T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KUERSETİN VE KUERSETİN-BORİK ASİT KOMBİNASYONLARININ 8305C ANAPLASTİK TİROİD KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF, APOPTOTİK VE ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

SALİM BULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. BANU MANSUROĞLU

EŞ DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ MELİKE ERSÖZ

İSTANBUL, 2019

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KUERSETİN VE KUERSETİN-BORİK ASİT KOMBİNASYONLARININ 8305C ANAPLASTİK TİROİD KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF, APOPTOTİK VE ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Salim BULUT tarafından hazırlanan tez çalışması 15.05.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Melike ERSÖZ

Demiroğlu Bilim Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU _____

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ _____

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ _____

Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ders dönemimde ve deneylerin gerçekleşmesi aşamasında desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU'na, tez sürecimin her safhasında büyük özverisi ve emeği bulunan eş danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Melike ERSÖZ'e, tezde kullandığımız hücre soyunu sağlayan Sayın Doç. Dr. Engin KAPTAN'a ve bu süreçte önemli katkısı bulunan meslektaşım Arş. Gör. Fatma Şayan POYRAZ'a şükranlarımı sunuyorum.

Bana olan inancını bir an olsun yitirmeyen ve beni sürekli destekleyen annem başta olmak üzere, babama, kardeşime ve kıymetli nişanlıma teşekkürlerimle.

Bu tezi, ailemizin sevinci biricik yeğenim Nisa KARTAL'a ithaf ediyorum.

Mayıs, 2019

Salim BULUT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ..... vii

KISALTMA LİSTESİ..... viii

ŞEKİL LİSTESİ..... x

ÖZET..... xiii

ABSTRACT..... xv

BÖLÜM 1..... 1

GİRİŞ..... 1

1.1 Literatür Özeti..... 1
1.2 Tezin Amacı..... 2
1.3 Hipotez..... 2

BÖLÜM 2..... 4

GENEL BİLGİLER..... 4
2.1 Tiroid Kanseri..... 4
2.1.1 Anaplastik Tiroid Kanseri..... 4
2.2 Flavonoidler..... 5
2.2.1 Kuersetin..... 6
2.3 Borik Asit..... 7
2.4 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres..... 8
2.4.1 Malondialdehit (MDA) Aktivitesi..... 9
2.5 Antioksidanlar..... 10
2.5.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)..... 10
2.5.2 Redükte Glutatyon Aktivitesi (GSH)..... 11
2.6 Hücre Siklusu..... 11
2.6.1 Hücre Siklusunun Kontrolü..... 12
2.6.2 Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA)..... 12
2.7 Apoptoz..... 13
2.7.1 Apoptoz Mekanizması..... 14
2.7.2 Apoptozda Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler..... 16
2.7.3 Apoptozda Hücrede Meydana Gelen Biyokimyasal Değişiklikler..... 17

BÖLÜM 3..... 18

MATERYAL VE YÖNTEM.....18
3.1 Materyal.....18
3.1.1 Laboratuvar Ekipmanları.....18
3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler.....19
3.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....20
3.2 Yöntem.....21
3.2.1 8305C İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Soyu.....21
3.2.2 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Kültürü.....22
3.2.3 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinin Pasajlanması.....22
3.2.4 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu23
3.2.5 Tripan Mavisi ile Hücre Canlılık Testi.....23
3.2.6 Farklı Konsantrasyonlarda Kuersetin Hazırlanması.....23
3.2.7 Farklı Konsantrasyonlarda Borik Asit Hazırlanması.....24
3.2.8 Farklı Konsantrasyonlardaki Kuersetinin 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksisitesi.....24
3.2.9 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonlarının 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücreleri Üzerindeki Proliferasyon Etkisi.....25
3.2.10 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonlarının 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinde TUNEL Testi ile Apoptoz Tayini...26
3.2.11 8305C İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Lizatlarının Hazırlanması.....28
3.2.12 Protein Miktar Tayini (BCA) Yöntemi.....28
3.2.13 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki MDA Düzeyinin Belirlenmesi.....29
3.2.14 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki SOD Enzim Aktivitesinin Tayini.....29
3.2.15 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki GSH Tayini.....30
3.2.16 İstatistiksel Analiz.....31
BÖLÜM 4.....32
SONUÇ VE ÖNERİLER.....32
4.1 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Kültürü.....32
4.2 Farklı Konsantrasyonlardaki Kuersetinin 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi.....33
4.3 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonlarının 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisi.....42
4.4 Kuersetinin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonlarının 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinde Apoptoza Etkisi.....46
4.5 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki MDA Düzeyi.....50
4.6 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki SOD Enzim Aktivitesi.....52
4.7 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki GSH Aktivitesi.....54
KAYNAKLAR.....63

ÖZGEÇMİŞ.....75

SİMGE LİSTESİ

^{o}C	Santigrat
cc	Santimetreküp
cm^2	Santimetrekare
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
rpm	Dakikadaki devir sayısı
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AIF	Apoptoz Uyarıcı Faktör
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
ATC	Anaplastik Tiroid Kanseri
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
BCA	Bikinkoninik Asit
Bcl-2	B Hücreli Lenfoma -2
BSA	Bovin Serum Albumin
CAD	Kaspaz Aktiviteli DNAaz
CYC	Siklin
CSF	Koloni Uyarıcı Faktör
DISC	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMF	Dimetilformamid
DNAaz	Deoksiribonükleaz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTNB	5.5 Ditiyobis-2-Nitrobenzoik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ENDO-G	Endonükleaz G
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FBS	Fetal Bovin Serum
FTC	Foliküler Tiroid Karsinoması
GSH-Px	Glutatyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
HRP	Streptavidin-Peroksidaz
ICAD	Kaspaz Aktiviteli DNAaz inhibitörü
IC_{50}	%50 İnhibisyona neden olan konsantrasyon
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
M	Molarite
MDA	Malondialdehit
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5 difenil tetrazolyum bromid
MTC	Medular Tiroid Karsinomu
N	Normalite
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NBT	Nitroblue Tetrazolyum
NEAA	Esansiyel Olmayan Amino Asit

NGF	Nöron Büyüme Faktörü
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCNA	Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (Siklin)
pH	Hidrojen Potansiyeli
PTC	Papiller Tiroid Karsinoması
RNA	Ribonükleik Asit
ROOH	Lipid hidroperoksitleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
S1P	Sfingozin-1 Fosfat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit
TNF	Tümör Nekröz Faktör
TNFR	Tümör Nekroz Faktör Reseptör
TUNEL	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (Tdt) Aracılı dUTP-Biotin Nick Uç- Etiketleme

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Kuersetinin kimyasal yapısı [28]…….....……6
Şekil 2.2 Malondialdehit oluşumu [48]……..9
Şekil 2.3 Okside ve redükte glutatyon oluşumu [60]……....11
Şekil 2.4 Hücre döngüsü aşamaları [63]…….....12
Şekil 2.5 Apoptoza giden hücredeki morfoloji değişiklikleri [90]……...17
Şekil 4.1 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 24 saatlik kültürünün inverted mikroskop görüntüsü (40x)…….…..….....32
Şekil 4.2 1 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x).....33
Şekil 4.3 100 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)…….....34
Şekil 4.4 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)…….....34
Şekil 4.5 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 48 saatlik kültürünün inverted mikroskop görüntüsü (40x)……...34
Şekil 4.6 1 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)….....….….....35
Şekil 4.7 100 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)…..…….....35
Şekil 4.8 200 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)……...……..35
Şekil 4.9 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 72 saatlik kültürünün inverted mikroskop görüntüsü (40x)…….....36
Şekil 4.10 1 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)…….....….....36
Şekil 4.11 100 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)……...….36
Şekil 4.12 200 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)…..…….....37
Şekil 4.13 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 24 saatlik kültürünün inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)…….....37
Şekil 4.14 1 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x).....37
Şekil 4.15 100 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)…..…….38
Şekil 4.16 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid

kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)……..….38
Şekil 4.17 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 48 saatlik kültürünün inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)…….....38
Şekil 4.18 1 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)……...39
Şekil 4.19 100 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)……..….39
Şekil 4.20 200 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)…….....39
Şekil 4.21 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 72 saatlik kültürünün inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)…….....40
Şekil 4.22 1 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)…...…....40
Şekil 4.23 100 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)……..….40
Şekil 4.24 200 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)….....…41
Şekil 4.25 Kuersetinin 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı canlılık grafiği (24 saat)……..……41
Şekil 4.26 Kuersetinin 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı canlılık grafiği (48 saat)…….....……42
Şekil 4.27 Kuersetinin 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı canlılık grafiği (72 saat)……..…42
Şekil 4.28 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 24 saatlik kültürünün PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)……..…..43
Şekil 4.29 100 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)…….…..….43
Şekil 4.30 150 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)……..….……44
Şekil 4.31 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)…….……...44
Şekil 4.32 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x).....44
Şekil 4.33 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)…….....45
Şekil 4.34 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)…….....45
Şekil 4.35 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi (24 saat).....46
Şekil 4.36 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 24 saatlik

kültürünün TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)……..……...47
Şekil 4.37 100 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)…….....…….....47
Şekil 4.38 150 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x).....47
Şekil 4.39 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)…….....….48
Şekil 4.40 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)…….....….48
Şekil 4.41 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)…….....….…….48
Şekil 4.42 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)……...…….49
Şekil 4.43 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi (24 saat) 49
Şekil 4.44 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 24. saatteki MDA seviyesi…….....51
Şekil 4.45 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 48. saatteki MDA seviyesi……...52
Şekil 4.46 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 24. saatteki SOD enzim aktivitesi..…...…..53
Şekil 4.47 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 48. saatteki SOD enzim aktivitesi……...54
Şekil 4.48 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 24. saatteki GSH aktivitesi……..…55
Şekil 4.49 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 48. saatteki GSH aktivitesi……..……56

ÖZET

KUERSETİN VE KUERSETİN-BORİK ASİT KOMBİNASYONLARININ 8305C ANAPLASTİK TİROİD KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF, APOPTOTİK VE ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Salim BULUT

Moleküler Biyoloji ve Genetik AnaBilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike ERSÖZ

Anaplastik tiroid kanseri, tüm tiroid kanserleri içinde en agresif ve en kötü prognoza sahip metastatik neoplazm türüdür. Bu kanser türü, normal tiroid hücrelerinin morfoloji ve fonksiyonlarını yitirmesi ile ortaya çıkmaktadır ancak nedeni tam olarak bilinmemektedir. İleri yaşlarda ortaya çıkan, hızlı gelişen ve ölüme yol açan hastalığın sağkalım oranı ise oldukça düşüktür. Günümüzde anaplastik tiroid kanseri hastalarına cerrahi tedavi uygulanmaktadır fakat tümörün yeri, büyüklüğü ve invazif karakteri gibi faktörler alternatif tedavilerin araştırılmasını gerekli kılmıştır. Yapılan çalışmalarda paklitaksel, sisplatin gibi ilaçlarla anaplastik tiroid kanseri tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak kemoterapötik ajanların yan etkileri göz önüne alındığında tedaviyi destekleyecek yeni ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kuersetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon) elma, soğan, brokoli, çilek, kiraz, bezelye ve yeşil çay gibi meyve ve sebzelerde bulunan bir flavonoiddir ve kuersetinin akciğer, kolon, meme, prostat kanseri gibi kanser hücrelerinde etkinliği ispatlanmıştır. Borik asit ise prostat gibi bazı kanserlerin tedavisine yönelik olarak etkileri bildirilen bir mineraldir. Bu tez çalışmasının amacı kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin belirlenmesidir. 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri, 0-1000 μg/ml doz aralığında kuersetin ile 24, 48 ve

72 saat muamele edildi ve MTT testi ile IC_{50} değerleri belirlendi. 100, 150, 200 µg/ml konsantrasyonlarda kuersetin ve aynı kuersetin konsantrasyonlarıyla sırasıyla 200, 250, 300 µg/ml konsantrasyonlardaki borik asit kombinasyonları hücrelerle 24 saat süre ile muamele edildi. 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki proliferatif etki immünositokimyasal olarak PCNA ile, apoptotik etki ise TUNEL yöntemi ile belirlendi. SOD ve GSH antioksidan düzeyleri ile oksidatif stres parametresi olan MDA seviyesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Bulgular, Graphad Prism 8.0.2 programında Two-Tailed Mann-Whitney ve One-way ANOVA testleriyle istatistiksel olarak analiz edildi ve $p<0,05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kuersetinin, 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki 24. 48. ve 72. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla, 138 µg/ml, 84 µg/ml ve 22 µg/ml olarak saptandı. Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde PCNA hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre artan doza bağımlı olarak anlamlı derecede azalttığı belirlendi ($p<0,01$). Benzer şekilde, kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonları ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde TUNEL testi ile apoptoza giden hücre sayısının, kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı görüldü ($p<0,01$). Antioksidan aktivite analizi sonucunda ise; farklı konsantrasyonlarda kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonları uygulanan 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde SOD ve GSH düzeylerinin arttığı, MDA seviyesinin azaldığı belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerinde antioksidan ve apoptotik etkilere sahip olduğu belirlendi. Ancak kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C insan anaplastik tiroid kanseri için alternatif bir terapötik ajan olarak kullanılabilirliğinin in vivo deneylerle desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kuersetin, borik asit, apoptoz, antioksidan, 8305C insan anaplastik tiroid kanseri

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIPROLIFERATIVE, APOPTOTIC AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF QUERCETIN AND QUERCETIN-BORIC ACID COMBINATIONS ON 8305C ANAPLASTIC THYROID CANCER CELLS

Salim BULUT

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Banu MANSUROGLU

Co-Adviser: Asst. Prof. Dr. Melike ERSOZ

Anaplastic thyroid cancer is metastatic neoplasm type of all thyroid cancers which is the most aggressive and has the worst prognosis. This type of cancer occurs when normal thyroid cells lose their morphology and function, but the reason is not fully known. The survival rate of the disease, which develops in elderly and causes death, is quite low. Today, anaplastic thyroid cancer patients are treated surgically, but factors such as tumor location, size and invasive character of tumor, make it necessary to investigate alternative therapies. Studies have shown important advances in the treatment of anaplastic thyroid cancer with drugs such as paclitaxel and cisplatin. However, when the side effects of chemotherapeutic agents are considered, new agents are required to support the treatment.

Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyplavone) is a flavonoid found in fruits and vegetables such as apples, onions, broccoli, strawberries, cherries, peas and green tea, and efficacy of quercetin has been proven in cancer cells such as lung, colon, breast, prostate cancer. Boric acid is a mineral whose effects are reported for the treatment of some cancers such as prostate. The aim of this study is to determine the antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects of quercetin and quercetin-boric acid combinations on 8305C human anaplastic thyroid carcinoma cells. 8305C human anaplastic thyroid cancer cells were treated with quercetin at a dose range of 0-1000 μg/ml for 24, 48 and

72 hours and the IC_{50} values were determined by MTT test. 100, 150, 200 μg/ml quercetin concentrations and the same quercetin concentrations combined with 200, 250, 300 μg/ml boric acid concentrations respectively, were treated with cells for 24 hours. The proliferative effect was determined as immunocytochemically by PCNA and the apoptotic effect was also determined by TUNEL method on 8305C human anaplastic thyroid cancer cells. SOD and GSH antioxidant levels and oxidative stress parameter MDA level were determined spectrophotometrically. The results were statistically analyzed in Graphad Prism 8.0.2 with Two-Tailed Mann-Whitney and One-way ANOVA tests, and $p<0,05$ was considered statistically significant. Quercetin IC_{50} values were determined 138 μg/ml, 84 μg/ml and 22 μg/ml for 24th, 48th and 72th hours, respectively on 8305C anaplastic thyroid cancer cells. It was determined that quercetin and quercetin-boric acid combinations significantly decreased PCNA cell proliferation depending on increasing dose on 8305C human anaplastic thyroid cancer cells compared to the control group ($p<0,01$). Similarly, it was observed that the number of apoptotic cells were significantly increased compared to the control group by TUNEL test on 8305C anaplastic thyroid cancer cells which were treated with quercetin and quercetin-boric acid combinations ($p<0,01$). As a result of the antioxidant activity analysis, it was determined that SOD and GSH levels increased in 8305C anaplastic thyroid cancer cells with different concentrations of quercetin and quercetin-boric acid combinations and MDA levels decreased. According to the results, quercetin and quercetin-boric acid combinations were determined to have antioxidant and apoptotic effects on 8305C human anaplastic thyroid cancer cells. However, the usage of quercetin and quercetin-boric acid combinations as an alternative therapeutic agent should be supported by in vivo experiments for 8305C human anaplastic thyroid cancer.

Keywords: Quercetin, boric acid, apoptosis, antioxidant, 8305C human anaplastic thyroid cancer

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kanser, DNA hasarının yol açtığı anormal ve kontrolsüz hücre bölünmesidir. Organizmanın yaşamı boyunca gözlemlenebilen DNA hasarı, normal koşullarda DNA onarım mekanizmaları ve apoptoz mekanizması ile ortadan kaldırılmaktadır. Ancak yüksek düzeyde mutasyon ile onarım mekanizmaları ve programlı hücre ölüm sistemindeki bozukluklar, hasarın giderilememesine yol açar. Apoptoza uğramayan ve metastaz yapabilen kanser hücreleri, çeşitli kötü koşullara adapte olabilen agresif hücrelerdir. Normal hücrelerin belirli hacim ve sayıya ulaşması sonucu proliferasyon sona ererken, kanser hücrelerinde büyüme süreklidir ve bu da kanser hücrelerinde sınırsız bölünmeye neden olmaktadır. Günümüzde kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler, immünoterapi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [1, 2]. Anaplastik tiroid kanseri (ATC), insanlarda nadir görülen fakat en ölümcül malignant tümörlerden biridir. ATC, yüksek oranda metastaz riski taşır ve pek çok hastada tümörün başta akciğer olmak üzere, kemik ve beyin gibi doku ve organlara sıçradığı bildirilmiştir [3]. ATC hastalarına cerrahi ve radyoterapi yöntemleri uygulansa da, ortalama yaşam süresi tanı konulmasından itibaren 3 ila 9 ay arasında değişmektedir. Bu durum alternatif tedavi stratejilerini gündeme getirmiştir. 67 yaşında bir kadın hastada saptanan, bir yüzeye tutunarak büyüyebilen epitelyal morfolojideki 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri in vitro tedavi stratejilerinin araştırılmasında kullanılmaktadır [3-5].

Biyoflovonoidler arasında en çok bilinen ajanlardan biri olan kuersetin, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve çeşitli kanser hatlarında etkinliği ispatlanmış antioksidan bir bileşiktir [6-9]. Kuersetinin kanser hücrelerindeki etkileri üzerine yapılan çalışmalarda

proliferasyonu baskıladığı, apoptozu teşvik ettiği, oksidatif strese karşı koruyucu etkileri olduğu ve lipid peroksidasyonunu engellediği bildirilmiştir [10]. Yapılan çalışmalarda; güçlü bir anti-kanser ajan olan kuersetinin meme, prostat, lösemi gibi pek çok kanser türünde hücre proliferasyonunu durdurduğu ve hücre siklusunu baskılayarak veya apoptotik hücre ölümünü uyararak anti-kanser etkisini gösterdiği rapor edilmiştir [6-9]. Kuersetinin, kanser hücrelerinin yanı sıra normal hücrelerin hücre döngüsü ve proliferasyon sürecinde de etkili olduğu bildirilmiştir. Kuersetinin antioksidan ve anti-kanser etkinliğine yönelik sıçanlarda yapılan çalışmalarda, kadmiyum ve arseniğin zararlı etkilerine karşı koruyucu etkilerinin bulunduğu; kuersetin uygulamasının Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) pozitif hücre sayısının artışını; Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (Tdt) aracılı dUTP-Biotin Nick Uç- Etiketleme (TUNEL) pozitif hücre sayısının ise azalmasını sağladığı rapor edilmiştir [11-12].

Borik asit, bazı kanserlerin önlenmesinde ve tedavisinde kullanılan hayvanların büyüme ve gelişmesinde etkili olduğu bildirilen bir mineraldir. Yapılan çalışmalarda; borik asidin baş ve boyun kanseri hücreleri ve prostat kanseri hücre soylarında, hücre proliferasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği bildirilmiştir [13-15].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, antioksidan özelliklere sahip doğal terapötik ajanlardan kuersetin ile kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki proliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin incelenmesidir.

1.3 Hipotez

Bir flavonoid olan kuersetinin, kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda antioksidan özelliklere sahip olduğu, antiproliferatif ve apoptotik etkileri olduğu bildirilmektedir. Benzer biçimde borik asidin prostat, baş-boyun kanser hücreleri tedavisinde etkili olduğu rapor edilmiştir. Anaplastik tiroid kanseri tedavisinde en ideal yöntemin kemoterapi olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla kemoterapi tedavisinde etkili alternatif terapötik ajanların belirlenmesi önemlidir. 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının etkilerinin belirlenmesi öngörülmektedir. Bu çalışma ile 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücre soyunda kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının antiproliferatif,

apoptotik ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının sitotoksik etkisinin 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5 difenil tetrazolyum bromid (MTT) yöntemi ile; proliferatif etkisinin PCNA yöntemi ile; apoptotik etkisinin ise TUNEL yöntemi ile tayini amaçlanmıştır. Süperoksit dismutaz (SOD), redükte glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) parametreleriyle ise kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki antioksidan etkinlikleri test edilecektir. Çalışma sonucunda kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde proliferasyonu durdurarak apoptozu teşvik etmesi beklenmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Tiroid Kanseri

Tiroid; salgıladığı hormonlarla dolaşım, sindirim gibi sistemlerin düzgün bir biçimde çalışmasını sağlayan endokrin sistemin en önemli organlarından biridir. Tiroid bezi boynun ön kısmında lokalize olan ortalama 20-30 gr ağırlığında bir yapıdır. Tiroid bezinin olması gerekenden az ya da fazla hormon salgılaması bugün toplumumuzda da sık görülen tiroid hastalıklarına yol açmaktadır. Bu hastalıklardan biri olan tiroid kanseri yaygın bir kanser türüdür ve yıllık insidansı her 100.000 kişide 0.5 ile 10 arasında değişir. Tiroid yapısındaki neoplazi, epitel doku ve bezlerde meydana gelen malign tümörlerden biri olduğundan karsinom olarak isimlendirilir. Tiroid karsinoması oluşum mekanizması ve yayılım şekillerine göre; Foliküler Tiroid Karsinoması (FTC), Papiller Tiroid Karsinoması (PTC), Medular Tiroid Karsinoması (MTC) ve Anaplastik Tiroid Karsinoması (ATC) olmak üzere 4 gruba ayrılır. PTC, tüm tiroid kanseri vakalarının % 85-90'ından sorumlu olup, bunu FTC (%5-10) ve MTC (yaklaşık %2) takip etmektedir. ATC ise, tiroid kanserlerinin yaklaşık %2'sinden sorumlu olmasına rağmen tiroid kanserlerinin en ölümcül türüdür [16, 17].

