

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY ÇİMİ (*TRITICUM AESTIVUM* L) EKSTRAKTININ MCF-7 HÜCRE
SERİSİNDE APOPTOTİK VE ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

SEZEN ÇOLAKOĞULLARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İlker DİBİRDİK

EDİRNE-2016

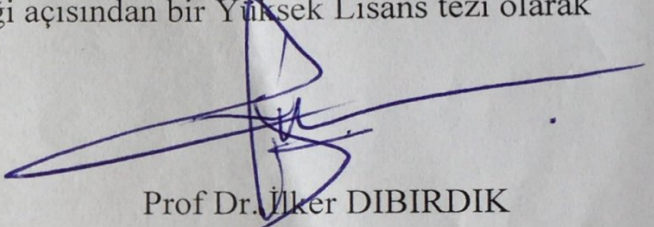
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Doc. ~~Prof. Dr. Ece ŞEN~~ Yalçın KAYA
Anabilim Dalı Başkanı ✓

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. İlker DIBIRDIK
Tez Danışmanı

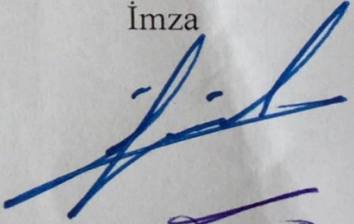
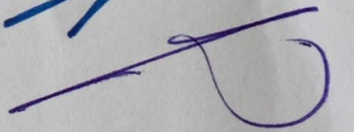
Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR

Prof. Dr. Abdullah OLGUN

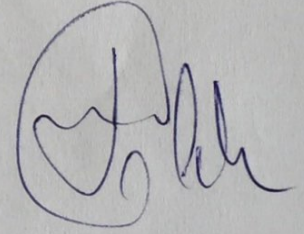
Tarih: 01/09/2016

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

01/09/2016

Sezen ÇOLAKOĞULLARI



Yüksek Lisans Tezi

Buğday Çimi (*Triticum aestivum* L) Ekstraktının MCF-7 Hücre Serisinde Apoptotik ve Antiproliferatif Etkilerinin İncelenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, buğday çim ekstresi (BÇE)'nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 insan meme kanser hücre dizisinde sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırıldı. Ekstrenin sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile değerlendirildi. Apoptotik aktivitesi Tali yöntemi kullanılarak belirlendi. Apoptotik etkinin detaylanması amacıyla MCF-7 hücre hatlarında P53, Bax, Bcl-2, Sitokrom-c, Apaf-1 ve Kaspaz-3 gen ekspresyonları RT-PCR ile incelendi.

Hem 24 hem de 48 saat uygulanan BÇE'nin konsantrasyona bağlı olarak MCF-7 hücreleri üzerinde önemli sitotoksik aktivite gösterdiği belirlendi. Apoptotik aktivite de, sitotoksik aktiviteye paralel olarak 24 ve 48nci saatlerde 20k ve 40k dilue BÇE konsantrasyonlarında önemli artış gösterdi. RT-PCR'da elde edilen sonuçlar, BÇE'nin mitokondrial apoptozisi indüklediğini destekler yöndedir. BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerindeki en önemli gen ekspresyonu değişiminin 48 saatlik periyot için Apaf-1 ve Kaspaz-3 gen ifadelerinin artışı yönünde iken, 24 saatlik periyot için ise Bcl-2 gen ifadesinin azalışı ($P<0.05$) yönünde olduğu gözlemlendi.

Bu sonuçlar, BÇE'nin anti-kanser potansiyelinin apoptoz indüksiyonu ve antiproliferatif özellikleri nedeniyle olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, moleküler düzeyde ileri çalışmalar BÇE'nin meme kanseri üzerindeki kemoterapötik etkisini detaylandırmak için gereklidir.

Yıl : 2016

Sayfa Sayısı : 49

Anahtar Kelimeler : Çimsuyu ekstraktı, MCF-7 hücre hattı, antiproliferatif etki, apoptoz, Bcl-2, P53, Bax, Apaf-1, Sitokrom-c, Kaspaz-3.

Master's Thesis

Antiproliferative and Apoptotic Effects of Wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) Extract on MCF-7 Cell Line.

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biotechnology and Genetic Department

ABSTRACT

In this study, we investigated cytotoxic and apoptotic effects of different dilutions of wheatgrass extract (BÇE) on MCF-7 cells. Cytotoxic effects of BÇE on MCF-7 cells were determined by MTT assays. Apoptotic activity was measured by Tali assays. In order to detail the apoptotic effect, P53, Bax, Bcl-2, Apaf-1, Cytochrome-c, Caspase-3 gene expressions of the MCF-7 cells were examined by RT-PCR.

24 and 48 hour BÇE treatment showed statistically significant concentration-dependent cytotoxic effect on MCF-7 cancer cells. As well as antiproliferative activity, apoptotic activity of BÇE was detected at 20k and 40k diluted concentrations by 24- and 48-hours. RT-PCR results indicated that BÇE-induced apoptosis was via mitochondrial pathway. The most important BÇE-induced gene expression variations in MCF-7 cells were observed for both Apaf-1 and Caspase-3 genes as an increment for 48-hour period; and for Bcl-2 gene as a decrement for 24-hour period ($P < 0.05$).

These results suggest that the anti-cancer potential of BÇE may be due to its apoptosis induction and anti-proliferative properties. However, further studies at molecular level are required to elucidate chemotherapeutic effect of BÇE on breast cancer.

Year : 2016

Number of Pages : 49

Keywords : Wheatgrass extract, MCF-7 cell line, antiproliferative effects, apoptosis, Bcl-2, P53, Bax, Apaf-1, Cytochrome-c, Caspase-3.

TEŐEKKÖRLER

Çalıőmamın her aőamasında bana araştırma olanağı sağlayan, yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, desteklerini benden esirgemeyen başta danıőman hocam T.Ü. Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya A.D. Prof. Dr. İlker DİBİRDİK'a, T.Ü. Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyoloji A.D. Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a, Doç. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR'a, deneyler için laboratuvar koőullarını sağlayan, analizler esnasında yardımlarını esirgemeyen TÖTAGEM ve ekibine, tezimin gerçekteőmesi için maddi desteği TÖBAP 2015/01 proje koduyla sağlayan Trakya Öniversitesi Bilimsel Araőtırmalar Projeleri birimine ve beni hiçbir zaman yalnız bıraktımayan annem Nazmiye PEKTAŐ'a, babam Vasvidin PEKTAŐ'a, oğlum Batı ÖZTAŐ'a ve eőim Dr. Mutlu ÇOLAKOĞULLARI'na en içten teőekkürlerimi sunarım.

Ecz. Sezen ÇOLAKOĞULLARI

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser.....	4
2.2. Meme Kanseri	6
2.3. Apoptoz	9
2.4. Buğday Çimi.....	14
BÖLÜM 3	16
MATERYAL VE METOT	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Buğday tohumları	16
3.1.2. Kimyasal malzemeler	16
3.2. Metot	17
3.2.1. Buğday çim ekstraktının (BÇE'nin) hazırlanması	17
3.2.2. Hücre kültürü	19
3.2.3. Hücrelerin pasajlanması.....	19
3.2.4. Hücre sayılarının hesaplanması	19

3.2.5. MTT testi ile hücre canlılığının belirlenmesi	20
3.2.6. mRNA izolasyonu.....	21
3.2.7. İzole edilen RNA'ların kontrolü	22
3.2.8. cDNA (komplementer zincir) sentezlenmesi.....	23
3.2.9. Real time PCR (RT-PCR) reaksiyonu	25
3.2.10. Tali görüntü tabanlı sitometre kullanarak apoptozisin değerlendirilmesi	27
3.2.11. İstatistiksel analizler	28
BÖLÜM 4	29
SONUÇLAR.....	29
4.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	29
4.2. Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Kullanarak Apoptozisin Değerlendirilmesi	33
4.3. Real Time PCR Reaksiyonu.....	36
5. BÖLÜM	42
TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF: Apoptoz uyarıcı faktör

Apaf-1: Apoptotik ptoteaz aktive edici faktör-1

BÇE: Buğday Çimi Ekstresi

Bcl-2: B-cell CLL/ Lymphoma 2 geni

Bax: Proapoptotik protein

Bid: Bcl-2 intercting domain

Caspase: Cysteinyl aspartate-spesific protease

CDK2: Siklin bağımlı kinaz 2

CDK4: Siklin bağımlı kinaz 4

DISC: (Death inducing signaling kompleks) Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi

DMEM: Dulbecco' nun modifiye eagle medyumu

DMSO: Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulphoxide)

DNA: Deoksiribonükleik Asit

FADD: (Fas associated death domain) Fas-Bağlı Ölüm Domeyni

GDP: Guanidin difosfat

GTP: Guanidin trifosfat

IAP: Inhibitor of apoptosis

IARC: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı

(International Agency for Research on Cancer)

IC50: Hücrelerin proliferasyonunun % 50 baskılandığı konsantrasyon

(Inhibition concentration 50)

µg / L: Mikrogram/ Litre

µmol: Mikromol

MAPK: Mitojen ile aktive olan protein kinaz

Mdm2: Murine double minute 2 gene

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür

NF-κB: Nükleer faktör-kappa beta

PBS: Fosfat tamponu

PI: Propidyum iyodid

PI3: Fosfatidil inozitol-3

PI3-K: Fosfotidil inositol 3 kinaz

P53: Tümör protein 53 geni

PS: Fosfotidilserin

rpm: Dakikadaki devir sayısı

RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

STAT: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü

TNF α : Tümör nekroz faktörü- α

Tris-HCl: Tris- Hidroklorik asit

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1. 24 ve 48 saat BÇE uygulaması sonucu izole edilen RNA miktarları.	23
Tablo 3.2. cDNA kit içeriği (1 örnek için).	24
Tablo 3.3. Power SYBR* Green PCR Master Mix kit içeriği 1 örnek için	25
Tablo 3.4. RT-PCR analizi için kullanılan genlerin primer dizileri.	26
Tablo 4.1. 24 saat BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin kontrole göre canlılık % oranları ve p değerleri.	30
Tablo 4.2. 48 saat BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin kontrole göre canlılık % oranları ve p değerleri.	32
Tablo 4.3. 24 ve 48 saat BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 meme kanseri hücrelerinden Tali deneylerinde elde edilen apoptotik, ölü ve yaşayan hücrelerin kontrol karşısında istatistiksel değerlendirilmelerinden elde edilen p değerleri.	35
Tablo 4.4. RT-PCR analiz sonucu 24 saat BÇE uygulanmış MCF-7 hücre serisinde eksprese olan gen yüzdeleri, konsantrasyonun kontrole karşı p değerleri.	39
Tablo 4.5. RT-PCR analiz sonucu 48 saat BÇE uygulanmış MCF-7 hücre serisinde eksprese olan gen yüzdeleri, konsantrasyonun kontrole karşı p değerleri.	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Globocan verilerine göre her iki cinsiyet dahil olmak üzere 2012 yılı için A) dünyadaki en yaygın görülen kanserler; B) dünyada kanserden en sık ölüm nedenleri.	5
Şekil 2.2. Tüm Yaş Gruplarındaki Kadınlarda En Sık Görülen Bazı Kanserlerin Bu Grup İçindeki Yüzde Dağılımları.	6
Şekil 2.3. Meme dokusunun şematik görünümü.	7
Şekil 2.4. Kanserli meme dokusu.	8
Şekil 2.5. Apoptoz olayının dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik) yolları.	10
Şekil 2.6. P53 indüksiyonu.	11
Şekil 2.7. Mitokondrial apoptozda görevli Bcl-2 gen ailesi üyeleri.	12
Şekil 3.1. Buğday çiminin yetiştirilmesi.	17
Şekil 3.2. Buğday çimlerinin homojenize edildiği bilyalı doku parçalayıcısı.	18
Şekil 3.3. Ekstre eldesinde kullanılan çalkalamalı, soğutuculu miks blok.	18
Şekil 3.4. Farklı dozda BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerine MTT solüsyonu uygulanmış flasklar.	21
Şekil 3.5. MTT testinde kullanılan mikropilaka okuyucu cihazı.	21
Şekil 3.6. RNA miktarlarının belirlenmesinde kullanılan nano spektrometre (NanoQ OPTIZEN).	23
Şekil 3.7. Elde edilen RNA'ların cDNA'lara çevrilmesinde kullanılan PCR cihazı.	24
Şekil 3.8. Gen ekspresyonlarının belirlenmesinde kullanılan Real Time PCR cihazı.	26
Şekil 3.9. Tali image sitometre cihazı (Applied Biosystems).	28
Şekil 4.1. 24 saat BÇE uygulanmış MCF-7 hücreleri ile yapılan MTT deneyinde BÇE-dilüsyonuna bağlı olarak elde edilen absorbans değerleri (*: P<0.001).	30
Şekil 4.2. 48 saat BÇE uygulanmış MCF-7 hücreleri ile yapılan MTT deneyinde BÇE-dilüsyonuna bağlı olarak elde edilen absorbans değerleri (*: P<0.001).	31
Şekil 4.3. BÇE ile 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda elde edilen nonlinear regresyon eğrileri ve IC50 değerleri.	33

