) http://acikerisim.uludag.edu.tr/jspui/bitstream/11452/18203/1/G%c3%bclseven_D%c3%96NE.pdf
1% match (03-May-2021 tarihli internet) http://acikerisim.uludag.edu.tr/bitstream/11452/1339/1/470558.pdf
1% match (03-Şub-2021 tarihli internet) http://nek.istanbul.edu.tr:4444/ekos/TEZ/48556.pdf
1% match (31-Mar-2020 tarihli internet) https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/146555
< 1% match (14-Haz-2021 tarihli internet) https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/1382/Tugba-Yumusak.pdf?isAllowed=y&sequence=1
< 1% match (10-Haz-2021 tarihli internet) https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/1462/ZeynepPurenAkguner.pdf?isAllowed=y&sequence=2
< 1% match (18-Eyl-2015 tarihli internet) http://radonk.tripod.com/akck.htm
< 1% match (13-Ağu-2013 tarihli internet) http://istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/ogogus_hast/dr_nurdan_kalkan.pdf
< 1% match (30-Nis-2019 tarihli internet) https://sagliklolalim.com/baicalin/
< 1% match (26-Tem-2016 tarihli internet) http://docplayer.biz.tr/3104543-Apoptozis-ders-notlari.html
< 1% match (30-May-2016 tarihli internet) http://docplayer.biz.tr/4175912-T-c-saglik-bakanligi-taksim-egitim-ve-arastirma-hastanesi-uroloji-klinigi-klinik-sefi-doc-dr-mete-cek.html
< 1% match (20-Tem-2016 tarihli internet) http://docplayer.biz.tr/4019850-Karabas-otu-lavandula-stoechas-l-bitkisinin-farkli-in-vitro-besin-ortamlarinda-kulture-alinmasi.html
< 1% match (11-May-2021 tarihli internet) http://www.journalagent.com/eurasianjpulmonol/pdfs/SOLUNUM_3_SUP_2_190_193.pdf