2.1.1 Anaplastik Tiroid Kanseri

Anaplastik tiroid kanseri, tiroid salgılarını üreten foliküler epitel hücrelerinden kökenlenen farklılaşmamış bir tümördür. İnsanlardaki en agresif neoplazmlardan biri olan ATC, tiroid kanserine bağlı ölümlerinin %40'ından sorumludur. ATC'ye yakalanan hastalarda ortalama sağkalım süresi ise yalnızca 6-8 aydır. Bununla beraber hastalık 60 yaşın üzerindeki kişilerde ve kadınlarda daha sık görülür [3]. Boyun bölgesinde lezyon

oluşumu, zayıflık, solunumda güçlük, tükürükte kan gözlenmesi ve ses kısıklığı hastalığın belirtilerinden bazılarıdır. Ayrıca yaş, cinsiyet, genetik faktörler, radyasyon ve guatr hastalık patogenezinde risk faktörleridir [18].

ATC tümörleri çok hızlı çoğalır ve apoptoza direnç gösterek metastaz yapar. Bu yüzden genelde tanı konduğunda hastalık zaten ileri safhalardadır. Hastalığın tanısı için; ultrasonla biyopsi yapılması, radyoaktif iyotla görüntüleme, bilgisayarlı tomografi, X-ray gibi pek çok yöntem mevcuttur. Ancak kimi zaman hastaların ilerleyen yaşı, tanının geç konması ile birleşince tedavi olasılığı azalmaktadır. ATC için standart bir tedavi yerine tümörün büyüklüğü, metastaz durumu ve hastanın yaşına göre kişiye özel bir tedavi yöntemi belirlenir. Ancak günümüzde ATC hastaları için cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerine başvurulsa da etkin bir tedavi yöntemi yoktur [4, 18, 19].

2.2 Flavonoidler

Bitki özleri ve bunların saflaştırılmış aktif bileşenleri kanser kemoterapötiklerinin temelini oluşturmaktadır. Günümüzde anti-kanser bileşiklerinin %70'inden fazlasının doğal ürünler veya doğal ürün türevi maddeler olduğu tahmin edilmektedir. Bu bileşikler arasında en çok bilinenler ise flavonoidlerdir. Bugüne dek 4000'den fazla flavonoid çeşidi tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin esas kaynağı ise çoğunlukla bitkilerdir [20].

İlk olarak 1936 yılında Macar Bilim Adamı Albert Szent-Gyorgi tarafından biyolojik sistemlerdeki etkileri üzerine yapılan araştırmalarla önemi anlaşılan flavonoidler, üstlendiği fonksiyonlardan dolayı önceleri P vitamini olarak adlandırılsa da yapısal olarak vitaminlerden farklılık göstermektedir [21]. Flavonoidler; çiçekli bitkilerde tat, koku, renk oluşumunda rol oynayan, bitkinin gelişimi ile çevresel tehditlere karşı korunmada katkı sağlayan bitkiler aleminde çok yaygın bir sekonder metabolittir. Meyve, sebze ve çayda yoğun biçimde bulunduğu bilinen bu bileşikler insan diyetinde günde ortalama 1 gr alınmaktadır [20, 22].

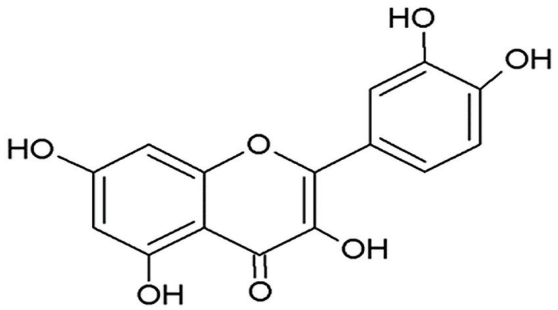
Flavonoidler; anti-kanser, anti-mutajenik, anti-viral, anti-tümör, anti-alerjik, anti-enflamatuar etki gösterirler. Ayrıca flavonoidlerin, tümör gelişiminde proliferasyonu inhibe ettikleri ve serbest radikalleri yok ettikleri belirlenmiştir [23]. Flavonoidler, hücre döngüsünün kontrolü ve hücre sinyal iletiminde etkili olup; proliferasyonu inhibe ederek apoptozu teşvik etme sürecinde rol oynarlar. Kimyasal olarak birbirine benzeyen

flavonoid moleküllerini birbirinden ayıran, farklı karbon atomlarına farklı sayıda bağlanan hidroksil gruplarıdır [10, 23, 24].

2.2.1 Kuersetin

Kuersetin flavonoidlerin flavanol alt grubunun bir üyesidir [24]. Latince Quercetum (Meşe Ormanı) kelimesinden gelen ve ilk defa bu bitki reçinesinden elde edilen bir flavonoiddir. Kuersetin, soğan başta olmak üzere brokoli, kiraz, çilek, elma, üzüm, domates gibi meyve ve sebzelerde; tohum, fındık, çay ve kırmızı şarapta yoğun olarak bulunur [25]. Kuersetin oda sıcaklığında katı halde bulunan, sarı renkli bir bileşiktir. Formülü:$C_{15}H_{10}O_{7,}$ molekül ağırlığı:302,24 g/mol, saflığı: ≥ %95, erime noktası:314 °C 'dir. Kuersetinin etil alkol, Dimetilsülfoksit (DMSO), Dimetilformamid (DMF) gibi organik çözücülerde iyi çözündüğü bildirilmiştir [26].

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksifavanon veya 3,3',4',5,7-pentahidroksi-2-fenilkromen -4-on) yapısında 3 halka ve 5 hidroksil grubu mevcuttur (Şekil 2.1) ve özgün yapısı OH gruplarının sayı ve konumlarından kaynaklanmaktadır [27].



Şekil 2.1 Kuersetinin kimyasal yapısı [28]

Yapılan çalışmalarda polifenolik bir bileşik olan kuersetinin; anti-viral, anti-ülser, anti-diyabetik, antiproliferatif, antioksidan, anti-kanser ve anti-enflamatuar etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple metabolik ve enflamatuar rahatsızlıkların tedavisinde sıkça başvurulan bir biyoflavonoiddir. Ayrıca protein kinaz C-inhibitörü, hücre döngüsü modülatörü ve anjiyogenez inhibitör etkileri ile anti-agregan ve vazodilatatör etkilerinin olduğu da bilinmektedir [10, 29]. Kuersetin mast hücreleri üzerinden histamin salınımını inhibe ederek anti-alerjik etki gösterir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda; kuersetin tüketiminin astım hastalığına karşı koruyucu etki sağladığı anlaşılmıştır. Ayrıca kuersetin, solunum ve sindirim sisteminde enfeksiyonlara yol açan pek çok

bakteriyi etkisiz hale getirir. Kuersetin, enflamatuar enzimler siklooksijenaz ve lipooksigenazı inhibe ederek iltihabın etkisini azaltır [30, 31].

Kuersetinin blastomer sayısı, zona pellusida kalınlığı ve aktinomisin D'ye maruz kalan fare embriyolarının kuluçka oranı üzerine etkisini araştıran bir araştırmada, embriyo büyümesi üzerinde etkili olduğu, aktinomisin D'nin embriyoların büyümesi üzerindeki yıkıcı etkilerini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir [32].

Kuersetinin miyokard iskemisi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri üzerine yapılan bir araştırmada; kuersetin tedavisinin kalp fonksiyonlarını önemli ölçüde iyileştirdiği, miyokard hasarını azalttığı bildirilmiştir [33]. Lu ve arkadaşlarının (2017), yaptığı bir araştırmada, yüksek fruktoz ile beslenen farelerde kuersetinin aterosklerotik plak gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir [34].

Kuersetin; serbest radikaller, lipid metabolizması ve kardiyovasküler hastalıklara karşı oynadığı rollerle de ilgi çekicidir. Kuersetin tüketimi damarda trombositlerin kümeleşmesini ve kan pıhtısı oluşumu sonucu tıkanmasını önler. Böylece kalp hastalığı ve inme riskini azaltır. Farklı flavonoidlerle birlikte kullanıldığında da olumlu etkiler yarattığına ilişkin bulgular mevcuttur [35, 36]. Bu sarı renkli flavonoid sigara gibi serbest radikallerin çevresel etkilerine karşı koruma da sağlar. Kuersetin ve konjuge metabolitleri, eritrositleri sigaranın neden olduğu hasardan korur. Ayrıca insan yağ hücrelerinde yağ birikimini önleyerek bağışıklığı güçlendirir. Bunun yanı sıra kandaki glikoz alımını engeller, yağ hücresi üretimini bloke eder ve yağ hücresi nekrozunu arttırır. Kolesterol ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltır [37].

Kuersetin; DNA topoizomeraz I/II'nin inhibisyonu, sitokrom c'nin stoplazmaya salınması, kaspaz aktivasyonu ve mitokondriyal membran potansiyelinin değişimi gibi farklı mekanizmalarla antikanser etkilerini gösterir. Ayrıca kuersetin, apoptozun teşvik edilmesini sağlayan proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırırken, apoptoz inhibisyonuna neden olan Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin seviyesinin azalmasını sağlamaktadır [38, 39].

2.3 Borik Asit

Ülkemiz bor mineralleri rezervi bakımından dünyada birinci sıradadır. Bor, işlenerek tarım, sanayi, inşaat, sağlık gibi pek çok alanda kullanılmaktadır [40].

Bor, periyodik tablonun 3A grubunda yer alan yarı metal olarak sınıflanan bir elementtir.

Bor özellikle oksijen için yüksek afiniteye sahip olduğundan doğada serbest halde bulunmaz; borik asit ya da borat tuzları biçiminde 250'den fazla mineral yapıda bileşik halinde bulunur. Borun uygun sıcaklıkta su ile veya mineral asitleri ile tepkimesi sonucu borik asit oluşur [41].

Borik asidin prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir [42]. Çalışmalar, borik asidin hayvanlarda büyüme ve gelişmede etkili olduğunu işaret etmektedir. Örneğin borik asidin alabalıkta embriyonik büyümeyi uyardığı; kurbağalarda yumurta olgunlaşması ve embriyonik büyüme üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir [13, 43].

2.4 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir ya da birkaç eşlenmemiş elektron bulunduran kısa ömürlü, yüksek enerjili, reaktif ve kararsız atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller, eşlenmemiş elektron barındırmaları nedeniyle çevrelerindeki sağlıklı hücrelere saldırarak kararsız yapıdan kurtulmaya ve elektronlarını tamamlamaya çalışmaktadır. Serbest radikallerin bu davranışları, elektron kaybeden hücrenin DNA, protein gibi biyomoleküllerinin yapısını bozarak genom ve metabolizmasında hasar oluşturulmasına yol açar. Serbest radikallerin organizmada lipidlerle reaksiyonu sonucu gerçekleşen lipid peroksidasyonu hücre membranının yapısını bozar. Bu moleküller, proteinlerin fonksiyonunda bozulmaya neden olur. Ayrıca serbest radikaller DNA'nın yapısını bozarak oksidatif hasara sebep olur ve yaşlanma sürecini hızlandırır [44-46].

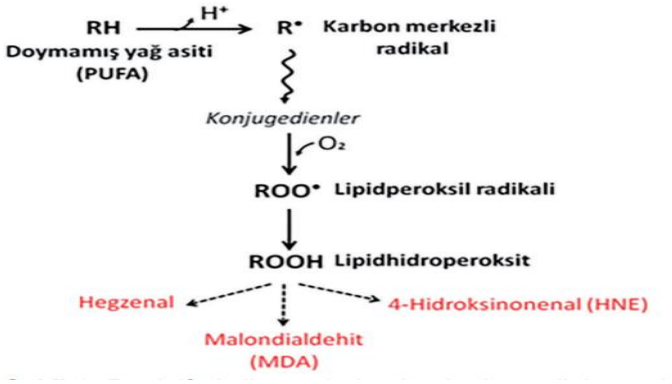
Serbest radikaller, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri olmak üzere ikiye ayrılır. ROS kendi içinde radikaller ve nonradikaller olmak üzere iki sınıftır. Radikaller; eşlenmemiş elektrona sahip, kararsız ve yüksek düzeyde reaktif moleküllerdir. Nonradikaller ise; eşlenmemiş elektronu olmayan bileşiklerdir. Serbest radikaller endojen ve ekzojenlerce üretilir. Endojen kaynaklı oluşan serbest radikallere; kanser, yaşlanma, enflamasyon, enfeksiyon ve lipid peroksidasyonu yol açarken; ekzojen kökenli serbest radikaller ise; çevresel kirlilik, ağır metaller, bazı ilaçlar, sigara ve alkol gibi etmenlere maruziyet sonucu oluşur [47].

Antioksidan moleküller, metabolizma sonucu meydan gelen ROS'u yok ederler. Ancak bazı durumlarda antioksidan sistem, ROS'u yeterince ortadan kaldıramaz ve bu durum oksidatif stres olarak nitelendirilir. Oksidatif stres; DNA-protein çapraz bağlanmasına,

karbonhidrat modifikasyonlarına ve DNA onarım mekanizmalarının baskılanmasına yol açar [47, 48]. Oksidatif stres; başta kanser olmak üzere pek çok kronik ve dejenaratif hastalığın gelişimine yol açar. Parkinson, down sendromu, diyabet, serviks kanseri gibi hastalıkların ve yaşlanmanın ortaya çıkışında oksidatif stres mekanizması rol oynar. Oksidatif stres, DNA üzerinde kırıklara ve modifikasyonlara yol açarken, düşük seviyelerde tamir mekanizmaları ile bu hasar giderilmektedir. Ancak yüksek seviyede oksidatif stres ile DNA polimerazın işlevini yitirmesi ve onarım mekanizmasının iş görememesi, DNA'nın kendini düzgün biçimde eşlemesini engeller. Bu da genomun stabilitesini zedeleyerek gen bölgesinden üretilen proteinin de dejenere olmasına yol açar [49, 50].

2.4.1 Malondialdehit (MDA) Aktivitesi

Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden biri de hücre zarında gerçekleşen lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu sürecinde yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu lipid hidroperoksitleri (ROOH) ve yapısında iki çift bağ içeren alkenlerden konjuge dienler oluşur. Bu bileşikler daha sonra Malondialdehit (MDA) ve hidrokarbonlar gibi çeşitli aldehit formlarına dönüştürülür (Şekil 2.2). Lipid peroksidasyonun en önemli ürünlerinden olan MDA, yarattığı tahribat nedeniyle zararlı bir moleküldür. Hücre membranlarında iyon alış-verişinde rol oynayan MDA; membran yapısındaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve enzim aktivitesinin değişimine neden olur. MDA, hücre membranlarından rahatça geçerek ve hücredeki protein, DNA ve fosfolipidlerle reaksiyona girerek hücrede mutasyon ve kansere neden olur. Lipid peroksidasyonu oksidatif hasarın göstergesi olarak kabul edildiğinden, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesi kanser araştırmalarında kullanılmaktadır [51].



Şekil 2.2 Malondialdehit oluşumu [48]

2.5 Antioksidanlar

Antioksidanlar; serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı moleküllerin oksidasyonunu yavaşlatan hatta önleyen moleküllerdir. Antioksidan savunma sistemi organizmada metabolizma sırasında oluşan ve biriken ROS'u yok eder. Bazı antioksidanlar, serbest radikallerin eksik elektronunu tamamlayarak zararlı etkilerini azaltır. Ancak serbest radikalleri süpüren bu sistemde antioksidan seviyesinin yetersizliği veya antioksidan enzimlerin inhibisyonu durumunda tetiklenen oksidatif stres, hücrelerin zarar görmesine yol açar [47]. Antioksidanlar, ROS'u; serbest radikallere hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma, ROS'un fonksiyonlarını bastırma, serbest radikallerin yol açtığı harabiyeti giderme ve ROS ile etkileşime girerek bağlama gibi yollarla süpürür [52]. Antioksidanlar etki mekanizmalarına göre ise; birincil ve ikincil antioksidanlar olarak sınıflandırılırlar. Birincil antioksidanlar; serbest radikallerle etkileşime giren, bunların daha az zararlı formlara dönüşmelerini ve hücre içinde farklı bölgelere geçişini engelleyen glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz gibi enzimlerdir. İkincil antioksidanlar; polifenoller, C ve E vitamini gibi zincir reaksiyonlarını kıran bileşiklerdir [44, 53].

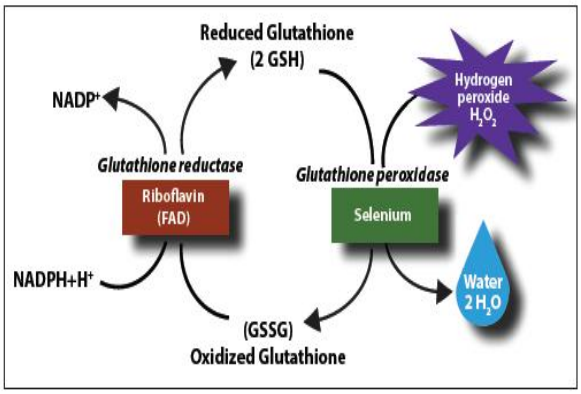
2.5.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD); süperoksit radikalini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren antioksidan enzimdir. Süperoksit radikali, aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile oluşur. Süperoksit radikali hidrojen iyonlarıyla bir yükseltgenme indirgenme reaksiyonuna girer. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Böylece SOD'un reaktif süperoksit anyonunu hedeflemesiyle hücre hasardan korunur [54].

SOD, görevini yapabilmek için bir kofaktöre ihtiyaç duyar. Bu yüzden yapısında kofaktör olarak bakır, çinko, manganez gibi metal iyonları bulunur. Hücrede lokalize olduğu bölgeye göre farklı formda bulunan SOD; sitozol ve nukleusta Cu-Zn SOD biçiminde, mitokondride ise Mn-SOD olarak bulunur. SOD, aerobik hücre ve hücre dışı sıvılarda yaygın olarak bulunur. Bu özelliğinden dolayı pek çok canlıyla ilgili laboratuvar çalışmasında SOD enzim aktivitesi üzerinden antioksidan kapasite tayin edilebilir [54, 55]. SOD enziminin, kanser progresyonunu düzenleyebileceği bildirildiğinden SOD enzim aktivitesi, kanser araştırmalarında kullanılan önemli bir parametredir [56].

2.5.2 Redükte Glutatyon Aktivitesi (GSH)

Glutatyon disülfid redüktaz, hidroperoksitlerin indirgenmesi ile okside glutatyonun (GSSG), nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) varlığında redükte glutatyona (GSH) dönüşümünü katalizler (Şekil 2.3). Protein alt ünitelerinde flavin adenin dinükleotid (FAD) bulunan glutatyon redüktaz, FAD'ı indirgeyip GSSG molekülündeki disülfit bağını kırarak elektron transferi üzerinden GSH oluşumunu sağlamaktadır. Hücrede antioksidan sistemin yanı sıra protein ve DNA metabolizmasının sağlıklı işleyebilmesi için GSH ve GSSG düzeyi belirli bir dengede bulunmalıdır. Bu dengenin bozulması, GSSG ve NADPH seviyesinin azalmasına ve glutatyon redüktazın inaktivasyonuna yol açar [57, 58]. GSH düzeyi ile hücre proliferasyonu ilişkili olduğundan, kanser araştırmalarında GSH seviyesinden yararlanılmaktadır [59].



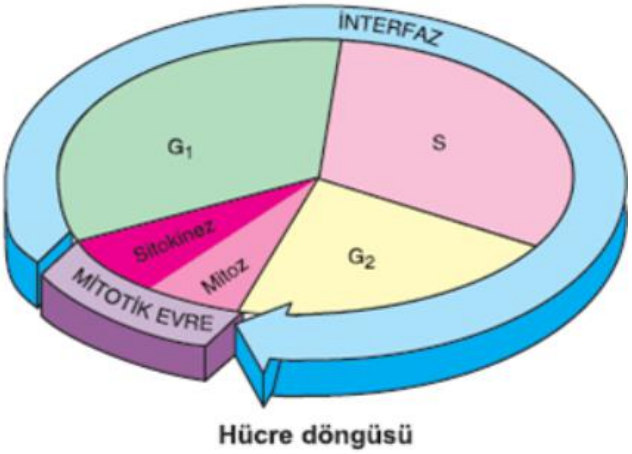
Şekil 2.3 Okside ve redükte glutatyon oluşumu [60]

2.6 Hücre Siklusu

Hücre siklusu; iki hücre bölünmesi arasındaki hücrede gözlemlenen çeşitli biyokimyasal olaylar ile morfolojik değişimleri ifade eden zaman döngüsüdür. Hücre bölünmesi tek hücrelilerde üremeyi, çok hücreli organizmalarda kalıtım materyalinin nesiller boyunca aktarılması ile organizmanın hayatını devam ettirebilmesi için gerekli metabolizmanın devamlılığını sağlar. Bölünebilen tüm hücrelerde aynı şekilde gerçekleşen bu döngü, bölünme yeteğine sahip olmayan sinir ve alyuvar hücrelerinde farklılık gösterir [61].

Hücre siklusu temelde mitoz ve interfaz bölünmesi olarak iki esas bölüme ayrılır (Şekil 2.4). Henüz bölünme mesajı almayan hücreler siklusun dinlenme evresi olan G_0 fazında bulunurlar. S fazına girmeyen hücre G_0 evresinde çok uzun bir süre dinlenme fazında bulunabilir. Bu hücrelere sinir ve kas hücreleri örnek gösterilebilir. Bölünme mesajı

alan hücreler ise bir hazırlık safhası geçirirler. Oldukça uzun süren bu döneme interfaz denir. İnterfaz evresi G_1, S ve G_2 fazlarından oluşur. G_1 evresinde hücrede metabolik olaylar süratle gerçekleşir, protein sentezi ve organel sayısı artar. Aynı zamanda ATP sentezi de hızlanır. G_1 evresinde DNA replikasyonu öncesi hazırlık yapılır. Bu evrenin süresi hücreden hücreye farklılık gösterir. S evresinde hücrede RNA ve protein sentezi daha da hızlanır. Bu evrede en önemli olay DNA'nın kendini eşlemesidir. G_2 evresinde protein ve RNA sentezi devam eder. Sentrozomların eşlenmesi biter ve hücre mitoz bölünmeye hazırlanır [62].



Şekil 2.4 Hücre döngüsü aşamaları [63]

2.6.1 Hücre Siklusunun Kontrolü

Belirli bir program çerçevesinde gerçekleşen hücre siklusu kontrol edilmezse kontrolsüz hücre bölünmesi denilen kanser görülür. Bu nedenle tümör gelişimini baskılamak için hücre siklusunun kontrolü önem taşır. G_1, G_2 ve M evresinde bulunan kontrol noktaları dur ve devam et mesajıyla siklusta bir evre tamamlanmadan diğerine geçilmesini engeller. G_1 kontrol noktasında hücre yeterli büyüklüğe erişmişse, DNA hasarı yoksa ve besin ile büyüme faktörü mevcutsa döngü devam eder. Aksi halde dur mesajı gönderilir. G_2 kontrol noktasında ise hücre hacmi kontrol edilir ve DNA replikasyonunda hata olup olmadığına bakılır. DNA'da hasar yoksa döngü devam eder. Son olarak M kontrol noktasında kinetekorların iğ ipliklerine bağlanmasının kontrolü sağlanır [64, 65].