Şekil 4.4. 24 saat BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde Tali testleri ile tespit edilen yaşayan, ölü ve apoptik hücrelerin dağılımı.	34
Şekil 4.5. 48 saat BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde Tali testleri ile tespit edilen yaşayan, ölü ve apoptik hücrelerin dağılımı.	35
Şekil 4.6. 24 saat 40k ve 20k dilüe BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücre serisinde RT-PCR analizi ile (A) P53, (B) Bcl-2, (C) Bax, (D) Sitokrom-c, (E) Apaf-1 ve (F) Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri.	38
Şekil 4.7. 48 saat 40k ve 20k dilüe BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücre serisinde RT-PCR analizi ile (A) P53, (B) Bcl-2, (C) Bax, (D) Sitokrom-c, (E) Apaf-1 ve (F) Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri.	40

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Ülkemizde ve dünyada yüksek oranlarda görülmesi ve yaşamı tehdit etmesi nedeniyle kanser hastalığı sağlık sorunu olmaktan çıkmış hem ekonomik hem de sosyal açıdan toplum sorunu olmuştur. Kanserli hastalarda çözüm bulmak bir yana hastalığın seyrini değiştirerek yaşam kalitesini arttırmak bile çok önemli hale gelmiştir. Bu nedenle farklı tipteki kanserler, farklı yapı, büyüme hızı ve yayılma biçimi göstermelerinden dolayı farklı tedavi yöntemleri, ilaçları ve/veya kombinasyonları kullanılarak tedavi edilmektedirler.

Meme kanseri özellikle metastaz karakteristiği ve yüksek mortalite oranı ile kadınlarda en önemli hastalıklardan biridir. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun hazırlamış olduğu istatistiksel verilere göre meme kanseri, Türkiye'de kanser türleri arasında görülme ve kanserden ölüme neden olma sıklığı açısından kadınlarda ilk sırayı almaktadır. Son yıllarda, bilimsel gelişmeler doğrultusunda üzerinde yüzlerce çalışma bulunmasına rağmen, hala tedavi edilmesi zor ve ölüm riski yüksek olan kanser grupları arasındadır. Sanayileşme, hızlı nüfus artışı, bunun sonucu oluşan antropojenik kirlilik, birim alandan daha fazla tarımsal ürün alınabilmesi için yoğun gübre ve pestisit kullanımı, ürünlerin raf sürelerini artırmak için her geçen gün artan miktarda ve ürüne göre değişen kimyasallar kullanılması sebebiyle insanlara ulaşan kanserojen maddelerdeki ve doğal olmayan kimyasal kontaminasyondaki artışın da bir sonucu olarak diğer kanser türleri gibi meme kanserinde de önemli bir artış saptanmıştır [1-3]. Kanser hücreleri kontrolsüz proliferatif özellikleri ile tanımlanırlar. Tedavi amaçlı kullanılan birçok ilacın toksik yan etkileri ve klinik olarak yetersiz kalmaları sebebiyle, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını inhibe eden yeni anti-kanser ajanların ortaya çıkarılması önem kazanmıştır.

Sağlık araştırmalarında büyük öneme sahip olan kanser hastalığının daha iyi tanınması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için moleküler düzeyde incelenmesi gerekmektedir. Bu nedenle kanser hastalığını tedavi etmek için yapılan birçok moleküler çalışma, hastalığa hangi yollardaki aksaklıkların neden olduğu ve bu aksaklıkların nasıl giderebileceği konusunda yoğunlaşmıştır. Multisellüler organizmalarda, yaşamın devamı için yeni birçok hücre oluşurken homeostazı sağlamak adına da apoptoz adı verilen biyokimyasal bir yolla birçok hücre programlı bir biçimde öldürölür. Apoptoz vücutta ihtiyaç duyulmayan ve anormalleşmiş hücrelerden organizmanın kurtuluş yoludur. Apoptoz sağlıklı dokularda işleyişini devam ettirirken, kanserli hücre birçok sebepten dolayı apoptozun başlamasını sağlayan sinyalleri alamaz ve kontrolsüz çoğalır. Bu nedenle son zamanlarda en çok incelenen yollardan biri apoptoz oluşumunu sağlayan yollardır.

Buğday (*Triticum aestivum L.*), insan beslenmesinin önemli bir bileşenidir. Tam tahıl ürünlerinin birçok kronik hastalıklara ve kansere karşı koruyucu olduğu ve bunun yanı sıra serbest radikal süpürücü özelliğinden dolayı da antioksidan kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Çimlenme esnasında, buğday filizinde, yeni oluşan hücreleri dış ortam kaynaklı biyotik ve abiyotik streslerden korumak amaçlı çok sayıda primer ve sekonder metabolit ve mineraller sentezlenir [4]. Ayrıca artan konsantrasyonlarda klorofil, flavonoid, birçok vitamin, antioksidan enzimler ve stres süpürücü hormonlar içerir [5]. Buğday çiminde dikkat çekici nokta, tedavi gören kanserli hastalara buğday çimi kemoterapi ilaçları ile eş zamanlı verildiğinde kemoterapi ile oluşan yan etkilerin azaldığının gözlenmesidir [6].

Son yıllarda yapılan araştırmalar alternatif tıp olarak tanımlanan, bitkiler ve doğal ürünlerden elde edilen etken maddeler ile tedavi etme üzerinde yoğunlaşmıştır. Bilimsel araştırmalar meyve ve sebze açasından zengin bir diyetin uygulanması ile dünya çapında tüm kanserlerin %7-31 [7-9] oranında azalabileceğini göstermiştir. Birçok bitkisel kaynaklı biyoaktif moleküllerin, oksidatif stresi önlemede [10,11], karsinogenezde rol alan enzimleri inhibe etmede [12], diyabet, alzheimer, ateroskleroz gibi hastalıkları önlemede [13,14], kanserli hücrelerde apoptozu indüklemeye ve proliferasyonu engellemede [15,16] ve ayrıca kullanılan ilaçların yan etkilerini azaltmada [6] olumlu etkileri vardır. Yapılan birçok çalışmada, elde edilen olumlu veriler alternatif tedavilere pozitif yaklaşımların oluşmasını sağlamada etkili olmuştur.

Meme kanserinin hala toplumsal bir tehdit oluşturmasından, tedavisinde kullanılan ilaçların toksik etkilerinin olması ve bağışıklık sistemini baskılamasından, bunun yanı sıra bitkisel kaynaklı tedavilerin olumlu sonuçlar vermesinden dolayı, bu çalışmada buğday çim ekstresinin (BE) meme kanseri üzerine direk etkisini bir *in vitro* insan meme kanser modeli olan MCF-7 hücre dizisi üzerinde hem proliferatif ve hem de apoptotik fonksiyonlarda irdelemeyi amaçladık.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

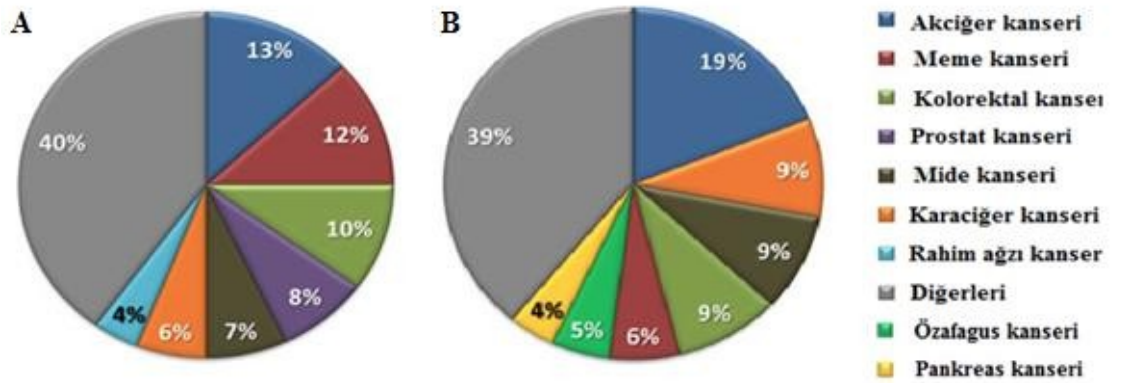
Kanser, hücrelerin mutasyonlar sonucunda farklılaşması, kontrolsüz bir biçimde büyümesi ve aşırı yayılması ile tanımlanan yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. Sağlıklı bir hücre ne zaman ve nerede bölüneceğini bilme ve bunu programlama yeteneğine sahiptir. Fakat bu yetenekleri sınırlıdır ve sonsuz bölünemezler. Sınırlı bölünebilme yeteneğine sahip olan sağlıklı hücrelerin DNA onarımı, hücre sinyal iletimi, hücre döngüsü ve programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozda görev alan genlerde meydana gelen bir dizi mutasyon sonucu farklı fenotipik özellik kazanarak kontrolsüz bölünüp çoğalırlar ve tümör adı verilen kitle oluşumuna yol açarlar [17]. Bu hücrelerin en karakteristik özellikleri, bağımsız olarak yaşayabilme yetenekleri, kontrolsüz çoğalabilmeleri ve kan/lenf dolaşımı aracılığıyla diğer sağlıklı doku/organlara taşınıp metastaz yaparak da sağlıklı dokuların işlevlerini etkisiz hale getirebilmeleridir. Kanseri tehlikeli kılan tüm bu olayların bir araya gelmesidir.

Tümörler tek bir küme halinde durdukları sürece *iyi huylu (benign)* tümör olarak adlandırılırlar. Komşu organ/dokulara yayılan hatta lenf ve kan yoluyla taşınan, sınırları belirsiz tümörler *kötü huylu (malign)* tümörlerdir. Kanseri hücrelerin yapılarında birçok değişiklik oluşur. Bunun yanında hücrede düzenli yapılan görevlerde de değişimler görülür. Kanseri hücreler, sağlıklı normal bir hücre iken yaptıkları görevleri yapamaz ya da bazı yeni görevler edinirler. Çoğalıp yayılarak diğer organlara taşınan bu hücreler, fizyolojik dokunma ile çoğalma yeteneğinin baskılanma mekanizmasını kaybederler, hücrelerden gelen sinyallere yanıt vermeyip apoptozda da girmezler [18]. Vücutta mutasyona uğrayan hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları tek başına kanserleşmeye yeterli değildir. Bu çoğalmayı dengeleyen apoptoz yolağında meydana gelen değişiklikler

kanserleşmede başlıca rolü üstlenirler.