2.6.2 Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA)

Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA) ilk kez 1978 yılında Miyachi ve arkadaşları tarafından prolifere hücre çekirdeğinde tespit edilmiştir. 262 amino asit ve 36

kilodaltonluk asidik bir non histon protein olan PCNA, DNA'yı halka şeklinde çevreleyerek replikasyon çatalını yönetir. Replikasyonda ve DNA onarımında rol oynayan PCNA geninin tüm ökaryotlarda bulunması, onu hücre siklusu tespitinde iyi bir marker yapmaktadır [66, 67].

Hücre döngüsü boyunca eksprese edilen ve siklin (cyc) olarak da bilinen PCNA markerı sayesinde hücrenin bölünmenin hangi safhasında olduğu anlaşılabilir. PCNA ekspresyonu; DNA sentezinin başlangıcından önce artar, S fazında maksimum seviyeye ulaşır, G_2 ve mitoz fazlarında ise düşüş gösterir. PCNA seviyesi, hücre bölünmesi ile korelasyon gösterdiğinden PCNA, hücrenin proliferasyon düzeyini işaret eder [68, 69].

Kanser tanısında PCNA, önemli bir hedeftir. PCNA inhibitörleri potansiyel anti-kanser ajanlar olarak proliferasyonun baskılanmasını sağlar. İmmünohistokimyasal ve immünositokimyasal olarak tespit edilebilen PCNA ekspresyon tayininde monoklonal PCNA antikorları yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu yönde geliştirilen kitlerin morfolojik tespit imkanı sunması araştırmacılara kolaylık sağlamaktadır [70].

2.7 Apoptoz

Kompleks organizmalarda hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Nekrotik hücre ölümü patolojik durumlarda organizmanın planlamasının dışında gerçekleşir ve bu yönüyle apoptozdan ayrışır [71]. Apoptoz ise programlı hücre ölümünü ifade eder ve bir hücrenin belirli uyarıları aldıktan sonra aktif bir ölüm yoluna girdiğini göstererek hücrelerin belli bir zamanda öldürülmesine programlandığı durumlardır. Apoptoz mekanizması canlıların gelişiminde pek çok süreçte gözlenebilir. Metamorfazda kurbağa kuyruğunun yok olması, el ayak parmaklarının oluşumu sırasında fetusun parmaklarının arasındaki zarın kaybolması, memeli sinir sisteminin gelişimi sırasında nöronların bir kısmının eliminasyonu ve menstruasyon döneminde uterus iç kısmındaki hücrelerin ortadan kaldırılması gibi olaylarda apoptoz rol oynar [72, 73]. Organizmada hücre sayısının; hücrelerin hayatta kalmasını etkileyen etkenlerin yanı sıra proliferasyon ve farklılaşmayı etkileyen mekanizmalar tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Organizma bir yandan mevcut hücrelere yenilerini eklerken öte yandan ömürlerini tamamlamış ya da hasarlı hücreleri ortadan kaldırır. Böylece hem hücre sayısı belli bir dengede tutulur hem de çeşitli hastalıkların önüne geçilmiş olur. Patogenez sürecinde en sık karşılan durumlardan biri; hasarlı DNA'daki mutasyon ve

apoptotik yolak bozukluklarının sebep olduğu tümör oluşumudur. Tümör oluşum ve gelişimini belirleyen başlıca faktörler ise hücre bölünmesi ile programlı hücre ölümüdür. Artan kontrolsüz proliferasyon ile apoptozun azalması kanser sürecini tetikler [74, 75]. Organizmalarda genom, hücre sayısının sabit tutulması ve tümör gelişen hücreleri ortadan kaldırmak için apoptoz mekanizmasını kullanmaktadır. Bir başka deyişle apoptoz yaşlı/hasarlı/kanserli hücrelerin ölümünü sağlamakta; mitoz ise hücre bölünmesi vasıtasıyla mevcut hücrelere yenilerini eklemektedir. Böylece bir yandan mitozla hücrelerin proliferasyonu gerçekleşirken, öte yandan da apoptozla hücrelerin yıkımı sağlanmaktadır. Eşgüdüm ve bir program dahilinde gerçekleşen bu iki olay arasında bir denge mevcuttur. Bu dengenin bozulması ise kontrolsüz hücre bölünmesine yol açabilmektedir. Kontrolsüz ve sürekli olarak bölünen hücreler normal hücrelerin besin ve enerjilerini de kullanarak işlevlerini yerine getirememesine sebep olmaktadır. Bu anomaliyi ortadan kaldırmak için gerçekleştirilen kanser tedavisinde amaç proliferasyonu baskılamak olduğundan apoptoz kadar hücre siklusunun anlaşılması da önem taşımaktadır [76].

2.7.1 Apoptoz Mekanizması

Genlerin çevresel sinyallerle etkileşimi ile viral enfeksiyon, DNA hasarı gibi durumlarda bir savunma işlevi olarak apoptoz indüklenir. Çünkü mutant genom gerek organizmanın canlılığını sürdürmesinde gerekse kalıtsal bilginin sonraki nesillere aktarımında potansiyel bir risk taşır. DNA hasarına karşı genlerin tepkisi hücrenin ölümü olduğunda, hücre ölüm sinyalleri membrana iletilir ve proteolitik enzimler hücreye girer. Bir protein ailesi olan kaspazlar; hücrede pek çok hedef proteini kesen proteazlardır. Kaspazların hedefleri arasında; Dnaz inhibitörü (ICAD), nukleus laminler, hücre iskeleti ve golgi matriks proteinleri yer alır ve kaspazlar hücre, golgi, nukleus ve DNA'nın parçalanmasını sağlarlar. Normal koşullarda hücrede inaktif formda bulunan kaspazların apoptoz sürecinde aktivasyonu, zincirleme reaksiyonları tetikler. Apoptoz emri alan hücrede protein ve DNA parçalanmasından sorumlu olan kaspazlar, bu sırada DNA tamir ve replikasyonunda görevli enzimlerin aktifleşmesini de engeller. Ayrıca kaspazlar, fosfotidilserinin hücre yüzeyine aktarılmasını sağlarlar [77, 78].

Hücrenin ölüm süreci proapoptotik ve antiapoptotoik genler arasındaki denge sonucu belirlenir. Proapoptotik genler hücreyi apoptoza götürürken, anti apoptotik genler ise apoptozu inhibe eder. Bcl-2 proteinlerinin, hücreleri; ROS'un yarattığı ve kansere yol

açan stresten ve iyonize radyasyondan koruduğu bilinmektedir [79].

Apoptotik hücre ölüm süreci; uyarana, hücre tipine ve apoptotik yolağa bağlıdır [80, 81]. Memelilerde apoptozu uyaran yollar, Bcl-2 ailesi proteinlerinin katılımlarına ve hücre ölümünü başlatan kaspazın tipine göre hücre içi ve dışı kaynaklı olarak gruplandırılır. Hücre içi kaynaklı yol DNA hasarı ve hücresel stres tarafından etkinleştirilirken, hücre dışı kaynaklı yol diğer hücrelerden gelen sinyaller tarafından etkinleştirilir. Hücre dışı uyaranlar; Tümör nekröz faktör (TNF), koloni uyarıcı faktör (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), glukokortikoidler, radyasyon, bazı antijenler iken, hücre içi uyaranlar arasında; p53 aktivasyonu, kalsiyum seviyesinin artması, onkogenler, hipetermi, hipoksi ve bazı enfeksiyonlar yer alır. Apoptoz; intrinsik (Mitokondriyal) ve ekstrinsik yol olmak üzere iki şekilde gerçekleşir [82, 83]. Tiroid kanseri hücrelerinde apoptozu indükleyen faktörler; Kaspaz, Tümör nekroz faktörü (TNF), Fas antijeni, Fas ligand (FasL), İnterlökin 1ß, p53 proteinidir. Apoptozu inhibe eden faktörler ise: TSH, Tiroid uyarıcı antikor, bcl-2 proto-onkojendir [84].

Apoptotik ölüm şeklinin instrinsik yolağı pek çok molekülün etkileşimi ve son derece karmaşık bir süreç sonunda gerçekleşir. Bcl-2 ailesine mensup proteinlerin inaktivasyonu ve kaspazların aktif rolü bu yolağın karakteristik özelliklerindendir. Öncelikle hücresel stres sonucu ROS artışı ve Bcl-2 inaktivasyonu sonucu aktifleşen proapoptotik proteinler (Bax ve Bak) mitokondri membranının zar potansiyelini değiştirerek permeabilitesini arttırır. Böylece porlardan sitokrom-c, Smac, kalsiyum, Apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve Endonükleaz G (Endo-G) salınır. Sitokrom c: oksidatif solunumda elektron taşıma sisteminin parçası olan bir transmembran proteindir. Kaspaz-9'un aktive olmasında rol oynar. Smac/DIABLO: apoptoz inhibitör faktörünün etkisini ortadan kaldırarak apoptozu indükleyen bir proteindir. AIF: DNA'nın fragmentasyonu ve kaspaz aktivasyonunda görev alır. ENDO-G: Apoptoz uyarısıyla mitokondriden nukleusa geçerek kromatin yapıdaki DNA'yı nukleozomal fragmentlere ayırır [78, 85].

Ekstrinsik yolak hücre membranındaki ölüm reseptörleri tarafından indüklenir. Ölüm reseptörleri TNFR aile üyesi Fas ve TNFR-1 adı verilen ligandlara bağlanır. Bu durum, Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC) adı verilen hücre ölümünü başlatan kompleksin meydana gelmesini sağlar. DISC yapısındaki prokaspazın aktif kaspaz-8'i oluşturmasıyla kaspazların zincirleme aktivasyonu tetiklenmiş olur. Aktif kaspaz-8

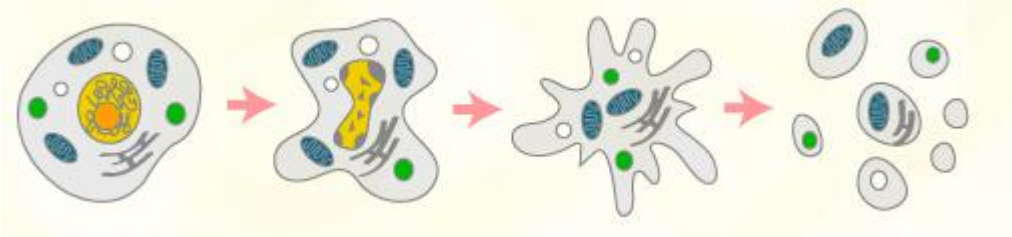
doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3, CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonunu gerçekleştirir [35]. Diğer bir ekstrinsik yol, sfingolipid yoludur. Sfingolipid türleri arasındaki denge ile kanserin proliferasyonu ya da inhibisyonu arasında ilişki olduğu bilinmektedir. Hücrelerde seramid düzeyi ile sfingozin-1 fosfat (S1P) düzeyi arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin seramid yönüne kayması hücre çoğalmasının baskılanmasına ve hücrenin apoptoza gitmesini sağlarken; dengenin S1P yönüne kayması hücrenin çoğalmasına neden olur [86]. Bir diğer ekstrinsik yol serin proteazların yer aldığı Granzim-Perforin sistemidir. Bu yolakta sitotoksik T lenfositlerin uyarımıyla hücre apoptoza gider. Bu yönüyle de klasik anlamdaki apoptoz sürecinden ayrışır. T lenfositler hasarlı veya enfekte hücreleri tanıyarak tümör oluşumunun ve enfeksiyonun yayılmasının önüne geçer. Sitotoksik T lenfositler hedef hücreye bağlandığında perforinler salınırarak por oluşturur. Bu porlar sitoplazma kalsiyum seviyesinin yükselmesini ve granzimin hücreye girişini sağlar. Granzimin serbest kalması kaspaz aktivasyonunu sağlayarak DNA'yı fragmentlere ayırır. Böylece granzimler, enfekte hücreleri ve tümör hücrelerini apoptozla yok ederler [87].

Bir tümör supresör gen olan pTEN, kanser gelişiminde rol oynayan fosfatidil inositol-3’-kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolağında görev alır. (PI3K)/Akt yolağı, protein sentezi, glukoz transportu, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi sürecinde rol oynar. Çeşitli mutasyonlar sonucu pTEN geninin inaktive olmasının kanser gelişimine neden olduğu bildirilmektedir [88]. Bir başka tümör supresör gen olan p53, transkripsiyonu düzenlenmesinin yanı sıra DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü ve apoptozda rol oynar. Çeşitli faktörler sonucu P53 geninde görülen mutasyonlar bu gen bölgesinden üretilen proteinin de aktivitesini yitirmesine yol açar. ATC vakalarında sıklıkla p53 mutasyonu görülmektedir ve ATC gelişiminin tespitinde p53 mutasyonları önemli birer belirteçtir [89-91]. Ayrıca ATC hastalarında BRAF ve KRAS mutasyonları da rapor edilmiştir [89, 92].

2.7.2 Apoptozda Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler

Apoptoz meydana gelen hücrede birtakım morfolojik farklılıklar meydana gelir. Bu morfolojik değişikliklerden biri apoptoza giden hücrenin, membranın iç tarafındaki fosfotidilserinin hücre membranının dış yüzeyine geçmesidir. Bu olay Annexin V floresan belirteçlerle belirlenebilir. Apoptotik ölüm sürecindeki bu değişiklikler farklı hücre tiplerinde oldukça benzerdir [93]. Öncelikle apoptoza uğrayan hücrenin kromatini

nukleus membranının etrafında toplanır. Apoptozun erken safhasında sodyum, potasyum gibi iletim kanalları fonksiyonlarını kaybetmeye başlar ve hücrenin büzülmesi sonucu hacmi azalır. Ardından membran kıvrımlı bir yapıya bürünür. Hücre yüzey farklılaşmaları kaybolur ve komşu hücrelerle bağlantı kesilir. Hücre membranının iç yapısındaki fosfotidilserinin dış tarafa geçişi, hücre zarında yer alan N-asetil glikozamin ve N,N-diasetilşitabroz moleküllerinin belirginleşmesi apoptotik hücrenin makrofajlarca tanınmasına olanak sağlar. Daha sonra nukleusta bulunan kromatinler yoğunlaşarak fragmentlere ayrılır, apoptotik cisimcikler gözlemlenir (Şekil 2.5). Makrofajlar ve komşu hücreler apoptotik cisimcikleri yok ederler ve bu nedenle enflamasyon oluşmaz [80, 94].



Şekil 2.5 Apoptoza giden hücredeki morfolojik değişiklikler [95]

2.7.3 Apoptozda Hücrede Meydana Gelen Biyokimyasal Değişiklikler

Apoptotik ölüm sürecinde; kaspaz aktivasyonu, DNA ve protein parçalanması ile membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından apoptotik hücrenin tanınması olmak üzere üç temel biyokimyasal değişiklik gerçekleşmektedir. Apoptozda kromatin yapısının değişimi ile birlikte önce sitozoldeki kalsiyum miktarı artmaya başlar. Kalsiyum düzeyinin artması endonükleaz ve transglutaminaz enzimlerini aktive eder. Endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu DNA'nın fragmentasyonunu başlatır. Fragmentasyon apoptotik hücrelerde Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz (CAD) enzimi tarafından DNA'nın nükleozom birimlerine ayrılmasıyla sağlanır. Apoptoz sinyali alan hücrelerde CAD, kaspaz-3 ve DNaz aktivasyonu, DNA'nın yaklaşık 200 baz çiftlik spesifik fragmanlara ayrılmasını ve bu da apoptotik hücrenin TUNEL metodu kullanılarak belirlenebilmesini sağlar [96, 97].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Laboratuvar Ekipmanları

- Laminar Flow Kabin – Hedlab X-Bio Class-II
- HEPA Filtre – Metisafe
- Inverted Mikroskop- Olympus CKX41
- Işık Mikroskobu- Nikon ECLIPSE E100
- Işık Mikroskobu - Olympus BX50
- CO_2 İnkübatör- N-Biotek Nb-203 XL
- Masaüstü Santrifüj- Hermle Z 206 A
- Karıştırıcılı Isıtıcı- Isolab
- pH Metre- Hanna
- Pipet 0,2-2 µl- Thermo Lab
- Pipet 2-20 µl- Rainin
- Pipet 10-100 µl- Rainin
- Pipet 20-200 µl- Rainin
- Çoklu Kanallı Manuel Otomatik Pipet- Thermolab
- Vortex- Velp

- Pipet Pompası- Isolab
- -80 ^{o}C Dondurucu- Thermo Scientific
- ELISA Okuyucu- Biotek Powerwave XS2
- Sterilizatör Fırın- Termal Lab
- Otoklav- Hermle
- Distile Su Cihazı- Sartorious Arium Pro
- Buzdolabı- Bosch
- Sıvı Azot Tankı- International Cryogenics, Inc. 20R
- Hassas Terazi- Shimadzu
- Bunzen Beki
- Bilgisayar- Philips

3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Serolojik Pipet - Spl Life Sciences
- Steril Plastik Pipet- Lp Italiana
- Kriyotüp- Isolab
- Kriyotüp kutusu- Isolab
- Filtre- Roth
- Yuvarlak lamel- Deckglaser
- Parafilm- Bemis
- 500 ve 1000 ml Şişe- Schott
- 6, 24 ve 96 Kuyucuklu Pleyt- Spl Life Sciences
- Steril Tek Kullanımlık Şırınga- Set Inject
- Thoma Lamı- Isolab
- Beher- Isolab
- Flask- Spl Life Sciences
- Lam Preparat Kutusu- Celestron

- Lam-Lamel- Isolab
- İnce Uçlu Pens

3.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- PBS Tablet- Amresco
- Hematoksilen Boya- Thermo Fisher Scientific
- Kapatma Medyumu- Lab Vision
- İmmersiyon Yağı- Olympus
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide-Sigma
- L-Glutamine 2mM (1x) -Gibco
- Penisilin Streptomisin -Wisent Bioproducts
- Esansiyel Olmayan Amino Asit (100x) – Sigma&Gibco
- Fetal Bovin Serum- Sigma
- Tripsin-EDTA- Sigma
- Eagle's Minimum Essential Medium- Sigma
- Metafosforik Asit- Sigma Aldrich
- Disodyum Etilendiamin Tetra Asetik Asit- Sigma Aldrich
- Sodyum Klorür- Sigma Aldrich
- 5-5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoik Asit)- Sigma
- Tiyobarbitürik Asit- Sigma Aldrich
- Hidroklorik Asit- Sigma Aldrich
- Bakır (II) Klorür- Aldrich
- Amonyum Sülfat- Sigma Aldrich
- Sodyum Hidroksit- Sigma Aldrich
- Etilendiamin Tetra Asetik Asit- Sigma Aldrich
- Sodyum Potasyum Tartarat- Sigma
- Sodyum Bikarbonat- Sigma

- Metanol- Sigma
- Etanol- Sigma
- Bakır Sülfat Pentahidrat- Sigma Aldrich
- Ksantin- Sigma Aldrich
- Ksantin Oksidaz- Sigma Aldrich
- Potasyum Sitrat- Sigma Aldrich
- Trikloroasetik Asit- Sigma Aldrich
- Disodyum Fosfat- Sigma Aldrich
- Nitrotetrazolium Blue Chloride- Sigma Aldrich
- Sodyum Karbonat- Sigma Aldrich
- Bikinkoninik Asit- Sigma Aldrich
- Dimetil Sülfoksit (DMSO)- Sigma
- Kuersetin- Sigma-Aldrich
- Borik Asit- Sigma-Aldrich
- PCNA Antikor- Santa Cruz
- **Invitrogen Histostain Plus Kit**

  Blocking Solüsyon, HRP-Streptavidin, Broad Spectrum
- **Invitrogen AEC Substrate Kit**

  Substrat Buffer (20x), Kromojen Solüsyon (20x), Hidrojen Peroksit (20x)
- **TUNEL Kit-ApopTag Plus Peroxidase In Situ**

Equilibration Buffer, Reaction Buffer, TdT Enzim, Stop/Wash Buffer, Anti-Digoxigenin-Peroksidaz, Plastik Coverslip, Kontrol lamları, DAB Substrat, DAB Dilution Buffer

3.2 Yöntem

3.2.1 8305C İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Soyu

İlk kez 1994 yılında 67 yaşında bir kadın hastanın farklılaşmamış tiroid

karsinomlarından 8305C olarak adlandırılan epitelyal morfolojide monolayer yeni hücre hatları rapor edilmiştir. Anaplastik tiroid kanserinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik çeşitli in vitro çalışmalarda 8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücre soyu model olarak kullanılmaktadır [5, 98, 99].

3.2.2 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Kültürü

ATCC'den satın alınmış 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri (2.000.000 hücre/ml), İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Engin KAPTAN'dan temin edildi. Azot tankında bulunan kriyotüp içerisindeki hücreler, steril su bulunan behere alınarak oda sıcaklığında çözündürüldü. Hücrelerin yaşayıp büyüyebilmesi için gerekli olan kültür ortamı; Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) içine, %10 Fetal Bovin Serum (FBS), 2mM L Glutamin, %1 Esansiyel olmayan Amino Asit (NEAA) ve Penisilin-Streptomisin eklenerek hazırlandı. Bunun için; 500 ml EMEM besiyeri içine 100X NEAA'dan 50 µl, 5 ml L-glutamin ve 2,5 ml Penisilin-Streptomisin eklendi ve bu besiyeri içine %10 FBS eklenerek tamamlanmış besiyeri hazırlandı. 15 ml'lik bir tüp içine 5 ml hazırlanan bu besiyeri eklendi. Besiyeri içine oda sıcaklığında çözündürülen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri eklendi ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı. Hücre pelletine yavaşça tamamlanmış besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Hücreler 25 cm^2 lik ve 75 cm^2 lik flasklara aktarılarak %5 CO_2 içeren 37^oC nemli inkübatör ortamında çoğalmaya bırakıldı.

3.2.3 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinin Pasajlanması

25 ve 75 cm^2 flasklara ekilen hücrelerin 2 günde bir besiyeri değiştirilerek flask yüzeyini kaplaması takip edildi. Monolayer kültür ortamında flask yüzeyini kaplayan hücrelerin birbirlerinden ve yüzeyden ayrılmaları için pasajlama gerçekleştirildi.

İnkübatörde büyütülen flasktaki hücreler %80 konfluent olduğunda pasajlandı. Hücreleri pasajlamak için Tripsin-EDTA kullanıldı. Thoma lamında, hücre sayımı yapılarak flasktaki hücrelerin canlılık ve morfolojileri mikroskopta incelendi. Pasajlamak için önce flasktaki hücrelerin besiyeri atıldı. 25 cm^2 lik flaska 1 ml, 75 cm^2 lik flaska 3 ml olacak şekilde Tripsin-EDTA eklendi. 2-3 dk inkübatörde bekletildikten sonra mikroskopta hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı gözlendi. 5 ml tamamlanmış besiyeri flask yan yüzeyleri yıkanarak eklendi. Pipetaj yapılarak hücreler besiyeri ile

birlikte tüplere alındı. Hücreleri çöktürmek için 1000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Geri kalan hücre pelletinin bir kısmı dondurulduu. Kalan pelletin üzerine tamamlanmış besiyeri eklenerek hücrelerin bir kısmı deneylerde kullanıldı, bir kısmı ise sonraki deneylerde kullanılmak üzere kültüre devam ettirildi.

3.2.4 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu

Hücrelerin bir kısmı sonraki deneylerde kullanılmak üzere dondurulduu. Öncelikle %90 FBS, %10 DMSO kullanılarak dondurma solüsyonu hazırlandı ve hücreler bu solüsyonda 1.000.000 hücre/ml olacak şekilde kriyotüpe aktarıldı. 2 saat -20°C'de muhafaza edildikten sonra -80°C'de bir gece bekletilen kriyotüpler sıvı azot tankına aktarıldı.

3.2.5 Tripan Mavisi ile Hücre Canlılık Testi

Hücre kültürü çalışmalarında canlılık tayini, çalışmanın güvenilirliği bakımından oldukça önemlidir. Bu doğrultuda pek çok yöntem mevcut olmakla birlikte tripan mavisi aracılığıyla da hücre canlılığı tespit edilebilmektedir. Tripan mavisi, ölü hücrelerin membranından geçerek onların mavi renkte işaretlenmesine neden olur. Böylece canlı ve ölü hücrelerin belirlenebilmesine olanak sağlar [100]. 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin canlılığı tripan mavisi boyası kullanılarak belirlendi. Canlı ve ölü hücre oranını tespit etmek amacıyla 10 µl hücre süspansiyonu örneği ile 10 µl tripan mavisi bir ependorf tüp içinde karıştırıldı. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına aktarıldı ve ışık mikroskobu altında sayım gerçekleştirildi. Thoma lamının 16 küçük kare içeren 4 farklı alanındaki canlı ve ölü hücrelerin tümü sayılarak, canlı ve ölü hücre sayısının ortalaması alındı. Toplam ve canlı hücre sayısı Eşitlik 3.1 ve Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplandı.

Toplam Hücre Sayısı (ml)= 16 Karedeki Hücre Sayısı **x** Seyreltme Faktörü **x** 10^4 (3.1)

Canlı Hücre Oranı (%) = Boyanmamış Hücre Sayısı ÷ Toplam Hücre Sayısı **x** 100 (3.2)

3.2.6 Farklı Konsantrasyonlarda Kuersetin Hazırlanması

4 farklı konsantrasyonda kuersetin solüsyonu hazırlandı. 5 mg kuersetin 1 ml etanolde çözülerek birinci stok hazırlandı. Kuersetin solüsyonu por çapı 0,22 µm olan filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Bu birinci stoktan 100 µl alınıp üzerine 900 µl etanol

eklenerek 0,5 mg/ml konsantrasyonda ikinci stok hazırlandı. İkinci stoktan da 100 µl alınıp üzerine 900 µl etanol eklenerek 0,05 mg/ml konsantrasyonda üçüncü stok hazırlandı. Üçüncü stoktan 100 µl alınıp üzerine 900 µl etanol eklenerek 0,005 mg/ml konsantrasyonda dördüncü stok hazırlandı.

3.2.7 Farklı Konsantrasyonlarda Borik Asit Hazırlanması

3 farklı konsantrasyonda borik asit solüsyonu hazırlandı. 5 mg borik asit 1 ml saf suda çözülerek stok solüsyonu hazırlandı. Borik asit solüsyonu por çapı 0,22 µm olan filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Bu birinci stoktan 100 µl alınıp üzerine 900 µl saf su eklenerek 0,5 mg/ml konsantrasyonda ikinci stok hazırlandı. İkinci stoktan da 100 µl alınıp üzerine 900 µl saf su eklenerek 0,05 mg/ml konsantrasyonda üçüncü stok hazırlandı.

3.2.8 Farklı Konsantrasyonlardaki Kuersetinin 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksisitesi

MTT, hücre kültüründe yaygın olarak kullanılan metabolik aktivite esaslı bir hücre canlılık testidir. MTT yöntemi, dehidrogenaz enzimi aracılığıyla hücrede oluşan formazan kristalleri üzerinden mitokondri aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesini sağlar. Bu bakımdan hücre proliferasyonu ve sitotoksisite tayini için kullanılan MTT analizi, kolay ve kullanışlı bir kolorimetrik yöntemdir [101]. Uygulanması son derece basit olan MTT tekniğinde önce MTT boyası kültürdeki hücrelere 0,2-0,5 mg/ml konsantrasyonda eklenir ve 1 ila 4 saat inkübe edilir. İnkübasyonun sonunda oluşan ve canlı hücre sayısıyla korelasyon gösteren formazan kristallerini çözmek için DMSO, DMF, Sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi çözücüler kullanılır. Bu bileşikler formazanların çözünmesinin yanı sıra, renk sabitlenmesi ve buharlaşmanın önlenmesinde de rol oynar. 1 saatlik inkübasyonun sonrasında plate 570 nm'de okunur [102, 103].

96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğuna 10^4 hücre/ml'de olacak şekilde 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri ekilerek 48 saat %5 CO_2 ve 37^oC nemli inkübatör ortamında kültüre edildi. Kuyucuklardaki hücreler 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/ml konsantrasyonlarda kuersetin ile muamele edildi. Her bir konsantrasyon için hücrelerin kültüre edildiği 4 kuyucuk kullanıldı. Ayrıca bu konsantrasyonlara denk gelen miktarda çözücü etanol de yine 4 kuyucuk olacak şekilde

hücrelere eklenerek kültüre edildi. Hücrelerin kuersetin ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonrasında sitotoksisitesi MTT testi ile belirlendi. Sitotoksisiteyi tayin edebilmek için 6 mg MTT boyası 10 ml distile su içinde çözündürüldü. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerin bulunduğu kuyucuklardaki besiyeri çekilip atıldı ver her bir kuyucuğa 50 µl MTT eklendi. 3 saat inkübasyonun ardından mavi-mor formazan kristallerinin oluşmasıyla MTT boyası uzaklaştırıldı ve formazan kristallerinin çözündürülmesi için kuyucuklara 100 µl DMSO eklendi. Metabolik aktivite spektrofotometrede 570 nm'de ölçüldü.

Elde edilen absorbans değerlerine göre Eşitlik 3.3'den elde edilen sonuçlarla çizilen grafikten %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC_{50}) değerleri hesaplandı.

$$\text{Canlılık Yüzdesi} = 100 \times \text{Absorbans}_{(\text{Deney})} \div \text{Absorbans}_{(\text{Kontrol})} \quad (3.3)$$

3.2.9 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonlarının 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücreleri Üzerindeki Proliferasyon Etkisi

2 cc'lik petrilere yuvarlak lameller yerleştirildi. Lameller üzerine 10^4 hücre/ml'de olacak şekilde 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri ekilerek, 2 ml besiyeri eklenip 48 saat inkübatörde büyütüldü. Üzerinde 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri bulunan lameller, içerisinde 500 µl tamamlanmış besiyeri bulunan 24 kuyucuklu pleytlere aktarıldı. Lameller üzerindeki 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri; 100, 150, 200 µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde kuersetin ve farklı konsantrasyonlarda kuersetin-borik asit kombinasyonları (100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit ve 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit) ile muamele edilerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 1xPBS ile yıkanarak soğuk metanolle fikse edildi. Hücre proliferasyonunu immünositokimyasal olarak tayin edebilmek için PCNA antikoru ve Invitrogen histostain plus broad spectrum kiti kullanıldı.

- Metanol ile fikse edilen örnekler 5 dakika PBS ile yıkandı.
- Her bir örneğe serum blocking solüsyonu ilave edilerek 20 dakika boyunca oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Blocking sonrası 300 µl PBS içerisine 1 µl PCNA primer antikor eklenerek örneklere uygulandı.

- Antikor eklenen örnekler +4°C'de 1 gece inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra 1xPBS ile 5 dakika boyunca 3 kez yıkandı.
- Yıkama sonrasında örneklere biotillenmiş sekonder antikor eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 3x5 dakika 1x PBS ile yıkama yapıldı.
- Yıkama sonrası örneklere Streptavidin-peroxidase (HRP) uygulandı. 20 dakika inkübe edildi.
- Tekrar 3x5 dakika 1xPBS ile yıkama yapıldı.
- PCNA ile işaretlenen hücreler AEC kromojen kit kullanılarak gösterildi.
- Oluşturulan substrat/kromojen karışımı ile örnekler 3-5 dakika inkübe edildi.
- Meydana gelen reaksiyon musluk suyu ile durduruldu.
- Ardından işaretlenmeyen hücreleri belirlemek için hematoksilen ile 1 dakika zıt boyama yapıldı.
- Hücreler kapatma medyumu ile kapatılarak ışık mikroskobu ile incelendi.
- 100x büyütmede rastgele seçilen 10 farklı alanda işaretlenmiş ve işaretlenmemiş hücreler sayıldı ve Eşitlik 3.4 kullanılarak proliferasyon yüzdesi hesaplandı.

Proliferasyon Yüzdesi (%) = 100 **x** İşaretlenmiş Hücreler ÷ Tüm Hücreler (3.4)

3.2.10 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonlarının 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinde TUNEL Testi ile Apoptoz Tayini

Apoptozun belirlenmesinde sitoplazma ve membranda meydana gelen değişiklikleri belirleyen çeşitli yöntemler mevcuttur. Bununla beraber apoptotik süreçte rol alan proteinlerin seviyesinin tespitine dayalı yöntemler ile DNA fragmentasyonunun sitokimyasal olarak belirlenmesine dayalı yöntemler de apoptozun belirlenmesinde kullanılır [104]. Hücre ve dokuda DNA hasarının tespitinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biri TUNEL yöntemidir. Amaç apoptotik hücre çekirdeğinin spesifik boyanmasıyla hücre ölümünün tespitidir. Işık mikroskobuyla yapılan morfolojik analizlerle apoptotik hücrelerin görüntülenmesi sağlanır [105, 106].

TUNEL, parafin bloklar ve hücre kültüründe DNA kırıklarının yerinde belirlenmesini

sağlayan bir tekniktir. Apoptotik hücrede DNA zincirinin kopması ile birlikte 3-OH uç serbestleşir. Terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi (Tdt) aracılı işaretli deoksiuridin trifosfat moleküllerinin 3-OH ucundaki DNA zincir kırıklarına eklenmesi ile apoptotik hücreler belirlenir. Bu apoptotik hücrelerin çekirdekleri belirginleştirilir. Apoptotik hücreler pozitif işaretlemede kahverengi ile, normal hücreler ise metilen yeşili veya hematoksilin ile kırmızı-mavimsi yeşil renkte işaretlenir [105, 106].

2 cc'lik petrilere yuvarlak lameller yerleştirildi. Lameller üzerine 10^4 hücre/ml'de olacak şekilde 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri ekilip 2 ml besiyeri ilave edilerek 48 saat inkübatörde büyütüldü. 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri bulunan bu lameller, içerisinde 500 µl tamamlanmış besiyeri bulunan 24 kuyucuklu pleytlere aktarıldı. 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri; 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde kuersetin ve farklı konsantrasyonlarda kuersetin-borik asit kombinasyonları (100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit ve 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit) ile muamele edilerek 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 1xPBS ile yıkanarak soğuk metanolle fikse edildi. Apoptoza giden hücrelerin belirlenmesinde Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit kullanıldı.

- Her bir örneğin üzerine Equilibration bufferdan 50 µl eklendi.
- Sonrasında her bir örneğe 35 µl Reaction Buffer ve 15 µl TdT enzim eklenerek 37°C sıcaklıkta 1 saat inkübe edildi.
- İnkübatörden alınan örneklere Stop/wash buffer eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Örnekler PBS çözeltisi ile 3 defa 1 dakika yıkandı.
- Örnekler üzerine 50 µl Anti-digoxenin peroksidaz eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Sonrasında örneklerin reaksiyonu 4x2 dakika PBS ile yıkanarak durduruldu.
- Her bir örnek için 196 µl DAB dilusyon buffer üzerine 4 µl DAB eklenerek substrat hazırlandı ve örneklere uygulandı.
- Oda sıcaklığında 3-6 dakika beklenerek renk değişimi mikroskop altında belirlendi.

- Ardından 1 dakika ara ile 3 defa musluk suyu ile yıkama yapıldı.
- TUNEL (+) hücreler kahverengi boyanacağı için boyanmayan hücreleri belirlemek amacıyla hematoksilen ile 1 dakika zıt boyama yapıldı.
- Son olarak hücrelerin yer aldığı lameller kapatma medyumu ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi.
- 100x büyütmede rastgele seçilen 10 farklı alanda işaretlenmiş ve işaretlenmemiş hücreler sayıldı ve apoptoz yüzdesi Eşitlik 3.5 kullanılarak hesaplandı.

Apoptoz Yüzdesi (%) = 100 **x** İşaretlenmiş Hücreler ÷ Tüm Hücreler (3.5)

3.2.11 8305C İnsan Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Lizatlarının Hazırlanması

8305C insan anaplastik tiroid kanseri hücreleri 6 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğunda 10^5 hücre/ml'de olacak şekilde ekilip 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2 ml tamamlanmış besiyeri değiştirilerek hücreler her bir konsantrasyon için 2 kuyucuk olacak şekilde; 100, 150, 200 µg/ml konsantrasyonlarda kuersetin ve 3 farklı konsantrasyonda kuersetin-borik asit kombinasyonu (100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit ve 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit) ile muamele edilerek 37°C'de %5 CO_2 ortamında 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 1xPBS ile yıkanarak tripsin ile kaldırılıp tüplere aktarıldı. Elde edilen lizatlar antioksidan parametreleri analiz edilinceye kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.12 Protein Miktar Tayini (BCA) Yöntemi

Smith ve arkadaşları tarafından geliştirilen protein tayin yöntemi Bikinkoninik Asit (BCA) bir numunedeki toplam proteinin miktarının belirlenmesinde kullanılır. En son geliştirilen tekniklerden biri olan bu yöntemin esası, proteinlerin, alkali bir ortamda Cu^{+2}'yi, Cu^{+1}'e indirgemesidir. Bu indirgenme reaksiyonunun gerçekleşmesini protein moleküllerinde bulunan bazı amino asit kalıntıları sağlar. Tayin için, Cu^{+1}'in BCA ile reaksiyonuyla oluşturduğu kompleksten 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm alınır. Reaktiflerin hazırlanması sürecinde oluşan yeşilimsi renk reaksiyon sonunda mor renge dönüşür. BCA test sonuçları güvenilirdir ancak maliyetinin yanı sıra, protein örneklerinde bulunan indirgeyici ajanlar gibi bazı kimyasalların etkileşime açık olması

bu yöntemin dezavantajını oluşturur [107, 108].

0,5 gr BCA tartılarak 40 ml distile suda çözündü. 1 gr Sodyum Karbonat, 0,2 gr Sodyum Hidroksit, 0,475 gr Sodyum Bikarbonat, 0,214 gr Potasyum Sodyum Tartarat, 2,1 gr Bakır (II) Sülfat Pentahidrat hassas terazide tartılıp, BCA üzerine eklenerek Reaktif A hazırlandı. Son hacmi distile suyla 50 ml'ye tamamlanıp çözeltinin asitlik derecesini düzenlemek için NaOH kullanılarak pH:11.25'e ayarlandı. Reaktif B; 2,1 gr $CuSO_4.5H_2O$ 10 ml suda çözünerek hazırlandı [107].

1 ml Bovin Serum Albumin (BSA) alınarak 20-2000 µg/ml dilüsyonlarda stok hazırlandı. BCA deney reaktifinin hazırlanması amacıyla Reaktif A ve Reaktif B 50:1 oranında alınarak karıştırıldı. Standart çözeltilerin, örnek ve körün 100 µl'sine, deney reaktifinden 2 ml eklendi. 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Soğumasının ardından 562 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Standart eğri grafiği çizilerek örnekteki protein miktarı kolorimetrik olarak mg/ml cinsinden hesaplandı.

3.2.13 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki MDA Düzeyinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu sonucu lipid peroksitleri ve aldehit moleküller oluşur. Oksidatif stres parametresi olan malondialdehit, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Madde (TBARS) analiz yöntemi, malondialdehitin Tiyobarbitürik Asit (TBA) ile oluşturduğu kompleksin 535 nm'de spektrofotometrik olarak tespiti esasına dayanır [51]. %15 Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi, Tiyobarbitürik asit (%0,375) çözeltisi ve 0,25 M Hidroklorik asit karıştırılarak stok çözelti hazırlandı. TBA reaktifinden 2 ml alınarak çözünmesi için hafifçe ısıtıldı. 200 µl TBA reaktifi, 100 µl örnek ile karıştırıldı. Tüplerin ağzı kapatılarak 15 dk 100°C'de suda kaynatıldı. Soğuduktan sonra, 3000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantın absorbansı 535 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Standart eğri grafiği çizilerek, örnekteki MDA miktarı kolorimetrik olarak MDA/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.2.14 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki SOD Enzim Aktivitesinin Tayini

SOD enzim aktivitesinin tayini Sun ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen tekniğe

göre gerçekleştirildi [109]. Yöntem; reaksiyon ortamında ksantin-ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile oluşan süperoksit radikallerinin, ortamda bulunan nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesinin örnekteki süperoksit dismutaz tarafından engellenmesi esasına dayanır. Bu şekilde oluşturulan süperoksit radikallerinin NBT ile reaksiyonu 560 nm'de absorbans veren formazan kristallerini oluşturur. Ortama ilave edilen enzim, üretilen toksik süperoksit radikallerinin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırırır. Böylece NBT indirgenmesi yavaşlar. Sonuçta spektrofotometrede ölçülen değerin azalmasıyla SOD miktarı, formazan oluşumunun inhibisyonu üzerinden indirekt olarak belirlenmiş olur.

Ksantin çözeltisi (0,3 mM): 1,836 mg ksantin tartılarak önce 1N NaOH ile çözüldükten sonra distile saf su ile son hacmi 40 ml'ye tamamlandı.

EDTA (0.6 mM): 22,33 mg EDTA 100 ml distile suda çözüldü.

NBT (150 μg/l): 2,46 mg NBT 20 ml distile suda çözüldü.

Na_2CO_3 (400 mM): 2,24 gr Na_2CO_3 distile saf suda çözülerek hacim 50 ml'ye tamamlandı.

BSA (1 g/l): 25 mg BSA total hacim 25 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

20 ml ksantin çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6 ml Na_2CO_3 çözeltisi ve 3 ml BSA çözeltisi karıştırılıp pH:10,2'ye ayarlanarak nihai çözelti hazırlandı.

$CuCl_2$ (0.8 mM) 5,37 mg $CuCl_2$ distile suda çözülerek toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

Ksantin oksidaz (167 U/mL) enziminden 18 μL alınarak, 3 ml 2 M amonyum sülfat içerisinde çözündürüldü. Deney tüplerine öncelikle 2,85 ml SOD reaktifi konuldu. Üzerlerine 0,1 ml örnek eklendi. Kör tüpüne örnek yerine 0,1 ml distile su konuldu. Tüm karışımların üzerine 50 μl ksantin oksidaz ilave edilip, hızlı bir şekilde alt üst edilerek karıştırıldı ve 20 dakika 25^0C'de inkübasyona alındı. İnkübasyon süresi dolan tüplere bekletilmeden stop solüsyonu olarak 0,1 ml $CuCl_2$ eklendi ve numuneler köre karşı 560 nm'de okundu. Standart eğri grafiği çizilerek, örnekteki SOD miktarı U/mg protein olarak hesaplandı.

3.2.15 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen

8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki GSH Tayini

Bu yöntem; hafif alkali ortamda, 5.5 ditiyobis-2-nitrobenzoik asidin (DTNB, Elman's reagent) örneklerdeki alifatik tiyol bileşikleriyle reaksiyonu sonucu her molekül tiyol başına oluşan p-nitro fenol anyon miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. DTNB, sülfidril yapılarıyla disülfid köprülerini oluşturur. Oluşan sarı renkli kompleksin 412 nm'de absorbans ölçümü yapılarak tayin yapılır [110].

Proteinsizleştirme çözeltisi: 3,2 gr metafosforik asit, 0,2 gr disodyum EDTA, 58 gr NaCl tartılarak 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Fosfat çözeltisi: 0.3 M Na_2HPO_4 çözeltisinden 200 ml alındı.

Ellman Reaktifi: 39,6 mg DTNB, 100 ml %1'lik Potasyum Sitrat ($C_6H_5K_3O_7$) içinde çözülerek hazırlandı.

Oda sıcaklığındaki örneklerden 0,2 ml alındı. Üzerine 0,3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklenip vortekslenerek karıştırıldı. 5 dakika oda ısısında bekletilerek 2000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan 0,5 ml alınıp, üzerine 0,2 ml Na_2HPO_4 ve 0,025 ml Ellman reaktifi eklendi. Ardından 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm alındı. Standart eğri grafiği çizilerek, örnekteki GSH miktarı µg glutatyon cinsinden hesaplandı.

3.2.16 İstatistiksel Analiz

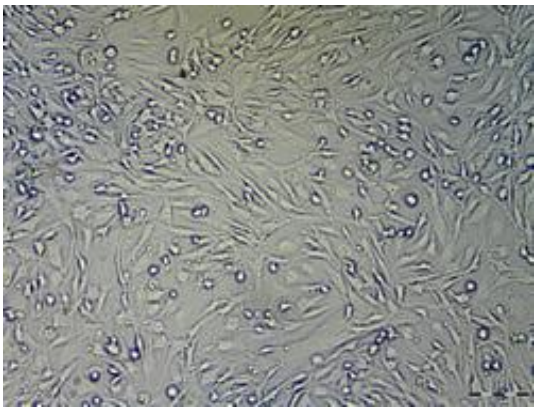
Tüm sonuçlar Graphad Prism 8.0.2 programı ile analiz edildi. Sonuçlar, ANOVA ve Mann-Whitney testleri ile değerlendirilerek $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. PCNA ve TUNEL işaretleme sonuçları Two Tailed Mann-Whitney U testi ile; antioksidan analizleri ise One-way ANOVA ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücre Kültürü

Kültüre edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri inverted mikroskopta 24, 48 ve 72 saat sonra incelendiğinde morfolojik olarak sağlıklı oldukları, flask yüzeyini kaplamaya başladıkları, besiyerlerinin berrak olduğu ve hücrelerin çoğalmasında herhangi bir olumsuz durum olmadığı belirlendi (Şekil 4.1). 4. günde yüzey kaplaması %80 olan 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin pasajlanması sırasında thoma lamında tripan mavisi boyası ile yapılan sayım sonucunda canlılıklarının %100 olduğu belirlendi. Flasklarda kültüre edilerek elde edilen tüm hücrelerin thoma lamında sayımı sonucunda 1.000.000 hücre/ml'de olacak şekilde 20 kriyotüp dondurularak kriyobank oluşturuldu.

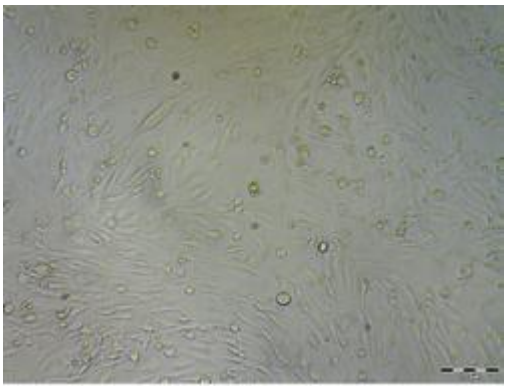


Şekil 4.1 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 24 saatlik kültürünün inverted mikroskop görüntüsü (40x)

4.2 Farklı Konsantrasyonlardaki Kuersetinin 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

Kuersetinin 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/ml konsantrasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT ile belirlendi. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerin morfolojileri inverted mikroskop altında değerlendirildi.