Gelişen tümör oluşumları konumlandıkları veya köken aldıkları dokuya göre sınıflandırılırlar. Meme, deri, ürogenital dokular gibi epitel hücrelerden köken alan tümör oluşumlar **karsinom**, kemik, kıkırdak ve kas gibi mezoderm hücrelerden köken alanlar **sarkom**, salgı dokularından köken alanlar ise **adenokarsinom** olarak isimlendirilmektedirler. Lökosit ve lenfositlerin kontrolsüz çoğalması sonucunda ise lösemi ve lenfoma oluşmaktadır [19].

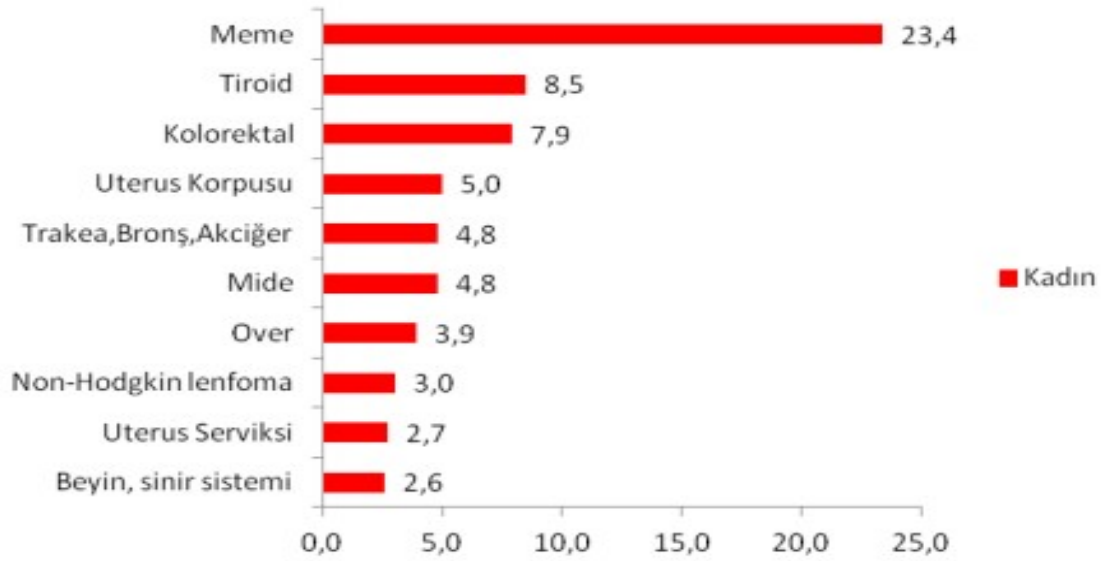
Her yıl yapılan istatistiklerle birlikte yeni öngörümle dünyada yeni tanı alan kanserli hasta sayısı ve kanserden kaynaklanan ölümler bir önceki öngörümlere göre artmıştır. Globocan 2012 verilerine göre 2012 yılında dünyada toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünya’da en çok tanı konulan kanserler akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) iken kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mideden (%8,8) gerçekleştiği belirtilmiştir (Şekil 2.1.A, Şekil 1.2.B) [20].



Şekil 2.1. Globocan verilerine göre her iki cinsiyet dahil olmak üzere 2012 yılı için A) dünyadaki en yaygın görülen kanserler; B) dünyada kanserden en sık ölüm nedenleri.

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri özellikle kadınlarda metastaz karakteristiği ve önemli mortalite oranı ile en önemli hastalıklardan biridir. Meme kanseri için bir ilaç ya da kimyasal önleyici keşfetmek için günümüzde çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Ancak, bütün bu çabalara rağmen, hala insanlığı tehdit eden en önemli kanser türünden biridir. Türkiye’de Halk Sağlığı Kanser Daire Başkanlığının veri tabanından yola çıkarak yapılan istatistik analizlerde meme kanserinin kadınlar için 1. sırada bir tehdit unsuru olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.2) [21].

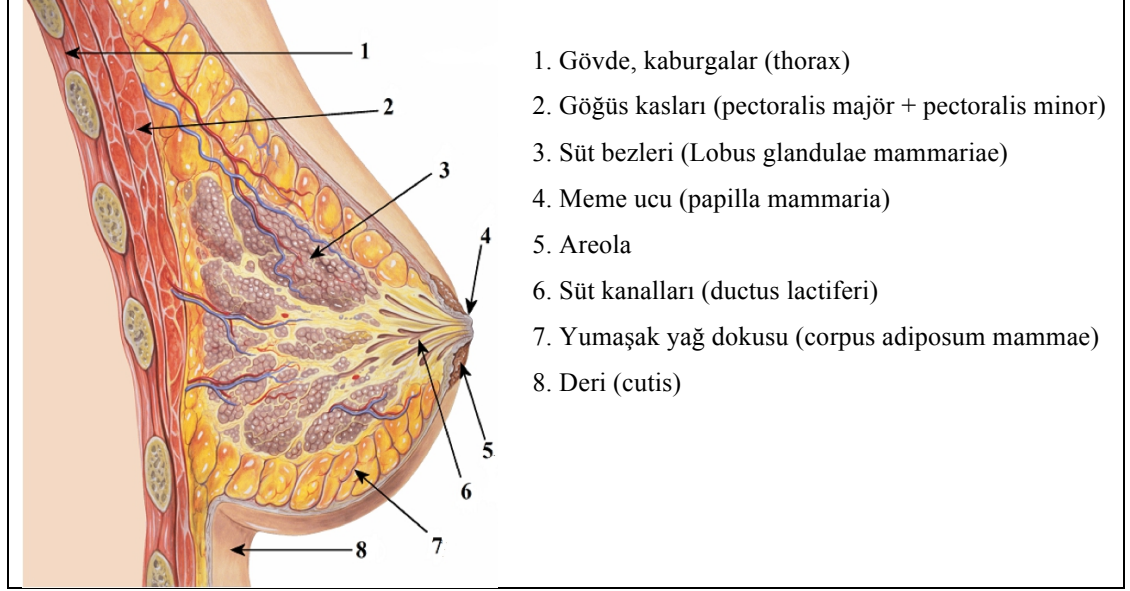


Şekil 2.2. Tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları.

Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı IARC (International Agency for Research on Cancer; Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı) kadınlarda görülen meme kanserindeki artışa dikkat çekmiş ve meme kanser insidans ve ölümlerin bir önceki tahminlere göre arttığını belirtmiştir. Meme kanserinin kadın kanserleri içinde en fazla görülen ve en fazla ölüme neden olan kanser olduğunu ifade etmiştir [22].

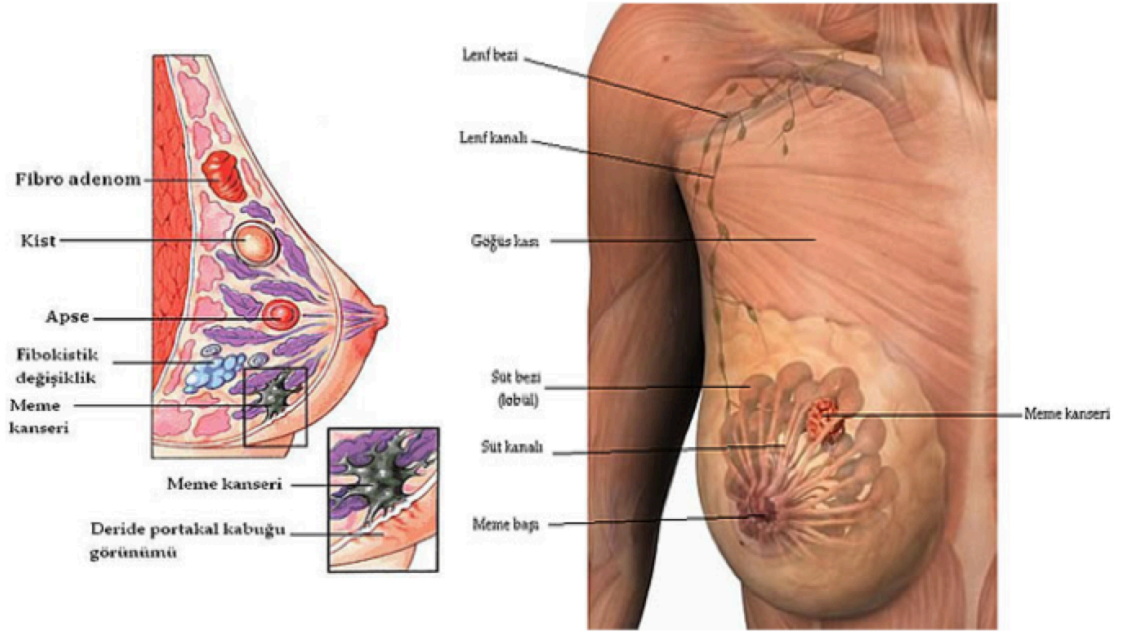
Kadınlarda meme dokusu, lobüller (sütün salgılandığı süt bezleri), duktuslar (sütü meme ucuna ulaştıran süt kanalları), meme dokusunun içinde yer almayan ama hemen altında kaburgaları saran göğüs kasları, destek dokuları, yumuşak yağ dokusu, sinirler,

kan ve lenf damarlarından oluşur. Meme dokusu her ne kadar yirmili yaşlarda gelişimin doruğunda olsa da özellikle gebelik döneminde östrojen ve progesteron hormonlarında görülen artışlarla birlikte tam anlamıyla olgunlaşır (Şekil 2.3) [23].



Şekil 2.3. Meme dokusunun şematik görünümü.

Meme kanserinin sıklıkla süt bezlerinde, süt kanallarında ve lobüllerdeki hücrelerde geliştiği belirlenmiştir [24], (Şekil 2.4). Meme kanseri süt bezlerinde ve süt kanallarında oluştuğunda yerinde kalıp çevrede bulunan yağ dokularına veya lenf bezlerine sıçramıyorsa meme kanseri evre "0" ya da in situ diye adlandırılır. Süt kanallarında oluşmuş ise **duktal karsinoma in situ (DCIS)** olarak, süt bezlerinde oluşmuşsa **lobular karsinoma in situ (LCIS)** olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 2.4. Kanserli meme dokusu.