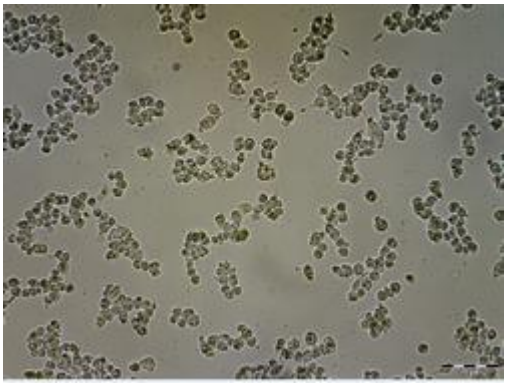
24 saatlik inkübasyondan sonra kontrol grubu hücrelerinin morfolojik olarak fibroblast görünümde olduğu, parlak ve yüzey kaplaması yapmaya başladıkları gözlemlendi. Kuersetin eklenen kuyucuklarda ise 24. saatte düşük konsantrasyonlarda kontrol grubu hücrelere göre morfolojik olarak farklılık gözlemlenmezken (Şekil 4.2), 5 µg/ml ile 100 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda kuersetin ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin, morfolojilerinin artan konsantrasyonlara bağlı olarak bozulmaya başladığı belirlendi (Şekil 4.3). 100 µg/ml ile 1000 µg/ml arasındaki kuersetin konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerin çoğalmasının artan konsantrasyonlara bağlı olarak belirgin biçimde azaldığı, morfolojilerinin bozulduğu, hücrelerin fibroblastik özelliğini kaybederek yuvarlak hücreleri oluşturduğu ve yüzeyde ölü hücrelerin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4). Morfolojik inceleme sonuçlarına göre 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin kuersetin ile 24 saat muamelesi sonucunda kuersetinin 5 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda etki gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.2 1 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)

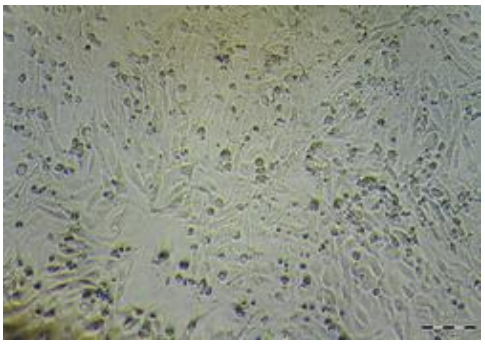


Şekil 4.3 100 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)

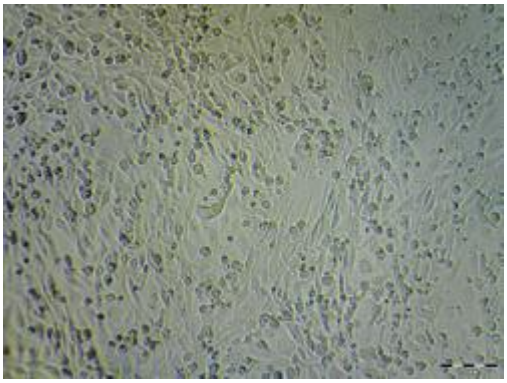


Şekil 4.4 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)

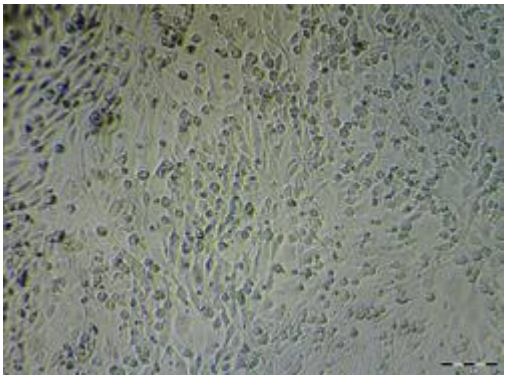
Kuersetin ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri morfolojik olarak 48 saat sonra incelendiğinde; kontrol grubu hücrelerinin morfolojik olarak sağlıklı hücreler olup çoğalmaya devam ettikleri, kuersetin ile muamele edilen hücrelerin ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak kontrol grubu hücrelere göre belirgin bir şekilde morfolojilerinin bozulduğu, hücre sayısındaki çoğalmada azalma meydana geldiği ve ölü hücrelerin olduğu belirlendi (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).



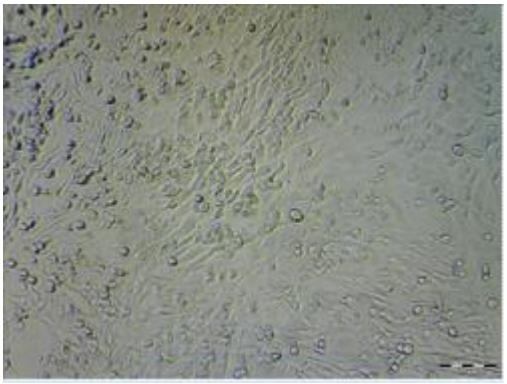
Şekil 4.5 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 48 saatlik kültürünün inverted mikroskop görüntüsü (40x)



Şekil 4.6 1 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)

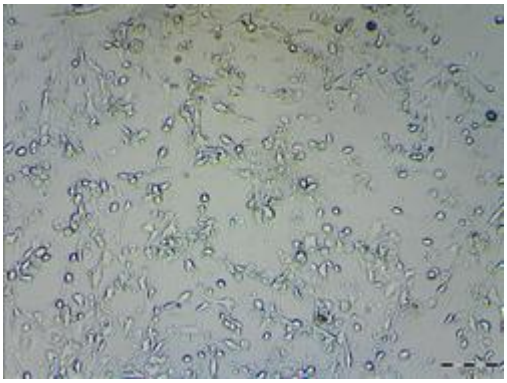


Şekil 4.7 100 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)

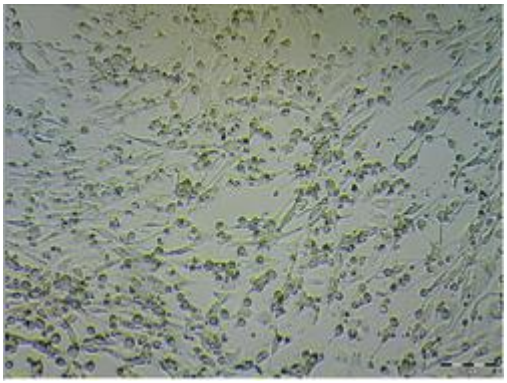


Şekil 4.8 200 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)

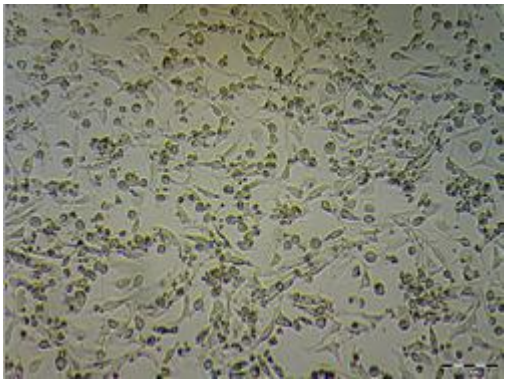
72 saatlik inkübasyon sonrası ise; 48 saate benzer şekilde kuersetin ile muamele edilen hücrelerde morfolojik bozulmalar belirgin bir şekilde gözlemlenirken, yüksek konsantrasyonlarda; hücrelerin çoğalmasının durduğu ve ölü hücrelerin sayısında artış meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12).



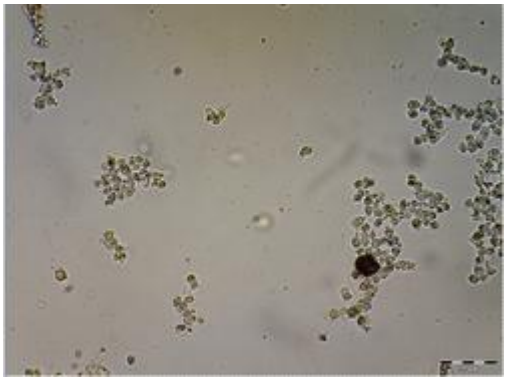
Şekil 4.9 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 72 saatlik kültürünün inverted mikroskop görüntüsü (40x)



Şekil 4.10 1 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)

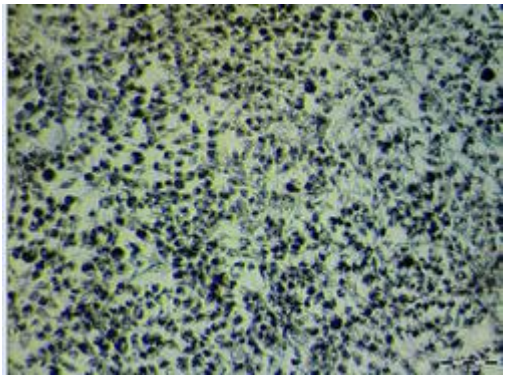


Şekil 4.11 100 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)

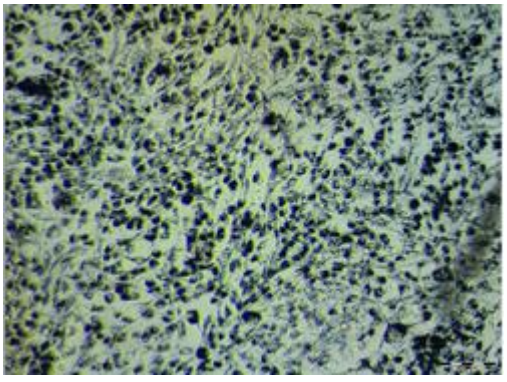


Şekil 4.12 200 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (40x)

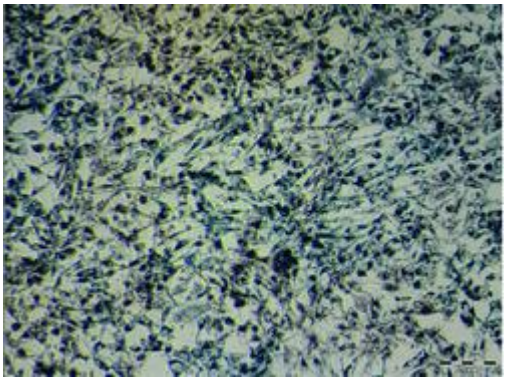
Farklı konsantrasyonlarda kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerine MTT solüsyonu eklenmesi sonucunda; kontrol grubu hücrelerde formazan kristalleri oluşurken, kuersetin ile muamele edilen hücrelerde artan konsantrasyonlara bağlı olarak oluşan formazan kristal sayısı azaldı (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16).



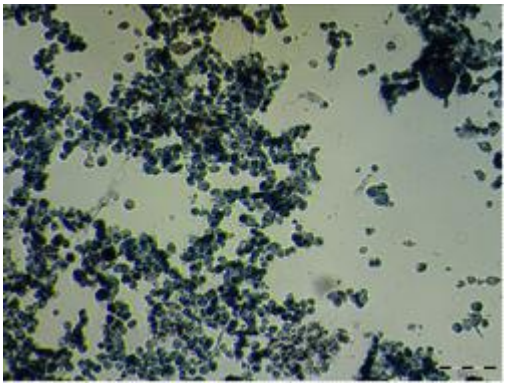
Şekil 4.13 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 24 saatlik kültürünün inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)



Şekil 4.14 1 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)

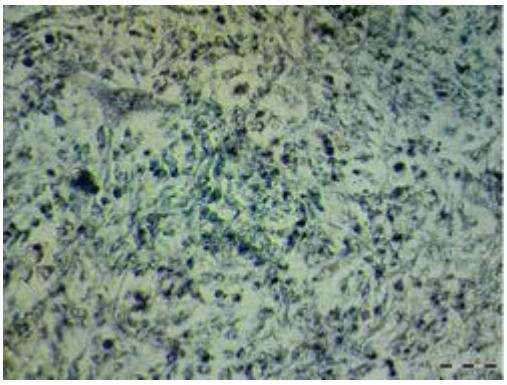


Şekil 4.15 100 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)

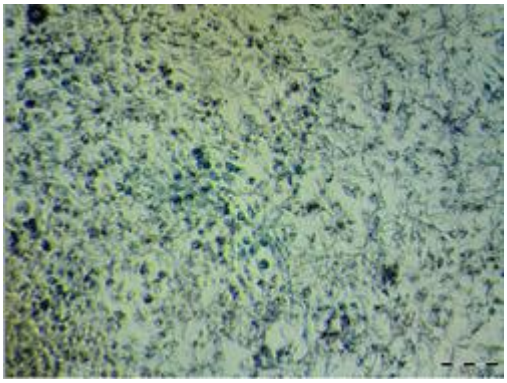


Şekil 4.16 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)

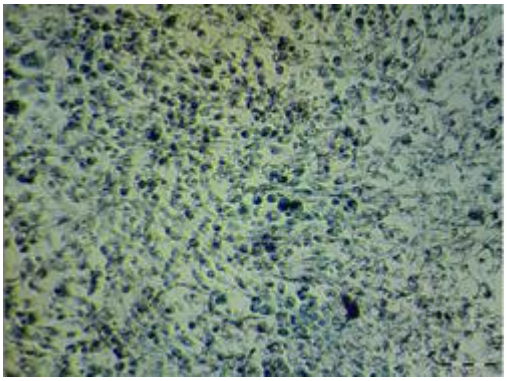
48 saat kuersetin ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MTT eklenmesi sonucunda artan konsantrasyona bağlı olarak ölü hücre sayısı arttığından dolayı oluşan formazan kristal sayısı da belirgin bir şekilde azaldı (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20).



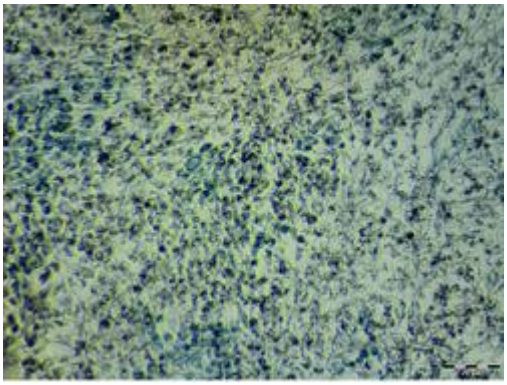
Şekil 4.17 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 48 saatlik kültürünün inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)



Şekil 4.18 1 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)

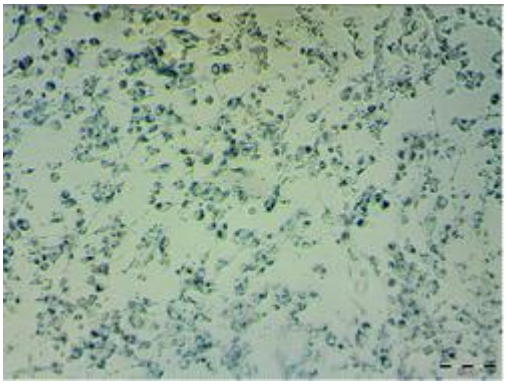


Şekil 4.19 100 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)

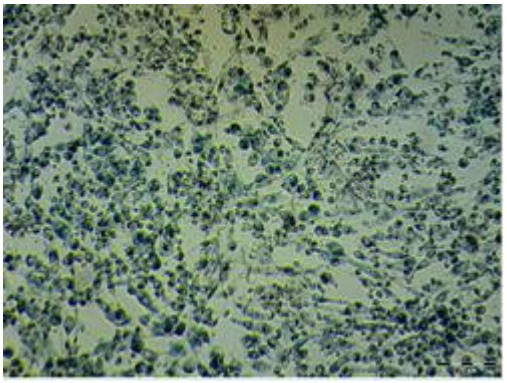


Şekil 4.20 200 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)

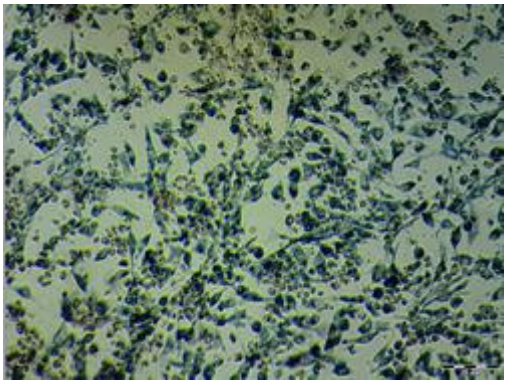
72 saat kuersetin ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde kontrol grubuna göre formazan kristal oluşumu, kuersetinin yüksek konsantrasyonlarında hücrelerin büyük bir kısmı öldüğü için gözlemlenmedi (Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24).



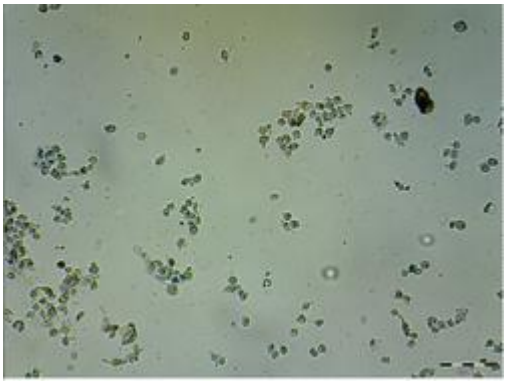
Şekil 4.21 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 72 saatlik kültürünün inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)



Şekil 4.22 1 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)

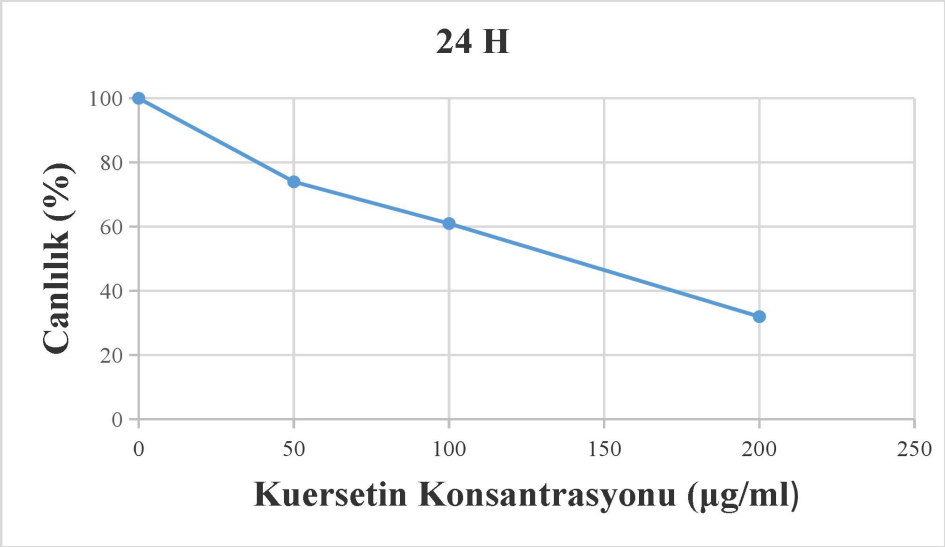


Şekil 4.23 100 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)

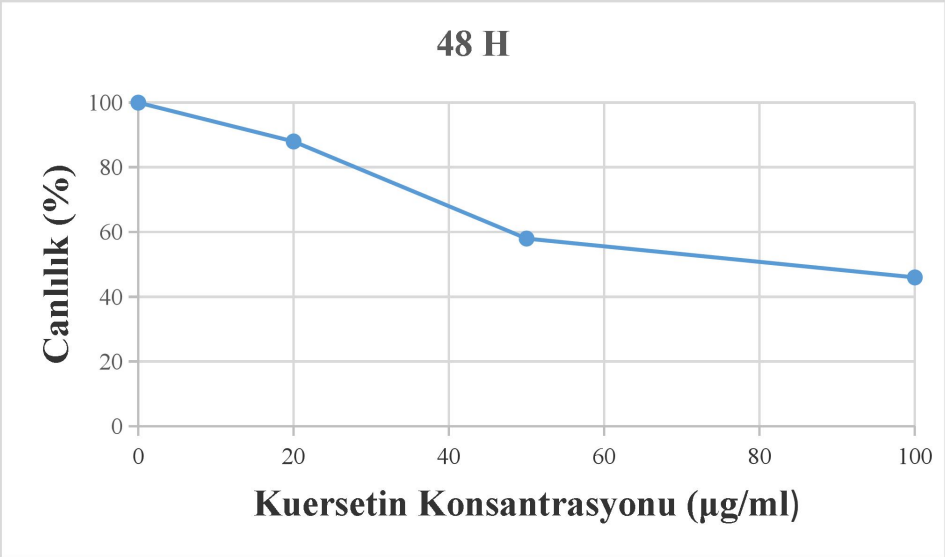


Şekil 4.24 200 µg/ml kuersetin ile 72 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin inverted mikroskop MTT görüntüsü (40x)

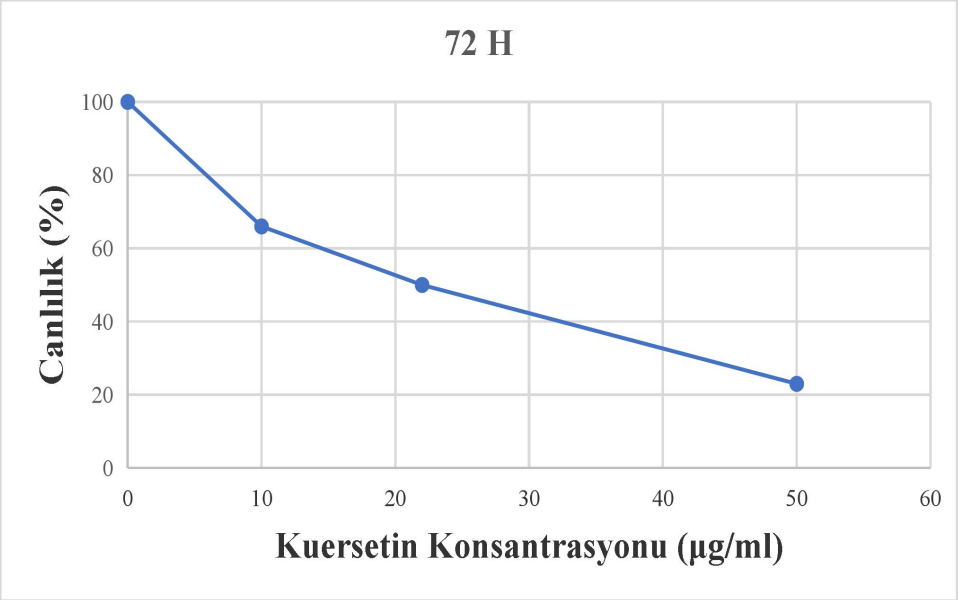
Hücrelerin üzerine MTT eklenmesiyle artan kuersetin konsantrasyonlara bağlı olarak oluşan formazan kristallerinin sayısının 24, 48 ve 72 saatlerde kontrol grubuna göre azaldığı gözlendi. Farklı konsantrasyonlarda kuersetin ile muamele edilen hücrelere 24, 48 ve 72 saat sonra uygulanan MTT sonrasında oluşan formazan kristallerinin DMSO ile çözündürülmesi sonucu meydana gelen renk değişiminde elde edilen absorbans değerleri ile kuersetinin 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri belirlendi (Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27).



Şekil 4.25 Kuersetinin 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı canlılık grafiği (24 saat)



Şekil 4.26 Kuersetinin 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı canlılık grafiği (48 saat)



Şekil 4.27 Kuersetinin 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı canlılık grafiği (72 saat)

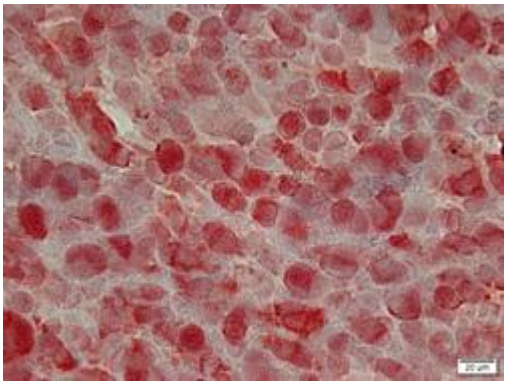
Kuersetinin 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki IC_{50} değerleri 24 saat için, 138 µg/ml; 48 saat için 84 µg/ml ve 72 saat için ise 22 µg/ml olarak belirlendi.

4.3 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonlarının 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisi

100, 150, 200 µg/ml kuersetin ve 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, 150 µg/ml

kuersetin + 250 µg/ml borik asit ve 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonları ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde PCNA proliferasyonu, immünositokimyasal yöntemle belirlendi.

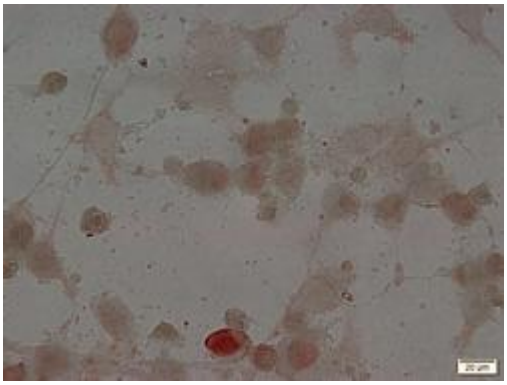
Kontrol grubunda PCNA pozitif olan hücre sayısı %92 olarak saptandı (Şekil 4.28). 100 µg/ml kuersetin ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde PCNA pozitif olan hücre sayısı %41 olarak belirlendi (Şekil 4.29). 150 µg/ml kuersetin ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde ise PCNA pozitif olan hücre sayısı %43 olarak hesaplandı (Şekil 4.30). 200 µg/ml kuersetin uygulanan 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde PCNA pozitif olan hücre sayısı %35 olarak saptandı (Şekil 4.31). 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit, 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit konsantrasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki PCNA proliferasyonu sırasıyla %58, %48 ve %30 olarak belirlendi (Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34).



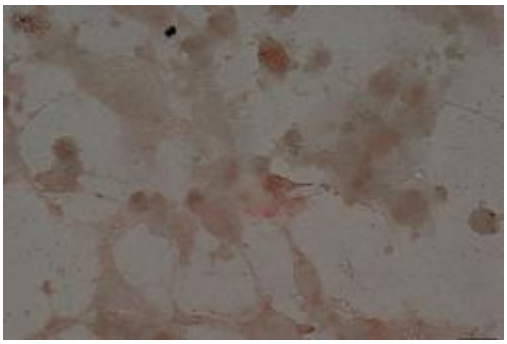
Şekil 4.28 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 24 saatlik kültürünün PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



Şekil 4.29 100 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



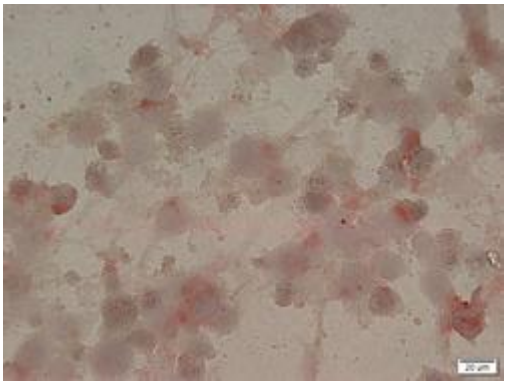
Şekil 4.30 150 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



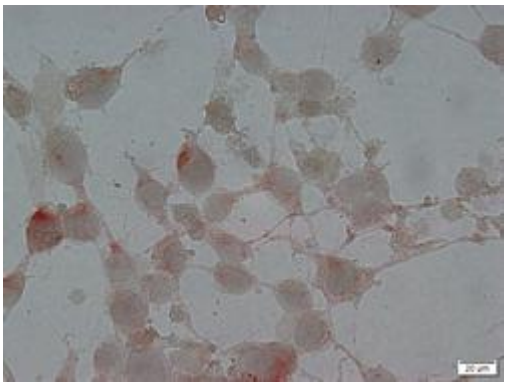
Şekil 4.31 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



Şekil 4.32 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)

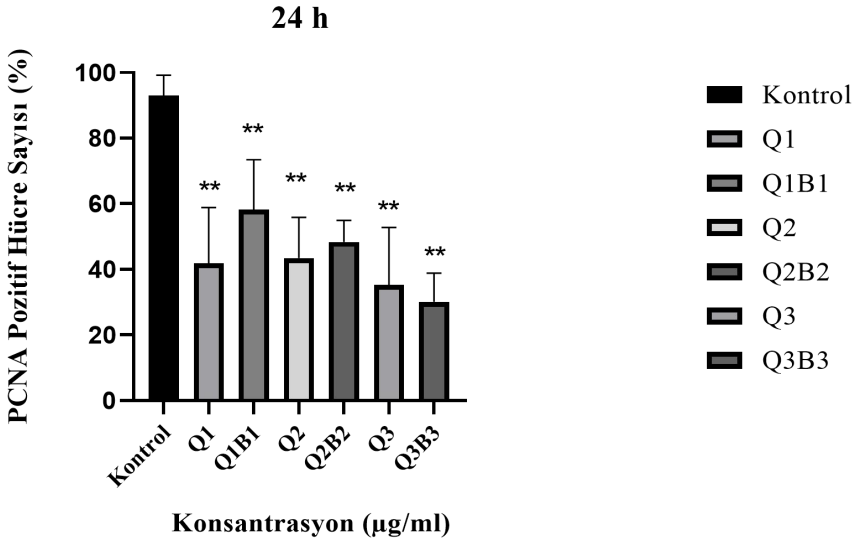


Şekil 4.33 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



Şekil 4.34 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin PCNA ile immünositokimyasal işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)

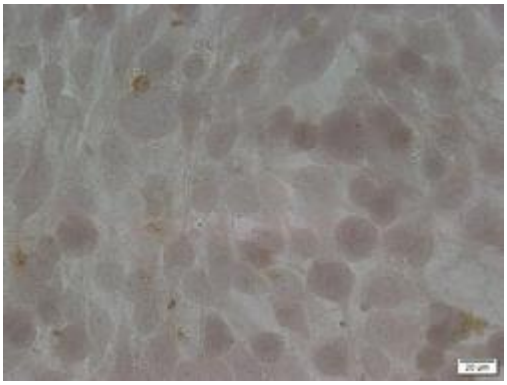
100, 150 ve 200 µg/ml kuersetinin 24 saatlik inkübasyonu sonrası 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki proliferasyonu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p<0,01$). Benzer şekilde, 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit, 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit konsantrasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 24. saat proliferasyonu, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p<0,01$) (Şekil 4.35).



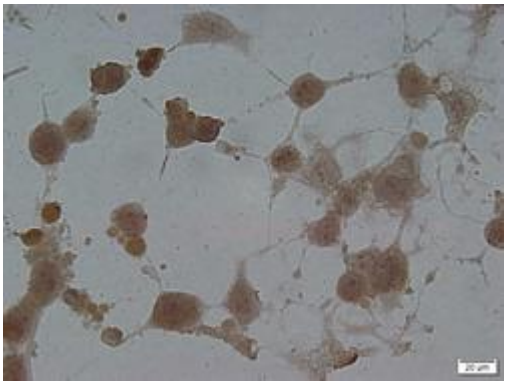
Şekil 4.35 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi (24 saat) (**Q1**:100 µg/ml kuersetin, **Q2**: 150 µg/ml kuersetin, **Q3**:200 µg/ml kuersetin **Q1B1**:100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit**, Q2B2**:150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit **Q3B3**:200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit)

4.4 Kuersetinin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonlarının 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerinde Apoptoza Etkisi

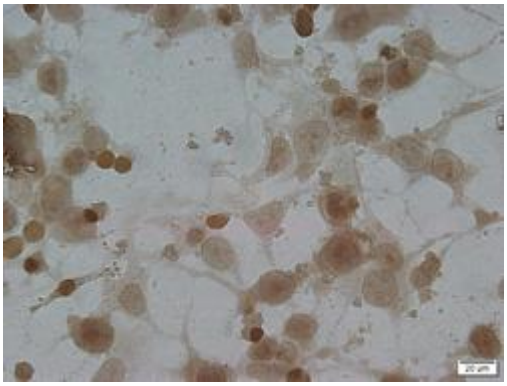
100, 150 ve 200 µg/ml kuersetin ve 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit, 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonları ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş apoptoza giden hücre sayısı belirlendi. Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı %12 olarak saptandı (Şekil 4.36). 100 µg/ml kuersetin ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı %60 olarak hesaplandı (Şekil 4.37). 150 µg/ml kuersetin ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde ise TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı %67 olarak belirlendi (Şekil 4.38). 200 µg/ml kuersetin uygulanan 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı %73 olarak saptandı (Şekil 4.39). 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit, 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonu ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde TUNEL yöntemi ile pozitif işaretlenmiş hücre sayısı sırasıyla %47, %68 ve %76 olarak belirlendi (Şekil 4.40, Şekil 4.41, Şekil 4.42).



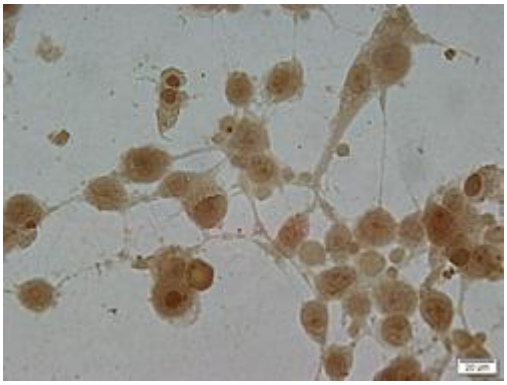
Şekil 4.36 Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin 24 saatlik kültürünün TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



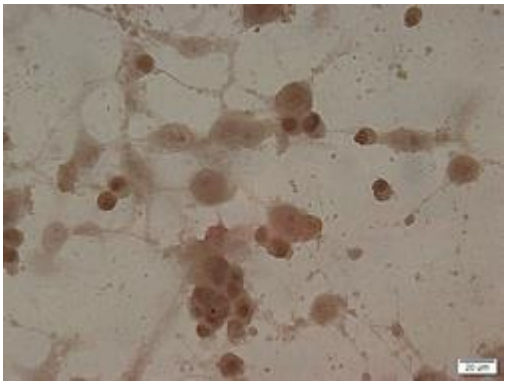
Şekil 4.37 100 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



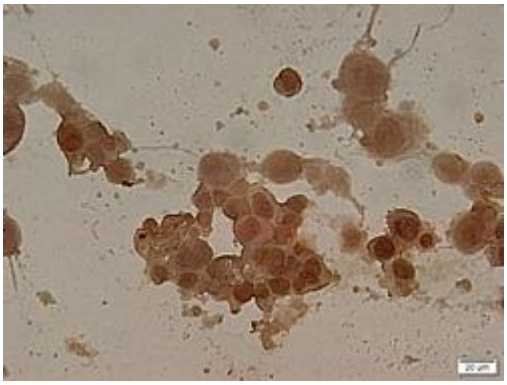
Şekil 4.38 150 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



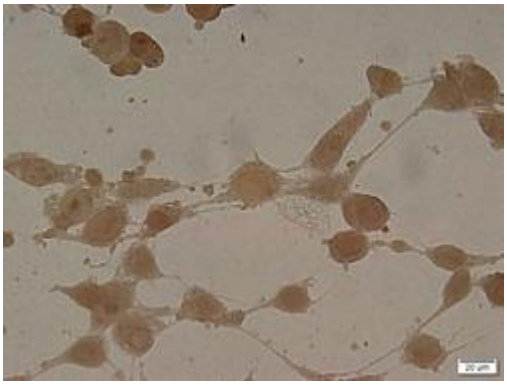
Şekil 4.39 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



Şekil 4.40 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)

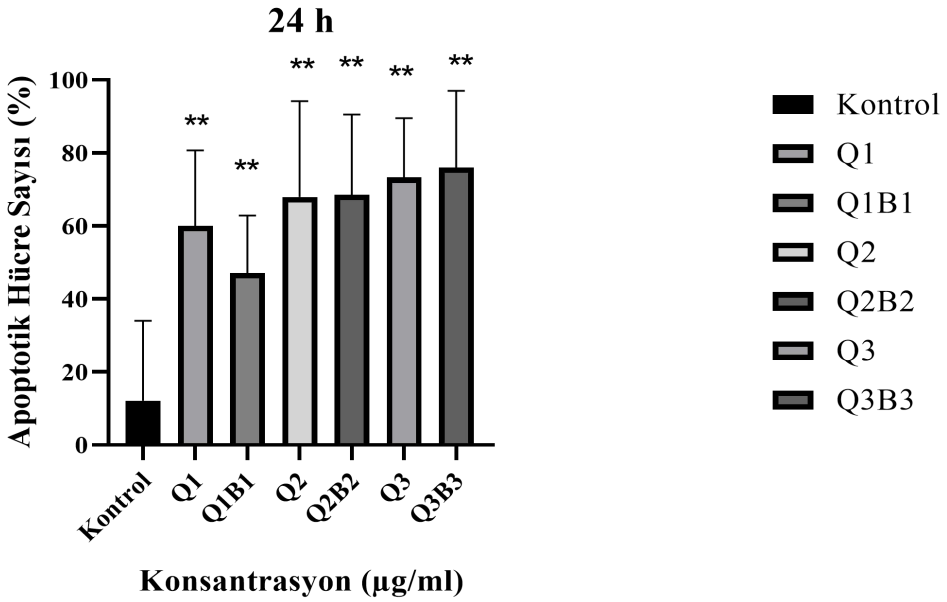


Şekil 4.41 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)



Şekil 4.42 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinin TUNEL (+) işaretlenmesinin ışık mikroskobu görüntüsü (100x)

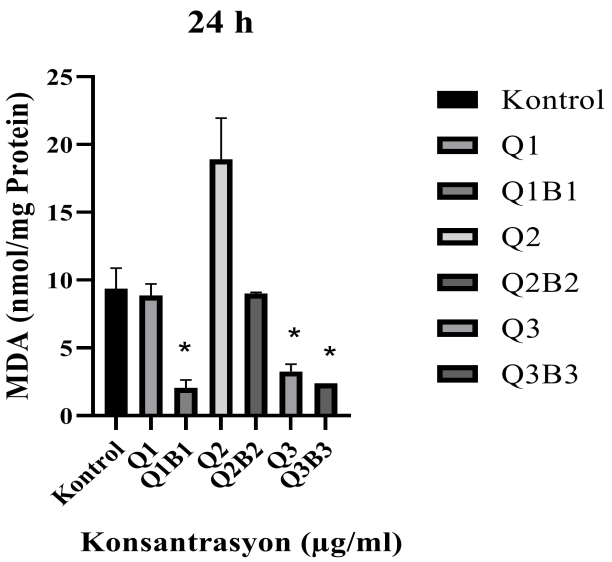
100, 150 ve 200 µg/ml kuersetin uygulaması sonucu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki apoptoza giden hücre sayısı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı ($p<0,01$). Benzer şekilde, 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit ve 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit konsantrasyonları ile muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki apoptoza giden hücre sayısı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı ($p<0,01$) (Şekil 4.43).



Şekil 4.43 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi (24 saat) (**Q1**:100 µg/ml kuersetin, **Q2**:150 µg/ml kuersetin, **Q3**:200 µg/ml kuersetin **Q1B1**:100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, **Q2B2**:150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit **Q3B3**:200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit)

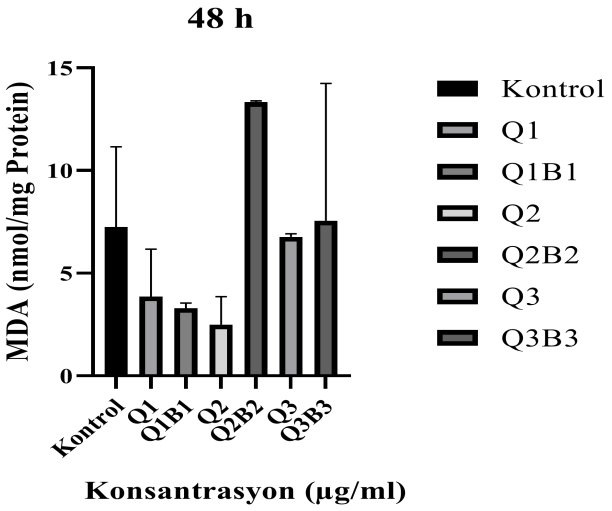
4.5 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki MDA Düzeyi

Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki lipid peroksidasyonu, MDA düzeyi üzerinden tayin edildi. Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde 24. saatteki MDA seviyesi 9,36 MDA/mg protein olarak belirlendi. 100 μg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA seviyesi 8,87 MDA/mg protein olarak hesaplandı. 150 μg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA düzeyi 18,90 MDA/mg protein olarak belirlendi. 200 μg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA düzeyi 3,25 MDA/mg protein olarak belirlendi. 100 μg/ml kuersetin + 200 μg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA seviyesi 2,05 MDA/mg protein olarak hesaplandı. 150 μg/ml kuersetin + 250 μg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki MDA düzeyi 9,00 MDA/mg protein olarak saptandı. 200 μg/ml kuersetin + 300 μg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki MDA düzeyi 2,39 MDA/mg protein olarak hesaplandı. 100 μg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA seviyesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma meydana geldi. 100 μg/ml kuersetin + 200 μg/ml borik asit kombinasyonu ve 200 μg/ml kuersetin + 300 μg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki MDA seviyesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p<0,05$). 100 μg/ml kuersetin ve 150 μg/ml kuersetin + 250 μg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki MDA düzeyi kontrole göre anlamlı olmayan biçimde azaldı. 200 μg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA seviyesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p<0,05$) (Şekil 4.44).



Şekil 4.44 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 24. saatteki MDA seviyesi

Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde 48. saatteki MDA seviyesi 7,24 MDA/mg protein olarak belirlendi. 100 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA seviyesi 3,29 MDA/mg protein olarak hesaplandı. 150 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA düzeyi 2,49 MDA/mg protein olarak saptandı. 200 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA düzeyi 6,76 MDA/mg protein olarak hesaplandı. 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA düzeyi 3,29 MDA/mg protein olarak saptandı. 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA seviyesi 13,33 MDA/mg protein olarak belirlendi. 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA düzeyi 7,56 MDA/mg protein olarak hesaplandı. 100, 150 ve 200 µg/ml kuersetin ve 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde MDA seviyesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan biçimde azaldı (Şekil 4.45).

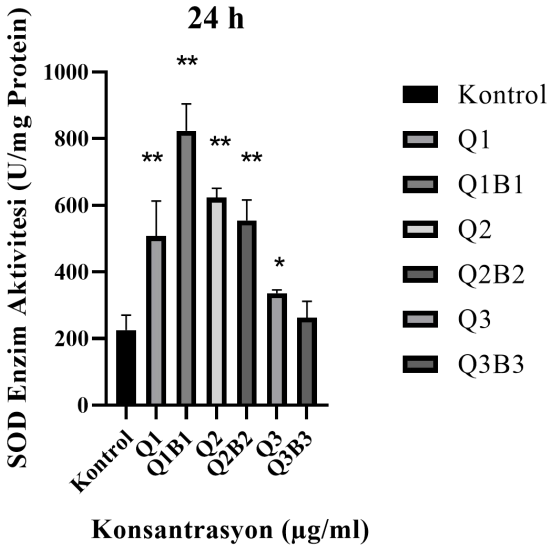


Şekil 4.45 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 48. saatteki MDA seviyesi

4.6 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki SOD Enzim Aktivitesi

Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde 24. saatteki SOD enzim aktivitesi 225,07 U/mg protein olarak hesaplandı. 100 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi 507,63 U/mg protein olarak; 150 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi 622,99 U/mg protein olarak belirlendi. 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi 336,44 U/mg protein olarak belirlendi. 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi 823,48 U/mg protein olarak saptandı. 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi 554,28 U/mg protein olarak belirlendi. 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi 262,81 U/mg protein olarak hesaplandı. 100, 150 µg/ml kuersetin, 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit ve 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde SOD enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı ($p<0,01$). 200 µg/ml kuersetin uygulanan

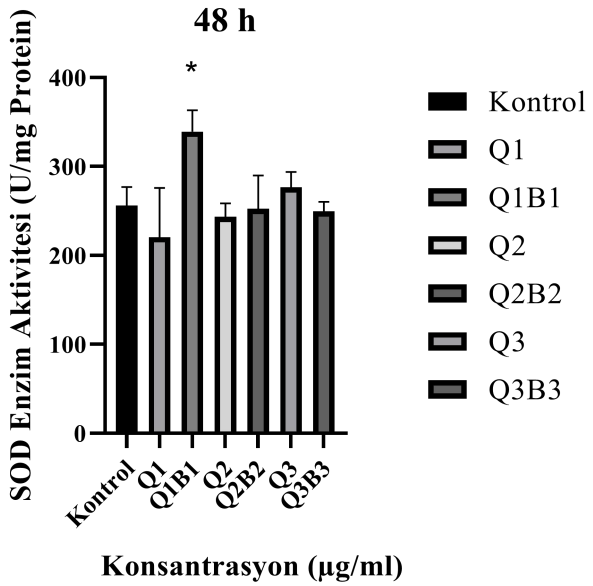
8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 24. saatteki SOD enzim aktivitesi kontrole göre anlamlı derecede arttı ($p<0,05$). 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir biçimde artış gösterdi (Şekil 4.46).



Şekil 4.46 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 24. saatteki SOD enzim aktivitesi

Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 48. saatteki SOD enzim aktivitesi 256,18 U/mg protein olarak hesaplandı. 100 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde SOD enzim aktivitesi 220,57 U/mg protein olarak; 150 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde SOD enzim aktivitesi 243,61 U/mg protein olarak hesaplandı. 200 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde SOD enzim aktivitesi 276,40 U/mg protein olarak belirlendi. 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi 339,24 U/mg protein olarak hesaplandı. 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi 252,54 U/mg protein olarak belirlendi. 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi 249,52 U/mg protein olarak saptandı. 200 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki

SOD enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan biçimde arttı. 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki SOD enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı ($p<0,05$) (Şekil 4.47).