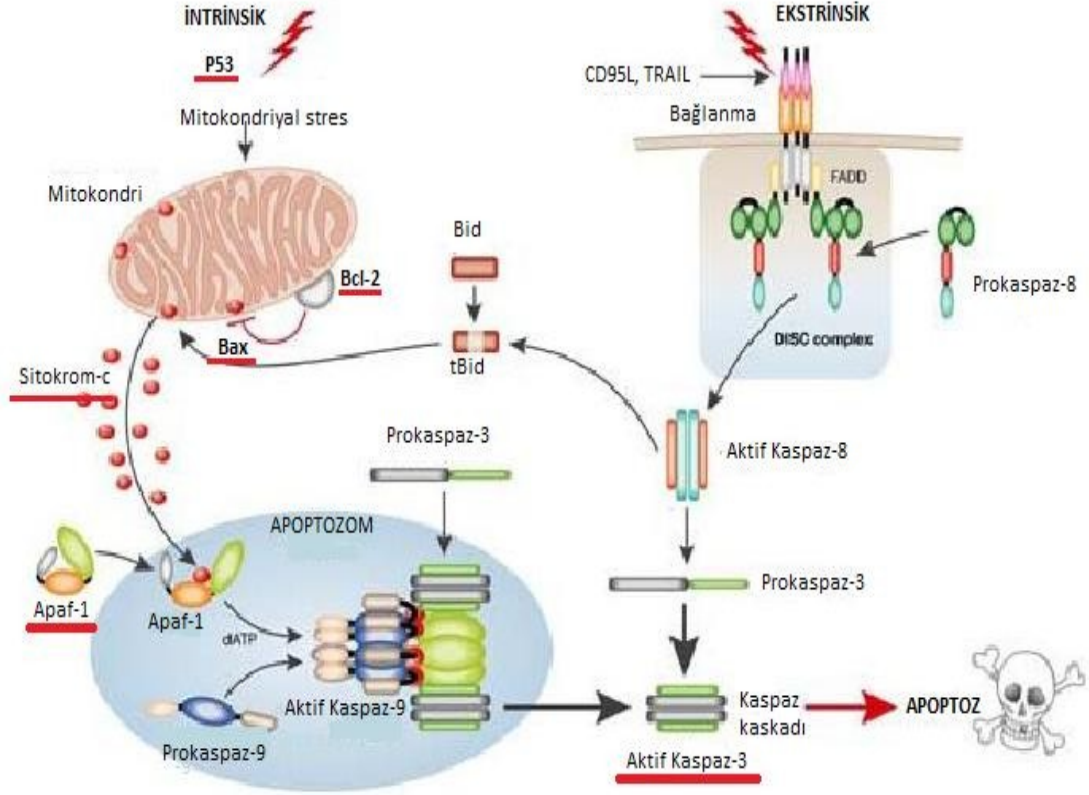
Yayılabilme özelliği gösteren kanserli hücrelerin 2 cm'den daha küçük tümörler oluşturup lenf bezlerine sıçramadığı durum **evre 1A** ve lenf bezlerinde 1-3 adet micrometastazlar (0,2-2mm genişliğinde) görüldüğü **evre 1B** olarak adlandırılır. Yayılabilme özelliği gösteren kanserli hücrelerin 2 cm den daha büyük tümörler oluşturup lenf bezlerine yayılması veya memede tümör olmayıp sadece lenf bezlerinde olması durumu **evre 2** olarak ifade edilir. Yayılabilme özelliği gösteren kanserli hücrelerin 5 cm'den daha büyük tümörler oluşturup lenf bezlerine yayılması veya memede tümör olmayıp sadece lenf bezlerinde olması durumu **evre 3** olarak ifade edilir. Birinci ile üçüncü evreler arasında tümörün lokalizasyonu meme ve yakın lenf dokularıdır. İlk üç evrede metastaz görülmezken tümörün boyutu, lenf dokularına sıçrayıp sıçramaması gibi kriterlere bakılmaksızın kanserli hücrenin uzak bölgelere metastaz yaptığı durum **evre 4** olarak adlandırılır.

Meme kanseri yaşa bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Özellikle otuzlu yaşlardan sonra görülme oranının hızla arttığı, menopoza girilmesiyle birlikte değişen hormon seviyelerinin etkisiyle bu oranın daha hızlı bir şekilde artmaya devam ettiği görülmüştür [25]. İlk doğumun otuzlu yaşlardan sonra olması, ailede meme kanser vakası görülmesi, oral kontraseptif kullanımı, menopozun geç olması, alkol ve sigara tüketimi, obezite gibi etmenler risk faktörleri sayılmaktadır.

Ayrıca BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar ile meme kanseri arasında anlamlı bir ilişkili bulunmuştur. BRCA1 ve BRCA2 genlerinin hücre çoğalması sırasında görev alan proteinlerin (özellikle kontrol mekanizmasındaki tümör baskılayıcı proteinler ve DNA hasar ve tamirinde görev alan proteinler) transkripsiyonundan sorumlu oldukları tespit edilmiştir [26]. Hormon seviyelerindeki değişiklikler özellikle de östrojen meme kanseri riskini arttırmaktadır. Kanserli hastalarda sağlıklı kişilere göre östrojen reseptörünün (ER) daha fazla ifade edildiği görülmüştür. ER' nün, hücre siklusunda G1 fazını kısaltarak hücre çoğalmasını arttırdığı bilinmektedir [27].

2.3. Apoptoz

Canlıların yaşam süreçleri boyunca karşılaştıkları sayısız kimyasal ve biyolojik olay vardır. Bu süreçte herhangi bir sebepten dolayı genetik olarak stabilitesi bozulan veya istenmeyen bir hücrede gerçekleşen programlı hücre ölüm şekline daha öncede belirtildiği üzere *apoptoz* denir. Apoptoz, hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelir. Komşu hücrelere zarar vermeden ve iz bırakmadan hedef olan hücre ortadan kaldırılır. Yunanca “ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal” anlamına gelen apoptozis terimi ilk defa 1972 yılında Kerr ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Apoptoz, DNA hasarı oluşan ve dolayısı ile kanserleşme potansiyeli olan hücreleri yok eden vücuttaki tümör baskılama mekanizmalarından biridir [28]. Canlılarda her gün yaşamın devamlılığının sağlanması için birçok hücre ölmektedir. Ancak hücre bölünmesiyle hücre ölümü dengede olduğundan bu durum sorun yaratmamaktadır. Apoptoziste ölüm sinyallerinin alınmasını takiben sitoplazmanın yoğunluğu artar, nükleus küçülür ve parçalanır, oluşan parçalar fagositik hücreler tarafından fagosite edilir, bu nedenle de inflamasyon görülmez. Programlı bir ölüm şekli olmuş olması onu diğer bir hücre ölümü olan nekrozdan ayıran önemli bir unsurdur. Apoptozun aksine nekroz sadece patolojik koşullarda ortaya çıkar. Hücreler su alarak şişer, membran bütünlüğü kaybolur, DNA'da düzensiz parçalanmalar gözlenir, hücre içeriği etraftaki dokulara dağılır ve bu durum yoğun bir inflamasyon ile sonuçlanır. Apoptoz, ölüm sinyallerinin alınması ile başlar ve en son olarak fagositoz ile hücrenin ortadan kaldırılması ile sonuçlanır. İlk başlangıç safhası *dışsal (ekstrinsik)* ve *içsel (intrinsik)* yolak olmak üzere iki kısımdan oluşur [29].

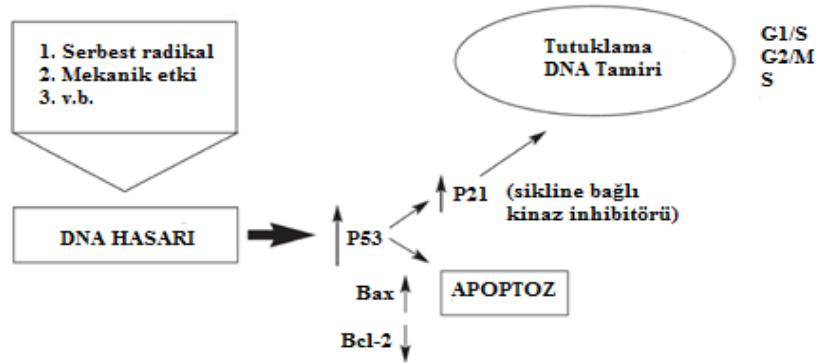


Şekil 2.5. Apoptoz olayının dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik) yolları.

Dışsal yolak dıştan gelen ölüm sinyallerinin spesifik yüzey reseptörlerine bağlanmasıyla gerçekleşirken içsel yolak DNA hasarı gibi içsel bir dizi sinyal tarafından gerçekleşir. Genel olarak her iki yolak da Kaspaz-3 aktivasyonunda birleşir (Şekil 2.5). Dışsal yolda ölüm reseptörleri tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin bir üyesi olup en çok bilinenler Fas, APO-1, CD95 ve TNF reseptörü-1 (TNFR-1), TNF-bağlantılı apoptozis indükleyici ligand reseptör 1 (TRAIL-R1), TNF-bağlantılı apoptozis indükleyici ligand reseptör 2 (TRAIL-R2) ve ölüm reseptörü 3 (DR3)'dür. Bu reseptörler hücre yüzeyine gelen ölüm sinyallerini hücre içine iletirler. Bu reseptörlere ligantlar bağlandığında hücre içinde ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu bağlanma ile birlikte pro-kaspaz 8 aktifleşir. Aktif Kaspaz-8, ya direkt Kaspaz-3 aktivasyonunu sağlayarak apoptozu sağlar ya da Bid genin aktivasyonu ile Sitokrom-c'nin salınımını gerçekleştirerek mitokondriyal yolağın aktivasyonuna neden olur (Şekil 2.5).

İçsel apoptoz yolağında en önemli organel mitokondridir. "Mitokondriyel yolak" da denilen içsel yolakta tümör baskılayıcı/supresör P53, antiapoptik ve proapoptik genleri barındıran Bcl-2 ailesi, Apaf-1, Kaspazlar, Sitokrom-c gibi genlerin apoptozu oluşturma ya da apoptozun engellenmesinde rolleri vardır.

P53 geni tümör baskılayıcı bir gendir. 17nci kromozomun kısa koluna lokalizedir (17p13.1). 10 intronu, 11 ekzonu bulunur. 5 ve 8 nci ekzonlara karşılık gelen proteinler ile DNA'ya bağlanır. Normalde P53 geni Mdm2 (Murine double minute 2) gene bağlı olarak inaktif halde bulunur. DNA hasarı ile birlikte Mdm2 proteini, yapısında meydana gelen değişikliklerle birlikte P53 genini bağlayamaz hale gelir. Böylece aktif hale gelen P53 geni P21 geninin ekspresyonunu sağlayarak hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve DNA tamiri için hücreye zaman tanır. Böylece genomda mutasyon olmasını önleyerek genom stabilitesini korur. Tamir edilemeyecek düzeyde olan hasarlarda ise Bax geni başta olmak üzere bir dizi genin uyarılmasını sağlayarak hücreyi apoptoza yönlendirir (Şekil 2.6).

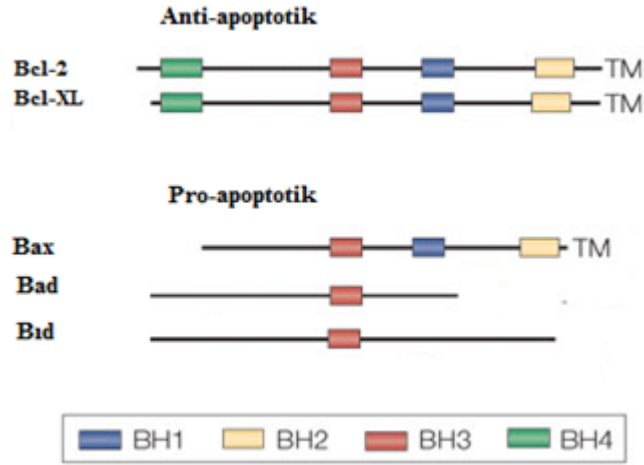


Şekil 2.6. P53 indüksiyonu.

Meme kanseri gibi birçok tümörlerde P53 geninin her iki allelinde kayıplar görülmüş ya da mutasyona uğradığı tespit edilmiştir. Hücre canlılığının korunmasında ve hücre siklusunun kontrolünde etkili bir gen olan P53'teki herhangi bir mutasyon sonucu işlevselliğinde oluşabilecek değişiklikler birçok bozukluğa neden olup tümörlerin oluşumuna katkı sağlar. Ayrıca kanserli hastalarda nokta mutasyonlarının en çok bu gende olduğu gözlemlenmiştir.

Bcl-2 gen ailesi apoptozu düzenleyen en önemli protein grubudur. Anti-apoptik

ve pro-apoptotik olan zıt etkili iki gruptan oluşmaktadır. Anti-apoptotik grup (Bcl-2, Bcl-XL) gibi hücrenin apoptoza gitmesine engel olurken, pro-apoptotik grup (Bax, Bad, Bid) gibi hücre hasar algılayıcısı gibi görev yaparak apoptozu başlatma etkisine sahiptirler ve sıklıkla sitozolde bulunurlar. Hücrelerin apoptoza duyarlılığı bu iki zıt grubun arasındaki dengeye bağlıdır. Bcl-2 ailesinin tüm fertleri homolog alanların en az birisini içerir. Bu alanlar BH1, BH2, BH3 ve BH4 alanı olarak ifade edilir. Anti-apoptotik olan Bcl-2 ve Bcl-XL ise BH1'den BH4'e kadar 4 homolog alanı da içerirken pro-apoptotik olan Bax ve Bid ilk BH4'ün yokluğu ile ayırt edilir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Mitokondriyal apoptozda görevli Bcl-2 gen ailesi üyeleri.

Bcl-2 aile üyelerinin önemli bir özelliği, bu proteinler arasında nötralizasyon yarışına neden olan heterodimerler ve homodimerler oluşturma yeteneklerinin oluşudur. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki heterodimerizasyon, birbirlerinin biyolojik etkilerini yok ederler. Bcl-2 ailesi apoptozu, mitokondride iyon kanalları oluşturarak ve Sitocrom-c'nin mitokondriyal membrandan geçişini kontrol ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir [30].

Bcl-2 normalde aktif formda mitokondri membranının dışında bulunur ve mitokondriyal membranda porların geçirgenliğini inhibe ederek Sitokrom-c'nin mitokondri dışına çıkışını engeller. Hücreye ölüm sinyalleri gelmesi üzerine Bcl-2'nin translasyonu, tümör süpresör miRNA'lar (miR-15-a, miR-16-1) tarafından engellenir ve

Sitokrom-c'nin mitokondri dışına çıkışı gerçekleşir, hücre apoptoza gider. Sitoplazmik bir protein olan Apaf-1 (Apoptik proteaz aktive edici faktör-1)'e Sitokrom-c ve dATP (deoksiadenozintrifosfat) bağlanması ile oligomerik apoptozom formunu oluşturur. Bu apoptozomda Prokaspaz-9 proteinine bağlanır ve onu parçalayarak aktif formunun oluşmasını sağlar. Bcl-XL Sitokrom-c'nin mitokondri dışına çıkışını engellemesinin yanı sıra Apaf-1'i bağlayarak kaspazların öncü formları olan Prokaspaz-9'un aktif Kaspaz-9'a dönüşmesini önleyerek apoptozu engeller ya da kaspaz akışını direkt aktive eden sitoplazmadaki Apoptoz Uyarıcı Faktör (AIF) gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden salınımını engelleyerek etkisini gerçekleştirir [31].

Bax (Bcl-2-associated X protein), P53 adlı tümör baskılayıcı proteinin kofaktörü olma işlevine sahip 20 kDa molekül ağırlığında ve BH4 alanını içermeyen pro-apoptotik bir proteindir. Normal koşullarda sitozolde monomerik formda bulunur. DNA hasarı ile aktif olan P53 aracılığıyla indüklenir ve Bcl-2 proteini ile heterodimer formu oluşturarak onu inaktive eder. Bcl-2'nin fonksiyonu engellendiğinde mitokondriyal porların açıklığı değişir Sitokrom-c nin salınımı gerçekleşir, kaspaz serbestleşmesi uyarılır ve hücrenin apoptoza gitmesi sağlanır [32].

Bid internal ve eksternal yolları birbirine bağlayan proapoptotik proteindir. Eksternal yoldan gelen ölüm sinyalleriyle aktif hale gelen Kaspaz-8 Bid' i keser. Kesilmiş Bid fragmenti, Bax ve Bak gibi diğer proapoptotik proteinleri uyararak kaspazların ve apoptoz aktivasyonu için gerekli olan mitokondriyal faktörlerin salınımını destekler [33]. Kaspazlar sistein proteinazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. İnaktif formda sitoplazmada bulunurlar. Apoptotik yolağın aktivasyonu ile birlikte inaktif iki prokaspazın hidrolizi ile aktive olur ve kaspaz kaskadını oluşturarak etki gösterirler. Günümüze kadar tanımlanmış 14 formu vardır ve hepsi yapıları bakımından benzerlik gösterirler. Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz-2, Kaspaz-8, Kaspaz-9, Kaspaz-10), efektör kaspazlar (Kaspaz-3, Kaspaz-6, Kaspaz-7) ve enflamatuvar kaspazlar (Kaspaz-1, Kaspaz- 4, Kaspaz-5) diye üç kategoride incelenirler [34]. Apoptozom kompleksine Prokaspaz- 9'un yıkımı ile oluşturulan aktif Kaspaz-9, apoptozla sonuçlanan Kaspaz 3, 6 ve 7 kaskadını harekete geçirir. Aktif Kaspaz-3 hücrenin membran ve iskelet yapısını bozarak ve apoptotik cisimlere parçalanmasını sağlayarak apoptotik hücre ölümünü gerçekleştirir.

2.4. Buğday Çimi

Günümüzde tahıllar insan beslenmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Tahıllar içerisinde buğdayın yeri büyüktür. Buğday (*Triticum aestivum* L.) gerek doğrudan, gerekse işlenmiş olarak tüketilen insan besininin en önemli bileşenlerinden biridir. Bunun sebebi buğdayın geniş bir adaptasyona sahip olması, kolay ekilip üretilmesidir. Tahılın tarihçesine baktığımızda çok eskilere dayandığını görürüz. Süreç buğdayın öğütülmesiyle başlamış, daha yararlı gıdalar elde etmek için işlenmesiyle devam etmiş ve içerdiği etken maddeler nedeniyle sağlık sektöründe de kullanılmasıyla günümüze ulaşmıştır.

Buğday çimeni, Graminae (veya Poaceae) ailesinden olup, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, insan diyetinin önemli bir bileşenidir. Epidemiyolojik çalışmalar tüm tahıl ürünlerinin tüketimi, kardiyovasküler hastalık, diyabet ve kanser gibi kronik hastalıklara karşı koruyucu olduğunu göstermiştir [35-39]. Çimlenme sırasında, özellikle 6-10 günlük buğday filizinde, yeni oluşan hücreleri dış ortam kaynaklı biyotik ve abiyotik streslerden korumak amaçlı çok sayıda primer ve sekonder metabolit ile mineraller sentezlenir ve maksimum antioksidan potansiyele ulaşır [4]. Buğday çimi büyüme döneminde kalsiyum, iyot, bor, molibden, potasyum, magnezyum, selenyum, çinko, krom, demir, sodyum gibi mineralleri; A, C, E, folik asit ve B kompleks gibi vitaminleri; farmakolojik etkilerden sorumlu SOD (süper oksit dismutaz)'ı; arginin, proteaz, glutamik asit gibi amino asitleri; apigenin, quercetin ve luteolin gibi bioflavonoidleri; absisik asit, ferulik asit ve vanilic asit gibi flavonoidleri; ve terapötik açıdan etkili olduğu bilinen kolin, letrile (amigdalin) gibi bileşikler artan konsantrasyonlarda ihtiva eder [5].

Buğday çim ekstresinin (BÇE) anti-kanser [40], anti-ülser [41], antioksidan [4], anti-artrit [42] ve talasemide major kan yapıcı [43] aktiviteye sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. BÇE'nin en dikkat çekici özelliği karsinojenlerin aktivasyonunu inhibe ettiği bilinen klorofili yüksek bir oranda içermesidir [44, 45, 40, 46]. Klorofilin, insan kanında oksijeni (O₂) taşıyan kırmızı kan hücreleri olan hemoglobinle benzer atomik yapıya sahip olması en önemli özelliklerinden birisidir. BÇE'si yüksek oranda içerdiği klorofil, Mg ve Fe sayesinde kana eşdeğer bulunduğu ve hemoglobin eksikliği söz konusu olan durumlarda (talasemi ve hemolitik anemi gibi vakalarda) hemoglobin yerine kullanılabilirliği tespit edilmiştir. Bu özelliği ile BÇE "yeşil kan" olarak ifade

edilmiştir [43, 44, 47].

Reaktif oksijen türleri (ROS) canlı organizmalarda çeşitli metabolik süreçlerin bir yan ürünü olarak üretilir. ROS'nin normal fizyolojik konsantrasyonları genellikle hücre faaliyetlerinin düzenlenmesinde rol alırken yüksek konsantrasyonları ise moleküler düzeyde oksidatif hasara yol açar. ROS'nin kanser oluşumuna zemin hazırladığı bilinmektedir. BÇE önemli miktarda fenolik bileşikler içerir [48]. Temel olarak antioksidan aktiviteden sorumlu olan bu fenolik bileşikler, çeşitli yollarla ROS'nin etkisini tersine çevirmek ve dolayısı ile kanser oranını azaltmak için güçlü bir etkiye sahiptir [49].

BÇE'nin, ROS'ni hidrojen peroksit ve bir oksijen molekülüne dönüştürme potansiyeline sahip olan süperoksit dismutaz (SOD) ve sitokrom oksidaz gibi antioksidan enzimler içerdiği bilinmektedir. Falcioni ve ark. yaptıkları in vitro çalışmada buğday çiminin oksidatif DNA hasarını engellediğini göstermişlerdir [50].

Shyam R. ve arkadaşlarının 18 - 21 yaşları arasındaki 30 kişi üzerinde yaptıkları randomize çalışmada, 30 gün buğday çim tozu verilen şahıslardan alınan kan örneklerinin plazmalarında yapılan analiz sonuçları, BÇE'nin SOD enzim aktivitesini ve plazma antioksidan seviyesini arttırdığı, bunun yanı sıra hücreli lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan MDA konsantrasyonunu azaltarak lipid peroksidasyonuna karşı da iyi bir koruma sağladığını ve oksidatif stresi azalttığını göstermiştir [51]. Kronik myeloid lösemi K562 hücre serisinde BÇE uygulamasına alınan yanıtların takip edildiği bir çalışmanın sonuçları da hücre serilerinin antioksidan enzimler olan SOD ve CAT aktivitelerinde artış olduğunu ve bu artışın kısmen oksidatif reaksiyonları engellediğini göstermiştir [52].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Buğday tohumları

Çalışmada Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından melezleme yolu ile geliştirilen ve 2009 yılında tescil edilen kırmızı renkli Aldane buğday tohumu kullanıldı. Tanesi kırmızı renkli, sert-yarı sert yapıda olup, oldukça iri ve ovaldir. Bin tane ağırlığı 42.5 g, hektolitre ağırlığı 80.1 kg, protein oranı %14.7, gluten %40.4, gluten indeksi %91.5, tane sertliği 55 ve sedimantasyon 54 ml'dir [53].

3.1.2. Kimyasal malzemeler

Buğday çimlerinin yetiştirilmesinde kullanılan Hoagland Solüsyonu kimyasalları %99.8 saflıkta Sigma Aldrich, ABD firmasından sağlandı. Ekstraksiyonda kullanılan metanol, isopropil alkol, etanol ve ultra saf su tamamı ultrapure formülasyonlarında Merk, ABD Firmasından sağlandı.

Hücre kültür malzemeleri DMEM, Ham's F12, streptomisin, ampicilin, L-glutamin, tripsin-EDTA (%0.25 trypsin+0.53mM EDTA), 25 ml ve 75 ml'lik flasklar, 96 kuyucuklu test plakları Multicell, Almanya firmasından sağlandı. Tez çalışmasında kullanılan MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] test solüsyonu, Annexin V/Propodium iodide içeren Tali Apoptoz Kiti, RNA izolasyon kiti, cDNA sentez kiti, Power Cyber Green Master Miksi ve primerler Life Technologies, ABD firmasından temin edildi.

3.2. Metot

3.2.1. Buğday çim ekstraktının (BÇE'nin) hazırlanması

Buğday tohumu çamaşır suyu+su karışımında 3 dk bekletildi. Ardından çeşme suyu ile yıkandıktan sonra en son yıkama distile su ile yapıldı. Tohumlar Hoagland solüsyon yöntemi ile 9 cm'lik steril petrielerde, $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ ve % 60 ortam neminde, 12:12 aydınlık:karanlık foto periyotta yetiştirildi (Şekil 3.1) [54]



Şekil 3.1. Buğday çiminin yetiştirilmesi.