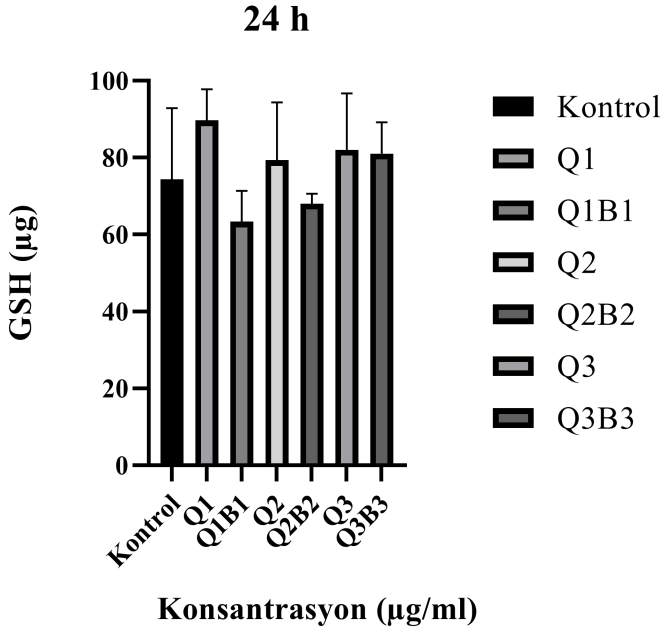


Şekil 4.47 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 48. saatteki SOD enzim aktivitesi

4.7 Kuersetin ve Kuersetin-Borik Asit Kombinasyonları ile Muamele Edilen 8305C Anaplastik Tiroid Kanseri Hücrelerindeki GSH Aktivitesi

Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 24. saatteki GSH seviyesi 74,33 µg olarak belirlendi. 100 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki GSH düzeyi 89,66 µg; 150 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde GSH seviyesi 79,33 µg olarak hesaplandı. 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde GSH düzeyi 82 µg olarak saptandı. 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde GSH düzeyi 63,33 µg; 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde GSH seviyesi 68 µg olarak belirlendi. 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki GSH düzeyi ise 81 µg olarak hesaplandı. 100, 150 ve 200 µg/ml kuersetin ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde GSH

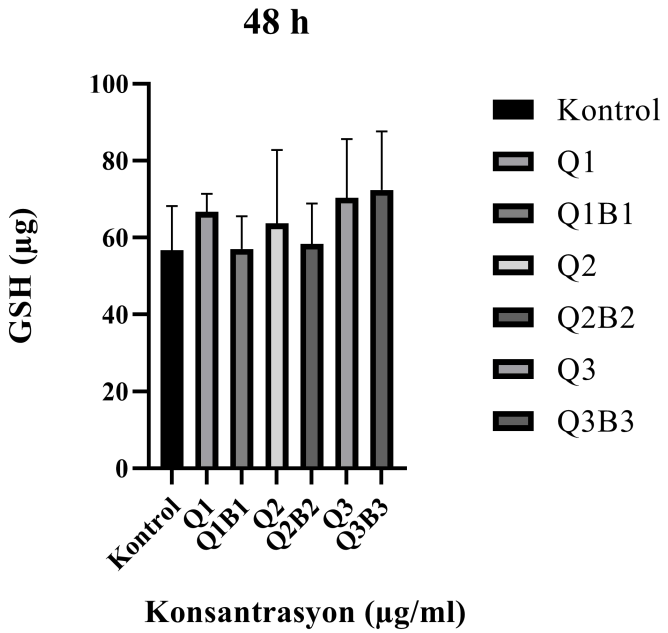
seviyesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan biçimde arttı. Benzer şekilde 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 24 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki GSH seviyesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan biçimde arttı (Şekil 4.48).



Şekil 4.48 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 24. saatteki GSH aktivitesi

Kontrol grubu 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 48. saatteki GSH seviyesi 56,66 µg olarak belirlendi. 100 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde GSH düzeyi 66,6 µg; 150 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde GSH seviyesi 63,66 µg olarak hesaplandı. 200 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde GSH düzeyi 70,33 µg olarak hesaplandı. 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki GSH düzeyi 57 µg; 150 µg/ml kuersetin + 250 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki GSH seviyesi 58,33 µg olarak belirlendi. 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki GSH düzeyi ise 72,33 µg olarak hesaplandı. 100, 150 ve 200 µg/ml kuersetin ile 48 saat muamele edilen uygulanan 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde GSH seviyesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan biçimde arttı. Benzer şekilde 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit, 150 µg/ml kuersetin +

250 µg/ml borik asit ve 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonu ile 48 saaat muamele edilen 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki GSH düzeyi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan biçimde arttı (Şekil 4.49).



Şekil 4.49 Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki 48. saatteki GSH aktivitesi

Bu tez çalışmasında; kuersetinin 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi. 24., 48., ve 72. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 138, 84 ve 22 µg/ml olarak saptandı.

Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki proliferasyonu immünositokimyasal olarak PCNA işaretleme ile gerçekleştirildi. Bulgular, kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının artan konsantrasyonlarına bağlı olarak 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde proliferasyonu azalttığını gösterdi. Çalışılan etken madde, kombinasyon ve konsantrasyonlar arasında, 8305C anaplastik tiroid kanseri hücreleri üzerindeki en yüksek antiproliferatif etkiyi 200 µg/ml kuersetin +300 µg/ml borik asit kombinasyonu gösterdi.

Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki apoptoz etkisi TUNEL işaretleme ile belirlendi. Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının artan konsantrasyonlarına bağlı olarak 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde apoptoz oranını arttırdığı saptandı. Çalışılan etken madde,

kombinasyon ve konsantrasyonlar arasında, 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki en yüksek apoptoz etkisini 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonu sağladı.

Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki antioksidan etkisi MDA, SOD ve GSH parametreleriyle gerçekleştirildi. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA'nın 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde en düşük seviyesinin 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit (24 saat) kombinasyonu ile 150 µg/ml kuersetin (48 saat) konsantrasyonun uygulandığı hücrelerde olduğu belirlendi. SOD bulguları, 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde 100 µg/ml kuersetin + 200 µg/ml borik asit kombinasyonunun (24 ve 48 saat), en yüksek enzim aktivitesine sahip olduğunu gösterdi. GSH bulguları, 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde zamana bağlı olarak 100 µg/ml kuersetin (24 saat) ve 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonun (48 saat) en yüksek GSH aktivitesine sahip olduğunu gösterdi.

Anaplastik tiroid kanseri sağkalım süresi kısa olan ve etkin bir tedavi yöntemi olmayan, metastatik özelliğe sahip agresif bir tümördür. Flavonoidler; tümör proliferasyonunun durdurulması ve kanser hücrelerinin inhibisyonu için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda; flavonoidler arasında yüksek bir antioksidan özelliğe sahip olan kuersetinin en etkili serbest radikal temizleyicilerinden biri olduğu ve hücreyi ROS'un indüklediği DNA hasarı ve mutasyonlardan koruduğu bildirilmiştir [3, 23, 111].

Kuersetinin; GSH, SOD ve MDA gibi antioksidan enzim ve parametreleri üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada; kuersetinin, kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, ksantin oksidaz aktivasyonunu önleyerek oksidatif hasarı azalttığı ve serbest radikalleri ortadan kaldırarak oksidasyonu engellediği gösterilmiştir [111]. In vivo bir çalışmada, kuersetinin aterosklerotik apolipoprotein E eksikliği olan farelerde düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksitlenmesini önlediği, LDL oksidasyonunu azaltarak ateroskleroza yakalanma riskini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca kuersetinin LDL partiküllerine bağlanarak oksidasyona karşı korunmada da katkı sağladığı gösterilmiştir [112].

Shahidi ve arkadaşlarının (1995) yaptığı bir çalışmada, başta kuersetin olmak üzere çeşitli flavonollerin bitkisel yağlarla birlikte kulanımında peroksidasyonu azaltarak

antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir [113]. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar; kuersetinin sahip olduğu antioksidan özelliklerinin toksik bileşiklere ve oksidatif stres oluşumuna yol açan etmenlere karşı beyin, kalp ve diğer dokuların korunmasına katkı sağladığını göstermiştir [114, 115].

Yapılan araştırmalarda kuersetin, çeşitli tümör hücre hatlarında spesifik etkinliğe sahip olan pro-apoptotik flavonoid olarak dikkat çekmiş ve farklı kanser hücrelerinde bir kimyasal tedavi ajanı olarak geniş çapta çalışılmıştır. Kuersetinin; çeşitli kanser hücre soylarında apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve insan kökenli farklı kanser hücre hatlarında antiproliferatif ve antitümör etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde kuersetinin; meme, akciğer ve lösemi gibi çeşitli kanser hücre hatlarında tümör büyümesini ve kanser metastazını önleyerek, apoptozu indükleyebileceği belirlenmiştir [6, 7, 10]. Bir başka çalışmada kolon karsinomu CO115 hücrelerine kuersetin uygulamasının hücre büyümesini engellediği rapor edilmiştir [116].

Braganhol ve arkadaşlarının (2006), yaptıkları bir araştırmada; kuersetinin insan glioma U138MG hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak proliferasyonu baskıladığı bildirilmiştir [117]. Kim ve arkadaşlarının (2005), yaptığı çalışmada; HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, kuersetin muamelesi sonucu hücre canlılığının doza bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir [118]. Geniz kanseri hücreleri olan CNE2 ve HK1 hücrelerinde kuersetinin toksisitesinin incelendiği bir başka araştırmada, kuersetinin doz ve zaman bağımlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir [119]. Kuersetinin, MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde de hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği rapor edilmiştir [120]. Altundağ ve arkadaşlarının (2016), yaptığı bir araştırmada; kuersetinin papiller tiroid kanseri hücre çoğalmasını inhibe ettiği, hücre proliferasyonunu baskılayarak apoptozu tetiklediği bildirilmiştir [121]. Kuersetinin gastrik karsinom BGC-823 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; kuersetin ile muamele edilen gastrik karsinoma BGC-823 hücrelerinde, apoptozun indüklendiği gösterilmiştir [122]. Grenado ve arkadaşlarının (2006), yaptığı bir çalışmada; kuersetin ile muamele edilen insan hepatoma hücre hattı (HepG2) olan karaciğer kanseri hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak proliferasyonun baskılandığı ve apoptozun indüklendiği bildirilmiştir [39].

Uluğ ve arkadaşlarının (2011), yaptığı bir çalışmada; HeLa kanser hücre hattında

kuersetinin IC_{50} değeri 546.2 µg/ml olarak rapor edilmiştir [123]. Ranganathan ve arkadaşları (2015), kuersetinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde IC_{50} değerini 37 µM olarak hesaplamıştır [29]. Rahimifard ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, T47D meme kanseri hücre hattının kuersetin ile 24 saat muamelesi sonucunda IC_{50} değeri 40 µM olarak rapor edilmiştir [124]. Kuersetinin, insan akciğer A-549 hücrelerindeki 24. 48. ve 72. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 1.02±0.05, 1.41±0.20, 1.14±0.19 µmol/l olarak bildirilmiştir [125]. İnsan kemik kanseri hücrelerinde, kuersetinin 24. ve 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 290 µM ve 160 µM olarak hesaplanmıştır [126]. Yapılan bir çalışmada; 2,5 µM dozda kuersetinin, epigallokateşingallat ve genistein adlı fenolik bileşiklerle birlikte kullanımının, CWR22Rv1 prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir [127].

Coşan ve arkadaşları (2015), CaCo-2 kolon kanseri hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan kuersetinin 24. saatteki TUNEL testi sonucunda kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısını arttırdığını bildirmişlerdir [128].

Fare RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde yapılan bir araştırmada kuersetin uygulamasının hücre büyümesini uyardığı gösterilmiştir [129]. Baltacı ve arkadaşlarının (2016), yaptıkları bir araştırmada, sıçan testislerinde arseniğin yol açtığı hasara karşı kuersetinin etkisi araştırılmıştır. Kuersetin muamelesi sonucu TUNEL pozitif hücre sayısının azaldığı, PCNA pozitif hücre sayısının arttığı bildirilmiştir. Kuersetin uygulaması ile apoptoz baskılanırken, proliferasyonun arttığı gösterilmiştir. Ayrıca kuersetinin SOD, GSH-Px düzeylerinin artmasını; MDA seviyesinin azalmasını sağladığı rapor edilmiştir [12].

In vitro çalışmaların yanı sıra hayvan deneyleri de kuersetinin anti-kanser etkinliğini desteklemektedir. Diyabetik sıçan testislerinde kuersetinin proliferasyon, apoptoz ve oksidatif stres etkileri üzerine yapılan bir araştırmada, kuersetin uygulanmasının sıçan testis dokularında lipid peroksidasyonunda anlamlı bir düşüş sağladığı bildirilmiştir. Kuersetin ile tedavi edilen diyabetik grupta, tedavi uygulanmayan grupla karşılaştırıldığında GSH-Px ve SOD aktivitelerinin önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir. Kuersetinin; antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak, ROS seviyelerini düşürmesinin yanı sıra, diyabetik tedavi uygulanmayan gruba kıyasla tedavi grubunda apoptoz aktivitesinde anlamlı bir düşüş olduğu ve kuersetin uygulamasının diyabetik gruba kıyasla tedavi uygulanmayan grupta PCNA indeksini anlamlı şekilde arttırdığı

rapor edilmiştir. Bu veriler sonucunda kuersetin uygulamasının diyabetin neden olduğu oksidatif DNA hasarını ve sıçan testisindeki apoptozu iyileştirdiği bildirilmiştir [130]. Aktöz ve arkadaşlarının (2012), yaptıkları araştırmada; kadmiyuma maruz kalmış gruba kıyasla kuersetin ile tedavi edilen grupta PCNA pozitif hücre sayısının arttığı bildirilmiştir. TUNEL işaretleme ile yapılan apoptoz incelemesinde, kadmiyuma maruz kalmış farelerde TUNEL pozitif hücre sayısının, kuersetin ile tedavi edilen gruba oranla arttığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlara göre kuersetinin, kadmiyumun indüklediği renal toksisiteyi azaltabileceği gösterilmiştir [11].

Alexander ve arkadaşlarının (2008), kuersetin, resveratrol ve kateşinin fare meme kanseri hücreleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; bu polifenollerin kombinasyonlarının güçlü bir etki gösterdiği ve tümör hücre çoğalmasının önemli ölçüde azalmasını sağladığı bildirilmiştir [131]. Pour ve arkadaşlarının (2017), yaptıkları çalışmada; kuersetin ve C vitamini kombinasyonunun meme kanseri hücrelerinde oksidatif stres parametreleri üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir [132]. Yang ve arkadaşlarının (2015), yaptıkları bir araştırmada; kuersetin ve 2-metoksiestradiol kombinasyonunun, insan prostat kanseri hücreleri LNCaP ve PC-3 hücrelerinde tümör inhibisyonunun artmasını sağladığı bildirilmiştir [133]. Gilbert ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; kuersetin ile tedavi edilen hayvanlarda hayatta kalma hızında belirgin bir artış ve tümör hacminde belirgin bir azalma olduğu rapor edilmiştir [134].

Kuersetinin 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki sitotoksik, antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerine yönelik elde edilen bulgularımız, kuersetinin çeşitli hücre soylarındaki etkileri ile ilgili araştırma sonuçlarını desteklemektedir.

Borik asit, bazı kanserlerin tedavisinde kullanılan bir bileşiktir. Scorei ve arkadaşlarının (2008), borik asidin göğüs kanseri hücreleri üzerindeki etkileri üzerine yaptıkları ve TUNEL işaretleme yönteminin kullanıldığı çalışmalarında borik asit muamelesinin apoptoz üzerinde sınırlı bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [135]. Yüksek dozda borik asidin (12.5-50 mM), malignant karakterli deri kanseri SK-MEL28 hücre hattında hücre çoğalmasını doza bağlı bir şekilde yavaşlattığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Araştırmada borik asit konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı rapor edilmiştir [136].

Baş ve boyun kanseri hücresi hatlarında borik asidin hücre proliferasyonunu inhibe

ettiği bildirilmiştir [14]. Bir başka araştırmada borik asidin, prostat kanseri hücreleri olan DU-145 ve LNCaP çoğalmasını doza bağlı olarak engellediği rapor edilmiştir [42]. İnsan kemik iliği kanseri K562 hücrelerinde borik asidin doz ve zamana bağlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir [137]. Borik asidin lösemi hücreleri üzerindeki toksisite ve apoptozdaki etkisinin incelendiği çalışmada; lösemi hücrelerinde sitotoksiteye yol açtığı ve apoptozu indüklediği rapor edilmiştir [138]. Borik asidin, ZR-75-1 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde doza bağımlı olarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir [139]. Borik asit ile yapılan bir çalışmada; diyetteki bor bileşikleri takviyesinin lipid peroksidasyonunu azaltabildiği ve antioksidan savunma mekanizmasının etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir [140].

Kuersetin-borik asit kombinasyonlarının 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkilerine yönelik elde edilen bulgularımız, borik asidin prostat, lösemi ve meme kanseri hücre soylarındaki etkileri ile ilgili araştırma sonuçlarıyla uyumludur.

Buna göre;

- Kuersetin, 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermektedir.
- Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonları 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde antiproliferatif etki göstermektedir.
- Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonları 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemektedir.
- PCNA ve TUNEL sonuçları borik asidin, 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde kuersetinin antiproliferatif ve apoptotik etkisini arttırabileceğini göstermektedir.
- 200 µg/ml kuersetin + 300 µg/ml borik asit kombinasyonu, 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerine karşı en yüksek antiproliferatif ve apoptotik aktiviteye sahiptir.
- Antioksidan parametreleri PCNA ve TUNEL sonuçları ile de uyumludur. Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonları doza bağlı olarak, 8305C anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde SOD ve GSH seviyelerinin artmasını sağlarken; MDA düzeyinin de azalmasını sağlayarak antioksidan etkinliğini ortaya koymaktadır.

Tüm bu sonuçlara göre;

- Kuersetin ve kuersetin-borik asit kombinasyonları 8305C anaplastik tiroid kanseri hücre hattındaki antioksidan aktivitesi ile serbest radikallerin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunarak kanserin yayılmasını önleyebilir.
- Kuersetin ve kuersetin-borik asit yüklü nanopartiküllerin oluşturulması ve buna yönelik gerçekleştirilecek çalışmalar, 8305C anaplastik tiroid kanserine yönelik daha etkin bir tedavi yöntemi sağlayabilir.
- Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, tedaviye yönelik olarak ilaç tasarım ve koruyucu olarak gıda takviyesi çalışmalarına katkıda bulunacaktır. Ayrıca, bu araştırma sonuçlarının in vivo deneylerle zenginleştirilebileceği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Pavlopoulou, A., Spandidos, D.A. ve Michalopoulos, I., (2015). "Human cancer databases" , Oncol Rep, 33(1): 3-18.

[2] Baykara, O., (2016). "Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar", Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(3): 154-165.

[3] Are, C. ve Shaha A.R., (2006). "Anaplastic thyroid carcinoma: biology, pathogenesis, prognostic factors, and treatment approaches", Annals of surgical oncology, 13(4): 453-464.

[4] Yau, T., Lo, C.Y., Epstein, R.J., Lam, A.K., Wan, KY. ve Lang, B.H., (2008). " Treatment outcomes in anaplastic thyroid carcinoma: survival improvement in young patients with localized disease treated by combination of surgery and radiotherapy", Annals of surgical oncology, 15(9): 2500-2505.

[5] Ito, T., Seyama, T., Hayashi, Y., Hayashi, T., Dohi K., Mızuno, T., Iwamoto K.S., Tsuyama, N., Nakamura N. ve Akiyama, M., (1994). "Establishment of 2 human thyroid-carcinoma cell-lines (8305C, 8505C) bearing p53 gene-mutations", International Journal of Oncology, 4: 583–6.

[6] Kang, T.B. ve Liang, N.C., (1997). "Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukaemia cells", Biochemical Pharmacology, 54(9): 1013-1018.

[7] Choi, J.A., Kim, J.Y., Lee, J.Y., Kang, C.M., Kwon, H.J., Yoo, Y.D., Kim, T.W., Lee, Y.S. ve Lee, S.J., (2001). "Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin", International Journal of Oncology, 19: 837-844.

[8] Kobayashi, T., Nakata, T. ve Kuzumaki, T., (2002). "Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells", Cancer Lett, 176(1): 17-23.

[9] Wei, Y.Q., Zhao, X., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K. ve Uchida, A., (1994). "Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein", Cancer Research, 54(18): 4952-4957.

[10] Hashemzaei, M., Delarami Far, A., Yari, A., Heravi, R.E., Tabrizian, K., Taghdisi, S.M., Sadegh, S.E., Tsarouhas, K., Kouretas, D., Tzanakakis, G., Nikitovic, D., Anisimov, N.Y., Spandidos, D.A., Tsatsakis, A.M. ve Rezaee, R., (2017). "Anticancer and apoptosis inducing effects of quercetin in vitro and in vivo", Oncology Reports, 38: 819-828.

[11] Aktoz, T., Kanter, M., Uz, Y.H., Aktaş, C., Erboğa, M. ve Atakan, İ.H., (2012). "Protective effect of quercetin against renal toxicity induced by cadmium in rats", Balkan Medical Journal, 29: 56–61.

[12] Baltaci, B.B., Uygur, R., Caglar, V., Aktas, C., Aydin, M. ve Ozen, O.A., (2016). "Protective effects of quercetin against arsenic-induced testicular damage in rats", Andrologia, 48(10): 1202-1213.

[13] Eckhert, C.D., (1998). "Boron stimulates embryonic trout growth", The Journal of Nutrition, 128(12): 2488–2493.

[14] Gunduz, M., Acar, M., Fakioglu, K., Dogan, B., Oznur, M. ve Gunduz, E., (2014). "Effect of boric acid on head and neck cancer cell lines", 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 5–8 July 2014, Munich.

[15] Barranco, W.T. ve Eckhert, C.D., (2006). "Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer", British Journal of Cancer, 94(6): 884 – 890.

[16] DeLellis, R.A., Lloyd, R.V. ve Heitz, P.U., Pathology and Genetics: Tumors of Endocrine Organs. WHO classification of Tumors. IARC Press, Lyon 2004.

[17] Hofstra, R.M., Landsvater, R.M., Ceccherini, I., Stulp, R.P., Stelwagen, T., Luo, Y., Pasini, B., Hoppener J.W., Amstel, H.K., Romeo, G., Lips C.J. ve Buys, C.H., (1994). "A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma", Nature, 367: 375-376.

[18] Thyroid Cancer Center, Anaplastic Thyroid Cancer Overview, https://www.thyroidcancer.com/thyroid-cancer/anaplastic, 10 Mart 2019.

[19] Green, L.D., Mack, L. ve Pasieka, J.L., (2006). "Anaplastic thyroid cancer and primary thyroid lymphoma: a review of these rare thyroid malignancies", Journal of Surgical Oncology, 94: 725–36.

[20] De Groot, H. ve Rauen, U., (1998). "Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids", Fundam Clin Pharmacol, 12: 249-55.

[21] Rusznyak, S.P. ve Szent-Gyorgyi, A., (1936). "Vitamin P: flavonols as

vitamins", Nature, 138, 27.