Buğday çimleri 10. gün steril makasla çimlere zarar verilmeden kesilerek küçük parçalara bölündü. Küçük küçük kesilen 0.2010 - 0.2050 gr ağırlığındaki buğday çimleri ependorf tüplerine konuldu. Ardından tüplerin içine 3.2 mm çapında 2'şer adet bilya konarak -150°C de 15 dk bekletildi. Daha sonra TissueLyser LT (Qiagenfd) ile en yüksek hızda 3 dk boyunca buğday çimleri parçalanarak toz haline getirildi (Şekil 3.2). Bu işlem iki kez tekrarlandı ve daha sonra kullanılmak üzere $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ muhafaza edildi.



Şekil 3.2. Buğday çimlerinin homojenize edildiği bilyalı doku parçalayıcısı.

Kanser hücrelerine yapılacak uygulamada kullanılacak olan buğday ekstraları hazırlanırken 0.2 gr tartılmış ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ muhafaza edilmiş buğday çimlerine 1 ml distile su ilave edilerek Mixing Block' da (Şekil 3.3) $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 30 dk boyunca çalkalandı. Ardından 3000 rpm devirde $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 60 dk boyunca santrifüj edildi. Üzerindeki çim ekstraktı alınıp ilk önce $0.45\mu\text{M}$ ardından $0.22\mu\text{M}$ por çapındaki filtrelerden geçirilerek arındıldı ve kullanılmak üzere $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ muhafaza edildi.



Şekil 3.3. Ekstre eldesinde kullanılan çalkalamalı, soğutuculu miks blok.

3.2.2. Hücre kültürü

MCF-7 meme kanseri hücre hatları TÜTAGEM'den temin edildi. Hücre besi ortamı DMEM+Ham's F12 besi yerine % 10 sığır fetus serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile hazırlandı. Hazırlanan besi ortamı 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml'lik falkon tüplerde kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

3.2.3. Hücrelerin pasajlanması

Üremekte olan MCF-7 hücre pasajları %80 oranında doygunluğa ulaştığında yeniden pasajlandı. Doygunluğa ulaşan hücreleri pasajlamak için öncelikle flaskların içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından hücreler her 75 cm² lik flask için 5 ml steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Akabinde bu PBS pipetle uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapışıkları alandan kaldırılması için 3 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek etüvde 10 dk bekletildi. Yüze yapışık olan hücrelerin kaldırılmasının ardından süspansiyon halindeki hücre+tripsin-EDTA solüsyonu 15 ml hacimli bir tüp içerisine alınarak 750 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Ardından hücrelere zarar vermeden tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı ve besi yeri (75cm²lik flaksa 9 ml) ilave edilerek 3 adet 75 cm²'lik flaska bölünerek pasajlandı. Ardından hücreler 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

3.2.4. Hücre sayılarının hesaplanması

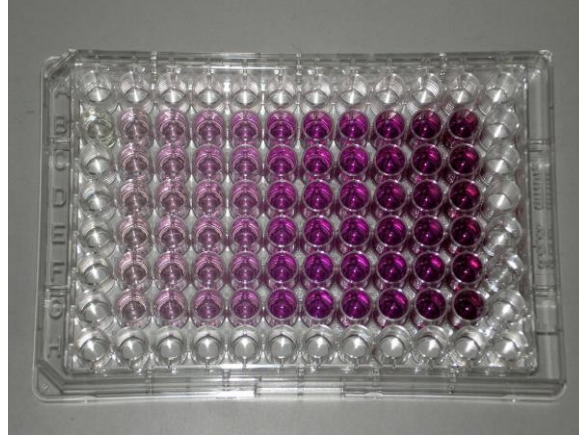
1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpe konuldu ve üzerine 90 µl tripan blue boyası eklenerek karıştırıldı. Bu karışım Neubauer lamı üzerine konularak 5 bölmedeki hücreler sayıldı, daha sonra hücre sayısı sulandırma miktarı ile çarpıldı ve çıkan sonuç sayılan alan (mm²) x 0.1 (mm) işlemi sonucuna bölünerek mm³ medyumda kaç milyon hücre olduğu bulundu. Böylece ekim yapılacak sayı belirlenip hücrelerin petriye ekimleri yapıldı. 100 mm'lik kültür petrisine 5x10⁶ hücre ve 96 kuyucuklu kültür plağının her kuyucuğuna 1x10⁴ hücre transfer edildi. 6 kuyucuklu flasklara 2x10⁵/kuyucuk hücre transfer edildi. Hücreler normal pasajlama ve stok için 75 cm²'lik flasklarda yetiştirildi. RNA izolasyonu ve Tali testi için 6 kuyulu flasklarda, MTT testi için 96 kuyucuklu flasklarda ekim işlemleri yapıldı. Hücrelerin geceboyunca petri kaplarına yapışmaları beklendikten sonra gerekli

ilaç ve/veya inhibitör eklenmesi takibinde belirlenen süreçler boyunca hücreler 37°C'de % 5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

3.2.5. MTT testi ile hücre canlılığının belirlenmesi

Canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri bir tetrazolium tuzu olan sarı renkli MTT'yi [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürür. Bu kristallerin DMSO ile muamele edildiğinde oluşan mor renkli çözeltinin spektrofotometrede 492 nm dalga boyunda absorbansının ölçümü ile ortamdaki canlı hücre oranı elde edilir.

MCF-7 meme kanseri hücreleri 1x10⁴/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu flaska ekim yapıldı ve 24 saat boyunca hücrelerin yapışması için inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan besiyeri boşaltıldı ve hücre kontrol, 10 kat (10k), 20 kat (20k), 40 kat (40k), 80 kat (80k), 160 kat (160k), 320 kat (320k), 640 kat (640k) ve 1280 kat (1280k) besi ortamı ile dilüe edilmiş buğday çim ekstraktı 200 µl/kuyucuk olacak şekilde besi yerine katılarak hücreler inkübasyona bırakıldı. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından her kuyucuğa 20 µl MTT ayıracı (çözelti 5mg/ml olacak şekilde) eklendi ve hücreler 4 saat boyunca etüvde bekletildi. Ardından MTT ayıracı eklenmiş besiyeri hücrelerden çekildi, her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi, karanlıkta 5 dakika bekletildi (Şekil 3.4) ve Thermo Scientific Multiskan Go (Şekil 3.5) spektrofotometre okuyucuda, 492nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak canlılık oranına bakıldı. Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre viabilite eğrisi çizildi. %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC₅₀) değeri GraphPad Prism programı kullanılarak nonlineer logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.



Şekil 3.4. Farklı dozda BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerine MTT solüsyonu uygulanmış plate.



Şekil 3.5. MTT testinde kullanılan mikroploka okuyucu cihaz.

3.2.6. mRNA izolasyonu

MCF-7 meme kanser hücreleri 2×10^5 /kuyucuk olacak şekilde 6'lı flakslara ekim yapıldı ve 24 saat boyunca hücrelerin yapışması için inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler her kuyucuğa sırasıyla kontrol, 20k, 40k sulandırılmış konsantrasyonlarda olacak şekilde buğday çim ekstraktı ile muamele edildi. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından ekstraktlı besi yeri uzaklaştırıldı. İşlem sırası aşağıdaki gibi takip edildi.

1. Her kuyucuğa hazırlanmış olan LysisBuffer 'dan (10 µl 2-mercaptoethanol ve 1 ml LysisBuffer) 1ml katıldı ve 30 dk beklendi.
2. Çözülen hücreler ependorf tüplere aktarıldı ve üzerine katılan Lysis Buffer miktarı kadar (1 ml) %70'lik alkol eklenerek hemen vortekslendi.
3. Alınan 700 µl spine column'a aktarıldı. 12000xg'de 15 saniye santrifüjlendi. Dibe çöken sıvı döküldü. Üstteki filtre, almak istediğimiz RNA'yı bağlayan kısımdır. Solüsyonun geri kalanı tekrar aynı spinecolumn'a döküldü ve 12000xg'de 15 saniye santrifüjlendi. Dibe akan sıvı döküldü, üstteki filtrede RNA toplanmış oldu.
4. Filtrede toplanmış RNA, yıkama işlemine alındı. Bunun için spinecolumn'a 700 µl Wash Buffer I konulup 12000xg'de 15 saniye santrifüjlendi. Dibe akan sıvı döküldü.
5. Sonra 500 µl Wash Buffer II konulup 12000xg'de 15 saniye santrifüjlendi. Dibe akan sıvı döküldü.
6. Tekrar 500 µl Wash Buffer II konulup 12000xg'de 2 dakika santrifüjlendi. Dibi döküldü, kalanı kuruması için 12000xg'de 2 dakika santrifüjlendi.
7. Spine column'lar yeni tüplere yerleştirilip tam ortasına gelecek şekilde üzerlerine 60 µl "RNase-free water" eklendi. Bir dakika böyle bekledikten sonra 12000xg'de 2 dakika santrifüjlendi. Böylece RNA alttaki toplama tüpüne geçmiş oldu; spine column atıldı.

3.2.7. İzole edilen RNA'ların kontrolü

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre (NanoQ OPTIZEN) (Şekil 3.6) ile ölçümler yapılarak sonuçlar ng/µl belirlenmiştir. Ölçümleri gerçekleştirilen RNA'lar ile ilgili hesaplamalar yapılmıştır ve RNA miktarları 400ng/10µl olacak şekilde eşitlenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. 24 ve 48 saat BÇE uygulaması sonucu izole edilen RNA miktarları.

Ortam	RNA ng/ μ l	
	24 saat	48 saat
Kontrol örnek no 1	94.0	27.6
Kontrol örnek no 2	117.3	35.0
Kontrol örnek no 3	52.3	31.3
20k Dilüe örnek no 1	83.3	38.0
20k Dilüe örnek no 2	73.9	50.3
20k Dilüe örnek no 3	100.7	39.2
40k Dilüe örnek no 1	115.8	62.3
40k Dilüe örnek no 2	141.8	70.3
40k Dilüe örnek no 3	108.6	54.8



Şekil 3.6. RNA miktarlarının belirlenmesinde kullanılan nano spektrometre (NanoQ OPTIZEN).

3.2.8. cDNA (komplementer zincir) sentezlenmesi

Tek zincirli total RNA zincirleri kullanılarak tamamlayıcı (komplementer) zincirleri, “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits” ile firmanın protokol basamakları izlenerek sentezlendi ve cDNA yapılarına dönüştürüldü. Bu amaçla önce Kit içeriği (Tablo 3.2) ile RNA örnekleri dondurucudan (-20 °C) çıkarıldı. Her bir 10 μ l örnek için kit içeriğindeki belirtilen hacimlerde strip tüpler içerisine konuldu.

Tablo 3.2. cDNA kit içeriği (1 örnek için).

Kit içeriği	Hacim (µl)
10X RT Buffer	2.0
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
10X RT Random Primers	2.0
Nuclease-free H ₂ O	4.2

Hazırlanan örnekler cDNA reaksiyonu için ‘‘Gradient PCR Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler’’ cihazına (Şekil 3.7) konarak, 25 °C’de 10 dk, 37 °C’de 120 dakika ve 85 °C’de 5dk inkübe edilerek cDNA’ lar sentezlendi.



Şekil 3.7. Elde edilen RNA’ların cDNA’ lara çevrilmesinde kullanılan PCR cihazı.

3.2.9. Real time PCR (RT-PCR) reaksiyonu

SYBR Green çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan özellik kazanan bir boyadır. SYBR Green tekniğinde reaksiyonun başlangıcında ortamda SYBR Green, primerler ve tek zincirli DNA bulunduğu için floresans sinyal yoktur. Primerin bağlanması ile amplifikasyon sonucu oluşan çift zincirli DNA'ya SYBR Green bağlanır ve az miktarda floresan sinyal açığa çıkar. Amplifikasyon oranına bağlı olarak çift zincirli DNA'nın yapısına daha fazla boya katılarak floresans sinyal artar.

Yapılan PCR amplifikasyonu "Power SYBR* Green PCR Master Mix" üretici firmanın protokol basamakları izlenerek yapıldı. Kit içeriği ile cDNA örneklerimiz ve primerler (Tablo 3.4) dondurucudan (-20 °C) çıkarıldı. Tablo 3.3'de belirtildiği üzere, her 2µl' lik cDNA örneği için ve her bir primer için (P53, Bcl-2, Bax, Apaf-1, Sitokrom-c, Kaspaz-3) ependorf tüplerine 18 örneklilik olacak şekilde belirtilen dozlarda 6 mix hazırlandı (her biri üçlü olarak). Ardından 96 kuyucuklu PCR plate her 2µl' lik cDNA örneği için hazırlanan mix primerlerden belirtilen dozda konuldu.

Tablo 3.3. Power SYBR* Green PCR Master Mix kit içeriği 1 örnek için.

Kit içeriği	Hacim (µl)
SYBER Green	10.0
F primer	0.5
R primer	0.5
Su	7.8

Hazırlanan örnekler gen ekspresyonlarının belirlenmesi için ABİ 7500 Fast Real Time PCR cihazı kullanılarak 95°C 10 dakika ve 45 döngü 95°C 3 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C 1 saniye olacak şekilde çoğaltıldı (Şekil 3.8).

Tablo 3.4. RT-PCR analizi için kullanılan genlerin primer dizileri.

P53	F	5'-CACGAGCGCTGCTCAGATAGC-3'
	R	5'-ACAGGCACAAACACGCACAAA-3'
Bcl-2	F	5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA -3'
	R	5'-ACAGTTCCACAAAGGCATCC -3'
Bax	F	5'-TTCATCCAGGATCGAGCAGA-3'
	R	5'-GCAAAGTAGAAGGCAACG-3'
Sitokrom-c	F	5'-AGTGGCTAGAGTGGTCATTCATTTACA-3'
	R	5'-TCATGATCTGAATTCTGGTGTATGAGA-3'
Apaf-1	F	5'-GATATGGAATGTCTCAGATGGCC-3'
	R	5'-GGTCTGTGAGGACTCCCCA-3'
Kaspaz-3	F	5'-GGTATTGAGACAGACAGTGG-3'
	R	5'-CATGGGATCTGTTTCTTTGC-3'



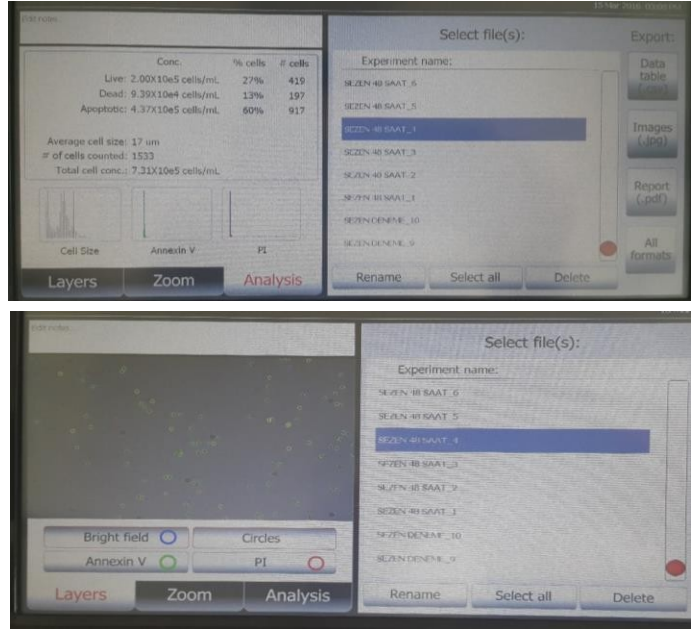
Şekil 3.8. Gen ekspresyonlarının belirlenmesinde kullanılan RT-PCR cihazı.

3.2.10. Tali görüntü tabanlı sitometre kullanarak apoptozisin değerlendirilmesi

Tali Apoptoz Kiti bir popülasyondaki apoptotik hücrelerin belirlenmesini ve bunların nekrotik ve canlı hücrelerden ayırılarak tanımlanmasını sağlar. Apoptik hücreler yeşil Annexin V AlexaFluor 488 ile ve nekrotik hücreler ise hem kırmızı propidium iyodür hem de Annexin V AlexaFluor 488 ile boyanırken, yaşayan hücreler bu boyalarla reaksiyona girmezler.

MCF-7 meme kanseri hücreleri 2×10^5 /kuyucuk olacak şekilde 6' lı flasklara ekim yapıldı ve 24 saat boyunca hücrelerin yapışması için inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler her kuyucuğa sırasıyla kontrol, 20kat ve 40kat sulandırılmış konsantrasyonlarda olacak şekilde buğday çim ekstraktı ile muamele edildi. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından ekstraktlı besi yeri uzaklaştırıldı. İşlem "Tali Apoptosis Kit – Annexin V AlexaFlour 488 and Propidium Iodide" üreticisi firmanın kullanım kılavuzunda gösterdiği basamaklar izlenerek yapıldı.

1. Ekstrakt uygulanmış MCF-7 hücreleri tripsin- EDTA ile kaldırıldı, 600 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek supernatant kısmı atıldı.
2. Geriye kalan hücrelere 300 µl için 300 µl ABB (Annexin Binding Buffer) eklendi.
3. Her bir örnek için 15 µl Annexin V AlexaFlour 488 eklendi ve vortekslendi.
4. Annexin V AlexaFlour 488 karışımı hücreler karanlıkta 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. 750 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant kısmı atıldı. Geriye kalan hücrelere 100 µl ABB eklendi.
6. 1µl Tali Propidium Iodide eklenip vortekslendi.
7. Oda sıcaklığında karanlıkta 5 dk inkübe edildi.
8. Ardından Tali analiz slaytlarına pipetle boyanmış hücrelerden 25µl konuldu Applied Biosystems Tali İmage Cytometer cihazı (Şekil 3.9) ile hücrelerin apoptik özellikleri değerlendirildi.



Şekil 3.9. Tali image sitometre cihazı (Applied Biosystems).

3.2.11. İstatistiksel analizler

MTT yöntemi ile 8 farklı dozda BÇE'nin MCF-7 hücreler üzerindeki olası etkisi ve % canlılık oranları mikropılaka okuyucu ile belirlendi. Student's t testi kullanarak elde edilen verilerin analizi JMP istatistik programı ile yapıldı ve BÇE'nin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre canlılık değerini gösteren grafikler elde edildi. İstatistiksel önem $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Tali analizi ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri Tukey-HSD testi kullanarak yapıldı ve BÇE'nin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre canlılık, ölü, apoptotik değerini gösteren grafikler elde edildi. Sonuçlar en az 3 paralel çalışmanın ortalaması \pm standart hata olarak ifade edilmiştir ve istatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak belirlendi.

BÇE uygulamalarına bağımlı gen ifadesi çalışmaları sonucu elde edilen görel katlı değişim dereceleri Tukey-HSD testi kullanarak kıyaslandı. Sonuçlar en az 3 paralel çalışmanın ortalaması \pm standart hata olarak ifade edilmiştir ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olarak değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 4

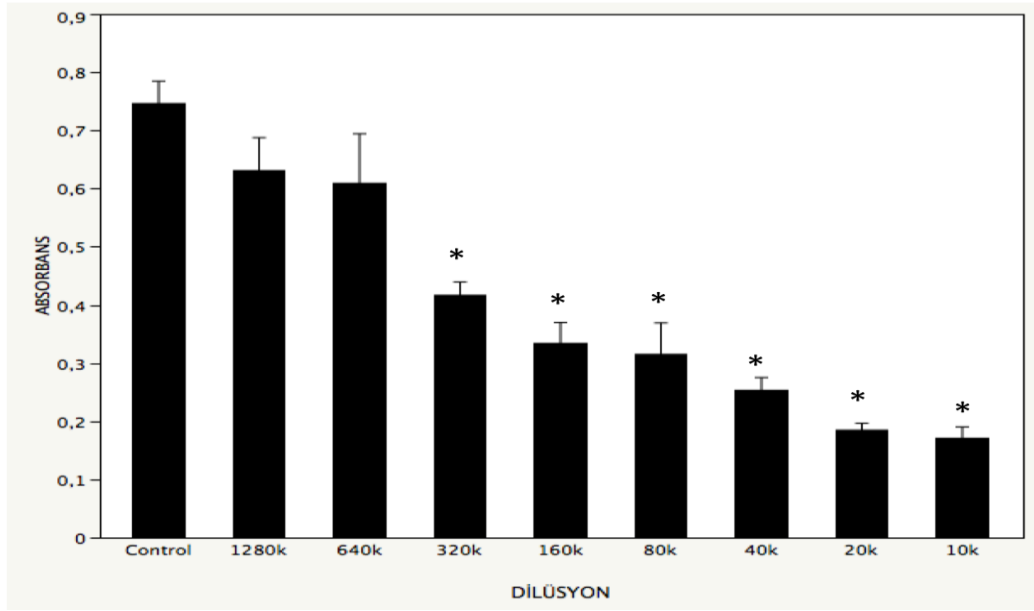
SONUÇLAR

4.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

96'lı kuyucuklu flasklar içerisinde MCF-7 hücre hattı ekildikten sonra 24 saat beklendi. Ardından hücreler seri dilüe edilen BÇE varlığında 24 veya 48 saat inkübe edildi. Bu sürelerin sonunda MTT yöntemi ile 8 farklı dozda BÇE'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki olası etkisi % canlılık oranları şeklinde mikropilaka okuyucu aracılığı ile hesaplandı. Student's t testi kullanarak elde edilen verilerin analizi JMP istatistik programı ile yapıldı ve BÇE'nin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre canlılık değerini gösteren grafikler elde edildi (Şekil 4.1, Şekil 4.2). İstatistiksel önem $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

24 saat BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinde 1280k dilüe ekstre hücre canlılık oranını %15 azaltırken, 40k dilüe ekstre hücre canlılık oranını %66 ve 20k dilüe ekstrenin ise hücre canlılık oranını %75 azalttığı gözlemlendi (Tablo 4.1, Şekil 4.1). BÇE konsantrasyonu arttıkça MCF-7 hücre serisinde canlılık oranının azaldığı gözlemlendi.

24 saat sonundaki analiz sonuçları istatistiksel olarak 640k ve üzeri konsantrasyonlarda p değerinin 0.05 altında olduğu görülerek anlamlı çıktı (Tablo 4.1).