[22] Ross, J.A. ve Kasum, C.M., (2002). "Dietary flavonoids: bioavailability,metabolic effects, and safety", Annual Review of Nutrition, 22:19-34; Derleyen: Kumar, J.K. ve Sinha, A.K., (2004). "Resurgence of natural colourants: A holistic view", Natural Product Letters, 18(1): 59-84.

[23] Coşkun, T., (2005). "Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri", Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 48: 69-84.

[24] Kolaç, T., Gürbüz, P. ve Yetiş, G., (2017). "Doğal Ürünlerin Fenolik İçeriği ve Antioksidan Özellikleri", İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi, 5(1).

[25] Moskuag, J.O., Carlson, H., Myhrstad, M. ve Blomhoff, R., (2004). "Molecular Imaging of the biological effects of Quercetin and Quercetin-rich foods", Mechanisms of Ageing and Development, 125(4): 315-24.

[26] U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information, Compound Summary Quercetin, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/quercetin#section=Top, 5 Mart 2019.

[27] Formica, J.V. ve Regelson, W., (1995). "Review of the of quercetin and related biology bioflavonoids", Food and Chemical Toxicology, 33(12): 1061-1080.

[28] Chedea, V.S., Vicas, S.I., Socaciu, C., Nagaya, T., Ogola, H.J.O., Yokota, K., Nishimura, K. ve Jisaka M., (2012). "Lipoxygenase-Quercetin interaction: a kinetic study through biochemical and spectroscopy approaches", Biochemical Testing InTech, 151-178.

[29] Ranganathan, S., Halagowder, D. ve Sivasithambaram, N.D., (2015). "Quercetin suppresses twist to induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells", PLoS One, 10(10): e0141370.

[30] Fox, C.C., Wolf, E.J., Kagey-Sobotka, A. ve Lichtenstein, L.M., (1998). "Comparison of human lung and intestinal mast cells", Journal of Allergy and Clinical Immunology, 81(1): 89-94.

[31] Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen, H., Heliovaara, M, Reunanen, A., Hakulinen, T. ve Aromaa, A., (2002). "Flavonoid intake and risk of chronic diseases ", The American Journal of Clinical of Nutrition, 76(3): 560-568.

[32] Sameni, H.R., Javadinia, S.S., Safari, M., Tabrizi Amjad, M.H., Khanmohammadi, N., Parsaie, H. ve Zarbakhsh, S., (2018). "Effect of quercetin on the number of blastomeres, zona pellucida thickness, and hatching rate of mouse embryos exposed to actinomycin D: An experimental study", Int J Reprod Biomed, 16(2): 101-8.

[33] Liu, X., Yu, Z., Huang, X., Gao, Y., Wang, X., Gu, J. ve Xue, S., (2016). "Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) mediates the protective effect of quercetin against myocardial ischemia-reperfusion injury via suppressing the NF-κB pathway", Am J Transl, 8: 5169-5186.

[34] Lu, X.L., Zhao, C.H., Yao, X.L. ve Zhang, H., (2017). "Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS-regulated PI3K/AKT signaling pathway", Biomed Pharmacother, 85: 658–71.

[35] Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B. ve Kromhout, D., (1993). "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study", Lancet, 342(8878): 1007-1011.

[36] Keli, S.O., Hertog, M.G., Feskens, E.J. ve Kromhout, D., (1996). "Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study", Arch Intern Med,156(6): 637-642.

[37] David, A.V., Arulmoli, R. ve Parasuraman, S., (2016). "Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid", Pharmacognosy Reviews, 10(20): 84–89.

[38] Chien S.Y., Wu Y.C., Chung J.G., Yang J.S., Lu, H.F., Tsou, M.F., Wood ,W.G., Kuo, S.J. ve Chen, D.R., (2009). "Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial and caspase-3 dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells", Hum Exp Toxicol, 28: 493-503.

[39] Grenado-Serrano, A.B., Martin, M.A., Bravo, L., Goya, L. ve Ramos, S., (2006). "Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3 Kinase/Akt and ERK Pathways in a human hepatoma cell line (HepG2)", The Journal of Nutrition; 136(11): 2715-21.

[40] Yılmaz, A., (2002). "Her Derde Deva Hazinemiz Bor", TUBİTAK-Bilim ve Teknik Dergisi, 414, 38-41.

[41] Bilgiç, M. ve Dayık, M., (2013). "Borun özellikleri ve tekstil endüstrisinde kullanımıyla sağladığı avantajlar", Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 7(2): 27-37.

[42] Barranco, W.T. ve Eckhert, C.D., (2004). "Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation", Cancer Letters, 216(1): 21–29.

[43] Fort, D.J, Propst, T.L., Stover, E.L., Murray, F.J. ve Strong, P.L., (1999). "Adverse effects from low dietary and environmental boron exposure on reproduction, development, and maturation in Xenopus laevis", The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine, 12: 175–186.

[44] Diplock, A., (1998). "Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients ", ILSI Europe concise monograph series, 59 p.,

Belgium.

[45] Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S. ve Auroma, O.I., (1995). "Free radicals and antioxidants in food and in vivo:what they do and how they work?", Critical Review in Food Science and Nutrition, 35: 7-20; Derleyen: Kaur, C. ve Kapoor, H.C., (2001). "Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health", International Journal of Food Science and Technology, 36; 703-725.

[46] Devasagayam, T.P., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S. ve Lele, R.D., (2004). "Free radicals and antioxidants in Human Health: Current status and future prospects", Journal of Association of Physicians of India, 52:794–804.

[47] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M. ve Telser, J., (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39(1): 44-84.

[48] Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z., (2015). "Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri", Journal of Clinical and Experimental Investigations, 6(3): 331-336.

[49] Motor, S., Ozturk, S., Ozcan, O, Gurpinar, A.B., Can, Y., Yuksel, R., Yenin, J.Z., Seraslan, G. ve Ozturk, O.H., (2014). "Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stres index in patients with alopecia areata", International Journal of Clinical Experimental Medicine, 7: 1089-1093.

[50] Burçak, G. ve Andican, G., (2004). "Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma", Cerrahpasa Journal of Medicine, 35: 159-169.

[51] Halliwell, B. ve Chirico, S., (1993). "Lipid Peroxidation:its mechanism, measurement and significance", The American Journal of Clinical Nutrition, 57(1):715 -25.

[52] Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01b.pdf , 5 Mart 2019.

[53] Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A. ve Deemer, E.K., (2002). "Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(11): 3122-3128.

[54] Johnson, F. ve Giulivi, C., (2005). "Superoxide dismutases and their impact upon human health", Mol Aspects Med, 26 (4-5): 340-52.

[55] Fukai, T. ve Ushio-Fukai, M., (2011). "Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases", Antioxid Redox Signal, 15(6):

1583–1606.

[56] Glasauer, A., Sena, L.A., Diebold, L.P., Mazar, A.P. ve Chandel, N.S., (2014). "Targeting SOD1 reduces experimental non–small-cell lung cancer", J Clin Invest, 124 (1): 117-28.

[57] Senturk, M., Talaz, O., Cavdar, H., Ekinci, D. ve Kufrevioglu, O.I., (2009). "In vitro inhibition of human erythrocyte glutathione reductase by some new organic nitrates", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19(13): 3661-3663.

[58] Aydın, A., Sayal, A. ve Işımer, A., (2001). Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Sistemi, GATA Basımevi, Ankara.

[59] Messina, J.P, Lawrence, D.A., (1989). "Cell cycle progression of glutathione-depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase", Journal of Immunology, 143(6):1974–1981.

[60] Passwater, R.A., (2015), Longer Lifespans and Better Health with Glutathione: Taking the Confusion Out of the Master Antioxidant, https://wholefoodsmagazine.com/columns/vitamin-connection/longer-lifespans-and-better-health-glutathione-taking-confusion-out-maste/, 5 Mart 2019.

[61] Sherr, C.J., (2000). "The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited", Cancer Res, 60(14): 3689-95.

[62] Vermeulen, K., Berneman, Z.N. ve Van Bockstaele, D.R., (2003). "Cell cycle and apoptosis", Cell Prolif, 36(3): 165-75.

[63] Tulay, P., DNA Tamir Sistemleri, https://studylibtr.com/doc/972203/dna-tamir-sistemleri, 1 Mart 2019.

[64] Yuan, J. ve Yankner, B.A., (2000). "Apoptosis in the nervous system", Nature, 407(6805): 802-9.

[65] Giacinti, C. ve Giordano, A., (2006). "RB and cell cycle progression", Oncogene, 25(38): 5220-7.

[66] Matsumoto, K., Moriuchi, T., Koji, T. ve Nakane, P.K., (1987). "Molecular cloning of c-DNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin", The Embo Journal, 6(3): 637-42.

[67] Maga, G. ve Hubscher, U., (2003). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA):a dancer with many partners", J Cell Sci, 116: 3051-3060.

[68] Tsurimoto, T., (2006). "PCNA-interacting proteins in: Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)", pp. 25–49, Research Signpost, Kerala.

[69] Balajee, A.S., Dianova, I. ve Bohr, V.A., (1999). "Oxidative damage-induced PCNA complex formation is efficient in xeroderma pigmentosum group A but reduced in Cockayne syndrome group B cells" Nucleic Acids Res, 27(22): 4476-4482.

[70] Stoimenov, I. ve Helleday, T., (2009). "PCNA on the crossroad of cancer" Biochem. Soc.Trans., 37(3): 605–613.

[71] Öztürk, F., (2002). "Apopitoz", İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9(2): 143-148.

[72] Kerr, J.F., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R., (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", Br J Cancer, 26(4): 239-57.

[73] Hızel, N., (1997). "Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü)", Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi, 6:196-7.

[74] Thompson, C.B., (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease", Science, 267(5203): 1456–1462.

[75] Nagata, S., (1997). "Apoptosis by death factor", Cell, 88(3): 355-365.

[76] Vaux, D.L. ve Korsmeyer, S.J, (1999). "Cell death in development", Cell, 96(2): 245-54.

[77] Roshal, M., Zhu, Y. ve Planelles, V., (2001). "Apoptosis in AIDS", Apoptosis, 6: 103–116.

[78] Adrain, C. ve Martin, S.J., (2001). "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas", Trends Biochem Sci, 26(6): 390-7.

[79] Essmann, F., (2000). Mechanisms of apoptosis in cancer; regulatory role of caspases, Doktora Tezi, Belin Teknik Üniversitesi, Berlin.

[80] Ziegler, U. ve Groscurth, P., (2004). "Morphological features of cell death", News Physiol Sci, 19:124-128.

[81] Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S. ve Melino, G., (2005). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death", Cell Death Differ, 12:1463-1467.

[82] Öktem, S., Özhan, M.H. ve Özol, D., (2001). "Apoptozisin önemi", Toraks Dergisi, 2(1): 91-95.

[83] Gürbilek, M., Dağlar, C., Aköz, M. ve Topçu, C., (2004). "Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na+/K+-ATPaz enzim

aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi", Türk Biyokimya Dergisi, 29(3): 237-242.

[84] Lin, J.D., (2001). "The role of apoptosis in autoimmune thyroid disorders and thyroid cancer", BMJ, 322:1525–1527.

[85] Palmer, A.M., Greengrass, P.M. ve Cavalla, D., (2000). "The role of mitochondria in apoptosis", Drug News & Perspectives, 13(6): 378-384.

[86] Mao, C. ve Obeid, L.M., (2008). "Ceramidases:regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1- phosphate", Biochim Biophys Acta, 1781(9): 424-34.

[87] Boise, L.H, Noel, P.J. ve Thompson, C.B., (1995). "CD28 and apoptosis", Curr Opin Immuno, 7:620-5.

[88] Miyake, Y., Aratake, Y., Sakaguchi, T., Kiyoya, K., Kuribayashi, T., Marutsuka, K. ve Ohno, E., (2012). "Examination of CD26/DPPIV, p53, and PTEN expression in thyroid follicular adenoma", Diagn Cytopathol 40:1047-53.

[89] Fernandez, I.J., Piccin, O., Sciascia, S., Cavicchi, O., Repaci, A., Vicennati, V. ve Fiorentino, M., (2013). "Clinical significance of BRAF mutation in thyroid papillary cancer", Otolaryngol Head Neck Surg, 148: 919-25.

[90] Soares, P., Lima., J., Preto, A., Castro, P., Vinagre, J., Celestino, R., Couto, J.P., Prazeres, H., Eloy, C., Máximo, V. ve Sobrinho-Simões, M., (2011). "Genetic alterations in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas", Curr Genomics, 12: 609-17.

[91] Lee, Y.M. ve Lee, J.B., (2013). "Prognostic value of epidermal growth factor receptor, p53 and galectin-3 expression in papillary thyroid carcinoma", Int Med Res, 41: 825- 34.

[92] Grande, E., Díez, J.J., Zafon, C. ve Capdevila, J., (2012). "Thyroid cancer: molecular aspects and new therapeutic strategies", J Thyroid Res, 847108.

[93] Saraste, A. ve Pulkki, K., (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis", Cardiovasc Res, 45(3): 528-537.

[94] Galle, P.R., (1997). "Apoptosis in liver disease", Journal of Hepatology, 27(2): 405-412.

[95] Hussain, A., (2017), The New Treatment Can Make Cancer Cells Self Destructive- Research Suggests, https://reportshealthcare.com/7312/new-treatment-can-make-cancer-cells-self-destructive-research-suggests/, 5 Mart 2019.

[96] Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. ve Aster, J., (2010). Robins and Cotran

Pathologic Basis of Disease, 8th Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia.

[97] Narula, J., Kharbanda, S. ve Khaw, B.A., (1997). "Apoptosis and the Heart", Chest, 112:1358-62.

[98] Aiello, A., Pandini, G., Frasca, F., Conte, E., Murabito, A., Sacco, A., Genua, M., Vigneri, R. ve Belfiore, A., (2006). "Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor-γ Agonists Induce Partial Reversion of Epithelial-Mesenchymal Transition in Anaplastic Thyroid Cancer Cells", Endocrinology, 147(9): 4463–4475.

[99] Jia, L.Q., Osada, M., Ishioka, C., Gamo, M., Ikawa, S., Suzuki, T., Shimodaira, H., Niitani, T., Kudo, T., Akiyama, M., Kimura, N., Matsuo, M., Mizusawa, H., Tanaka, N., Koyama, H., Namba, M., Kanamaru, R. ve Kuroki, T., (1997). "Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay", Mol Carcinog, 19(4): 243-253.

[100] Strober, W., (2015). "Trypan blue exclusion test of cell viability", Curr Protoc Immunol, 111:A3.B.1-A3.B.3.

[101] Berridge, M., Tan, A., McCoy, K. ve Wang, R., (1996). "The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts", Biochemica, 4:14–19.

[102] Marshall, N.J., Goodwin, C.J. ve Holt, S.J., (1995). "A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function", Growth Regul, 5(2): 69– 84.

[103] Hansen, M.B., Nielsen, S.E. ve Berg, K., (1989). "Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill", J. Immunol Methods, 119(2): 203–210.

[104] Vairetti, M., Ferrigno, A., Bertone, R., Richelmi, P., Berte, F. ve Freitas, I., (2005). "Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes", Biochimica et Biophysica Acta, 1740(3): 367-374.

[105] Kockx, M.M., Muhring, J., Knaapen, M.W. ve de Meyer, G.R., (1998). "RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis", Am J Pathol, 152(4): 885-8.

[106] Ansari, B., Coates, P.J., Greenstein, B.D. ve Hall, P.A., (1993). "In situ end-labeling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states", J. Pathol, 170:1–8.

[107] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. ve Klenk, D.C., (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid", Anal. Biochem., 150(1): 76–85.

[108] Köçkar, F. ve Yavuz, E., Protein Konsantrasyonu Tayin Metodları, https://dokumen.tips/documents/protein-konsantrasyonu-tayin-metodlari.html, 5 Mart 2019.

[109] Sun, Y., Oberley, L.W. ve Li, Y., (1988). "A simple method for clinical assay of superoxide dismutase", Clin Chem, 34(3): 497-500.

[110] Riddles, P.W., Blakeley, R.L. ve Zerner, B., (1979). "Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination", Anal. Biochem., 94(1): 75-81.

[111] Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Biasi, S.D., Roat, E., Bertoncelli, L. ve Cossarizza, A., (2010). "Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of quercetin", Cancers, 2(2): 1288-1311.

[112] Hayek, T., Belinky, P.A., Fuhrman, B., Rosenblat, M., Vaya, J. ve Aviran, M., (1997). "Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation", Atheroscler Thromb Vasc Biol, 17(11): 2744-52.

[113] Shahidi, F. ve Naczk, M., (2002). Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications, 2nd Edition, Boca Raton, London.

[114] Choi, E.J., Lee, B.H., Lee, K. ve Chee, K.M., (2005). "Long-term combined administration of quercetin and daidzein inhibits quercetin-induced suppression of glutathione antioxidant defenses", Food Chem Toxicol, 43(5): 793-798.

[115] Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Hellovaara, M., Teppo, L., Pukkala, E. ve Aromaa, A., (1997). "Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms", Am J Epidemiol, 146(3): 223–30.

[116] Murtaza, I., Marra, G., Schlapbach, R., Patrignani, A., Kunzli, M., Wagner, U., Sabates, J. ve Dutt, A., (2006). "A preliminary investigation demonstrating the effect of quercetin on the expression of genes related to cell-cycle arrest, apoptosis and xenobiotic metabolism in human CO115 colon-adenocarcinoma cells using DNA microarray", Biotechnology and Applied Biochemistry, 45:29-36.

[117] Braganhol, E., Zamina, L.L., Canedoa, A.D., Hornb, F., Tamajusukua, A.S.K., Wink, M.R., Salbegoa, C. ve Battastini, A.M.O., (2006). "Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line", Anti-Cancer Drugs, 17(6): 663–671.

[118] Kim, W.K., Bang, M.H., Kim, E.S., Kang, N.E., Jung, K.C., Cho, H.J. ve Park, J.H., (2005). "Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells", J Nutr Biochem, 16:155-162.

[119] Ong, C.S., Tran, E., Nguyen, T.T., Ong, C.K., Lee, S.K., Lee, J.J., C, Ng, C.P., Leong, C. ve Huynh, H., (2004). "Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions", Oncol Rep, 11(3): 727-733.

[120] Choi, E.J., Bae, S.M. ve Ahn, W.S., (2008). "Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells", Arch Pharm Res., 31(10):1281- 1285.

[121] Altundag, E.M., Kasaci, T., Yılmaz, A.M., Karademir, B., Kocturk, S., Taga, Y. ve Yalcın, A.S., (2016). "Quercetin-induced cell death in human papillary thyroid cancer (B-CPAP) cells", J. Thyroid Res, 2016: 1-10.

[122] Wang, P., Zhang, K, Zhang, Q., Meib, J., Chen, C., Feng, Z. ve Yu, D., (2012). "Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells", Toxicology in Vitro, 26(2): 221–228.

[123] Ulug, M., Turk, M., Oguztuzun, S., Menemen, Y. ve Kahraman, G., (2011). "Apoptotic and necrotic effects of carboxylated quercetin/polyethylenimine complex on HeLa cells", African Journal of Pharmacy and Phamarcology, 5(7): 894-902.

[124] Maryam, R., Faegheh S., Majid, A.S. ve Kazem, N.K., (2017). "Effect of quercetin on secretion and gene expression of leptin in breast cancer", Journal of Traditional Chinese Medicine, 37(3): 321-325.

[125] Zheng, S.Y., Li, Y., Jiang, D., Zhao, J. ve Ge, J.F., (2012). "Anticancer effect and apoptosis induction by quercetin in the human lung cancer cell line A-549", Mol Med Report, 5(3): 822–6.

[126] Suh, D.K., Lee, E.J., Kim, H.C. ve Kim, J.H., (2010). "Induction of G(1)/S phase arrest and apoptosis by quercetin in human osteosarcoma cells", Archives of Pharmacal Research, 33(5): 781–785.

[127] Hsieh, T.C. ve Wu, J.M.,(2009). "Targeting CWR22Rv1 prostate cancer cell proliferation and gene expression by combinations of the phytochemicals EGCG, genistein and quercetin", Anticancer Res., 29(10): 4025–32.

[128] Cosan, D.T., Soyocak, A., Basaran, A., Degirmenci, I., Güneş, H.V. ve Bal, C., (2015). "How does quercetin and tamoxifen affect the apoptosis of colon cancer cells?", Osmangazi Tıp Dergisi, 37(2): 14–20.

[129] Nayak, B.N., Kaur, G. ve Buttar, H.S., (2016). "TNF-α modulation by natural bioactive molecules in mouse RAW 264.7 macrophage cells", J Complement Integr Med, 13(1): 1–7.

[130] Kanter, M., Aktas, C. ve Erboga, M., (2011). "Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat

testis", Food and Chemical Toxicology, 50(3-4): 719-725.

[131] Schlachterman, A., Valle, F., Wall, K.M., Azios, N.G., Castillo, L., Morell, L., Washington, A.V., Cubano L.A. ve Dharmawardhane, S.F., (2008). "Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model", Transl Oncol, 1(1): 19-27.

[132] Pour, Z.M., Ramezani, F., Keshavarzi, F. ve Samadi, N., (2017). "The role of quercetin and vitamin C in Nrf2-dependent oxidative stress production in breast cancer cells", Oncol Lett, 13(3): 1965–73.

[133] Yang, F., Song, L., Wang, H., Wang, J., Xu, Z. ve Xing, N., (2015). "Combination of quercetin and 2-methoxyestradiol enhances inhibition of human prostate cancer LNCaP and PC-3 cells Xenograft tumor growth", PLoS One, 10(5): 26.

[134] Gilbert, S.F., (2013). Developmental Biology, 10th Edition, Sinauer Associates, Sunderland.

[135] Scorei, R., Ciubar, R., Ciofrangeanu, C.M., Mitran, V., Cimpean, A. ve Iordachescu, D., (2008). "Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells", Biol Trace Elem Res, 122(3):197-205.

[136] Acerbo, A.S. ve Miller L.M., (2009). "Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging", Analyst, 134:1669-1674.

[137] A.H, A., Ma, M. ve Ma, H.F. (2010), "The inductive effect of boric acid on growth inhibition and differentiating changes of human chronic myeloid leukemia K562 cell line", Arak Medical University Journal, 13(3): 1-11.

[138] Cantürk, Z., (2007). Bor Bileşiklerinin Lösemi Hücrelerine Venormal Lenfositlere Olan Etkisinin Hücre Kültüründe Ve Transmission (Geçirimli) Elektron Mikroskobunda İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

[139] Elegbede, F., (2003). Boric Acid Inhibits Cell Growth And Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells, Doktora Tezi, Nevada Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Lasvegas.

[140] Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I.H., Fidan, A.F. ve Eryavuz, A., (2010). "The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats", J Trace Elem Med Biol, 24(3): 161–4.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Salim BULUT

Doğum Tarihi ve Yeri : 21.02.1989, İstanbul

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : salimbulut.7@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y.Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2019
Lisans	İktisat	Anadolu Üniversitesi	2016
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik (%100 Burslu)	İstanbul Kültür Üniversitesi	2013
Lise	Fen	Kağıthane Anadolu Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2017-Devam Ediyor	Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Bildiri

1. Bulut S., Ersoz M., Poyraz F.S., Mansuroglu B., (2018). "Toxicity and Antioxidant Properties of Quercetin on 8305C Cells", 7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 25-27 April 2018, Konya.