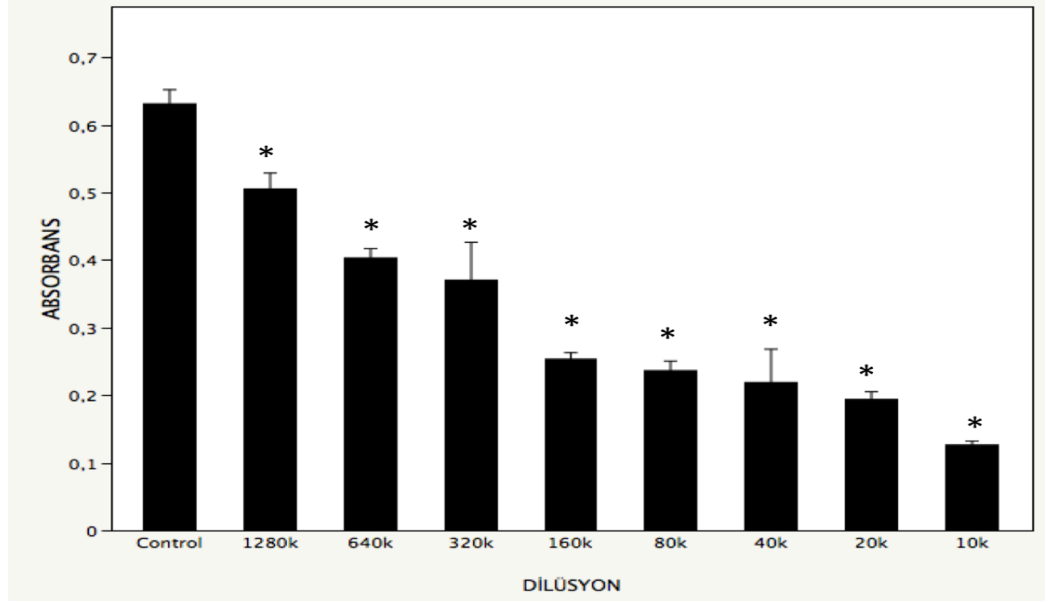
Şekil 4.1. 24 saat BÇE uygulanmış MCF-7 hücreleri ile yapılan MTT deneyinde BÇE-dilüsyonuna bağlı olarak elde edilen absorbans değerleri (*: P<0.001).

Tablo 4.1. 24 saat BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin kontrole göre canlılık % oranları ve p değerleri.

Dilüsyon	% Kontrol	p değeri
10k	23	<.0001
20k	25	<.0001
40k	34	<.0001
80k	42	<.0001
160k	45	<.0001
320k	56	<.0001
640k	82	0.0362
1280k	85	0.0775

48 saat BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinde 1280k dilüe ekstre hücre canlılık oranını %20 azaltırken, 40k dilüe ekstre hücre canlılık oranını %65, 20k dilüe ekstre hücresinin ise hücre canlılık oranını %69 azalttığı gözlemlendi. (Tablo 4.2, Şekil 4.2). BÇE'nin konsantrasyonu arttıkça MCF-7 hücre serisinde canlılık oranının azaldığı gözlemlendi. 48 saat sonundaki analiz sonuçları istatistiksel olarak 1280k ve üzeri konsantrasyonlarda p değerinin 0.05 altında olduğu görülerek anlamlı çıktı (Tablo 4.2).

Hem 24 hem de 48 saatlik ortamlarda alınan yanıtların analiz sonuçlarına göre MCF-7 hücrelerinin canlılık oranının uygulanan BÇE konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı tespit edildi.

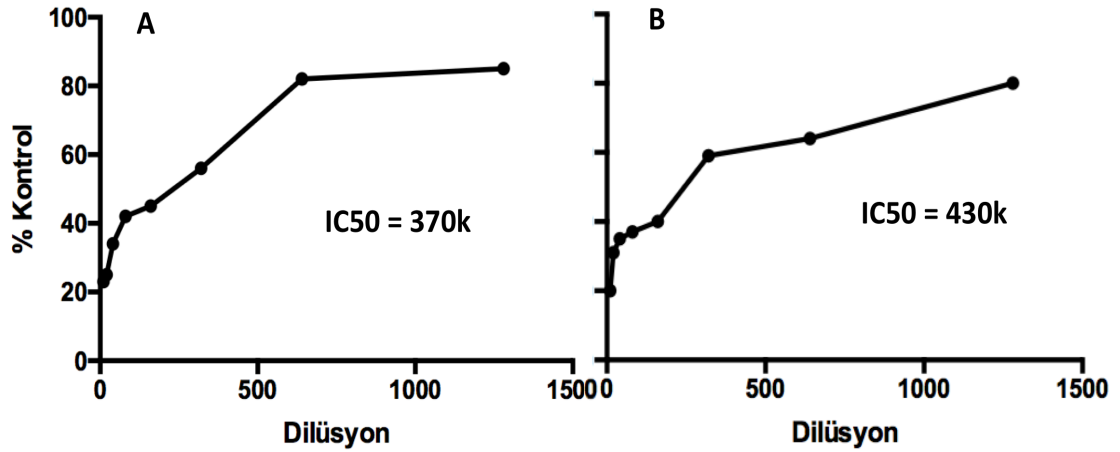


Şekil 4.2. 48 saat BÇE uygulanmış MCF-7 hücreleri ile yapılan MTT deneyinde BÇE-dilüsyonuna bağlı olarak elde edilen absorbans değerleri (*: P<0.001).

Tablo 4.2. 48 saat BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinin kontrole göre canlılık % oranları ve p değerleri.

Dilüsyon	% Kontrol	p değeri
10k	20	<0.0001
20k	31	<0.0001
40k	35	<0.0001
80k	37	<0.0001
160k	40	<0.0001
320k	59	<0.0001
640k	64	<0.0001
1280k	80	<0.0008

MCF-7 meme kanser hücrelerinin artan dilüsyonlardaki BÇE uygulamasına 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda elde edilen verilerden IC50 değerlerinin elde edilmesi için GraphPad Prism programı kullanıldı. MTT deneylerinden her dilüsyon için elde edilen veriler logaritmik ölçekte değerlendirilerek nonlineer regresyona uyum eğrileri elde edildi ve bu doz-yanıt eğrilerinden IC50 değerleri programdan alındı. IC50 değerleri 24 saat inkübasyon için 370k dilüsyon ve 48 saat inkübasyon için 430k dilüsyon olarak belirlendi (Şekil 4.3).



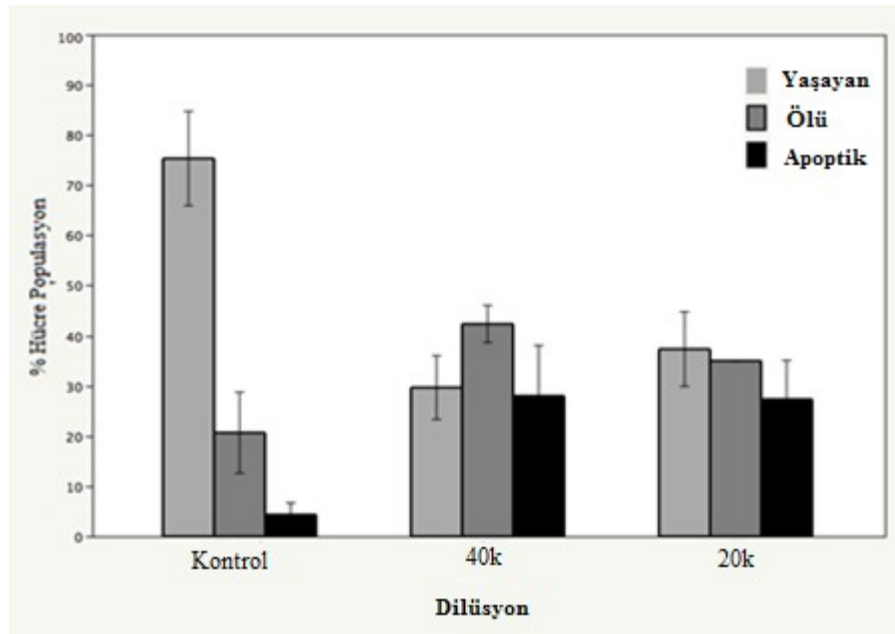
Şekil 4.3. BÇE ile 24 saat (A) ve 48 saat (B) inkübasyon sonucunda elde edilen nonlineer regresyon eğrileri ve IC50 değerleri.

4.2. Tali Görüntü Tabanlı Sitometre Kullanarak Apoptozisin Değerlendirilmesi

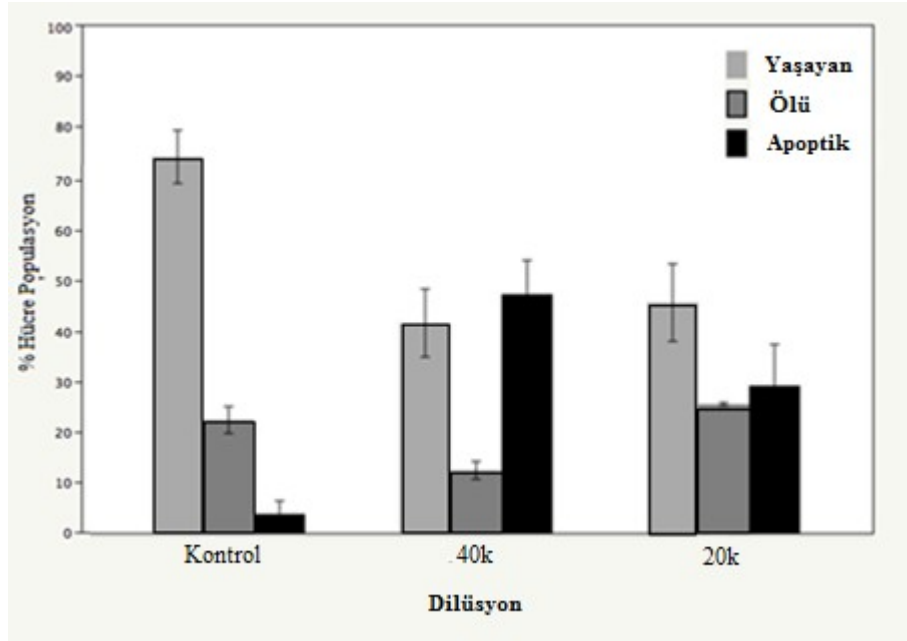
Normal canlı hücrelerde, fosfatidilserin (PS) hücre membranının sitoplazmik yüzeyi üzerinde bulunmaktadır. Apoptotik hücrelerde PS, plazma membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru yer değiştirmiştir. Apoptoz işlemi için dış yüzeydeki PS fagositoz yapan makrofajlar için markır görevi görür. Tali görüntü tabanlı sitometre PS için yüksek bir afiniteye sahiptir. Annexin V aralarında yüksek çekim olan PS'e bağlanır ve apoptotik hücreleri belirlemek için kullanılır. Tali Apoptozis Kiti, yeşil floresan anneksin V-AlexaFluor 488 konjugatı apoptotik hücreleri, kırmızı-floresan propidium iyodür ölü ya da nekrotik hücreleri belirlemek için her ikisini de içerir. Çalışmalarımızın analizi Tukey-HSD testi kullanılarak yapıldı. BÇE'nin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre canlılık, ölü ve apoptik değerini gösteren grafikler elde edildi (Şekil 4.4, Şekil 4.5). Sonuçlar en az 3 paralel çalışmanın ortalaması \pm standart hata olarak ifade edilmiştir ve istatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak belirlendi.

24 saat sonunda kontrol, 40k dilüe ve 20k dilüe BÇE uygulanan MCF-7 hücrelerinde canlı hücre yüzdesinin sırayla %75, %30 ve %37 olduğu, apoptik hücre yüzdesinin sırayla %4, %28 ve %27 olduğu ve ölü hücre yüzdesinin sırayla %21, %42 ve %35 olduğu tespit edildi (Şekil-4.4). 24saat BÇE uygulaması ile *in vitro* insan meme kanser modeli olan MCF-7 hücre dizisinin kültür ortamındaki canlı kalan miktarındaki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4.3).

48 saat sonunda kontrol, 40k dilüe ve 20k dilüe BÇE uygulanan MCF-7 hücrelerinde canlı hücre yüzdesinin sırayla %74, %41 ve %45 olduğu, apoptik hücre yüzdesinin sırayla %4, %47 ve %29 olduğu ve ölü hücre yüzdesinin sırayla %22, %12 ve %25 olduğu tespit edildi (Şekil 4.5). 48 saat BÇE uygulaması ile insan meme kanser modeli olan MCF-7 hücre dizisinin kültür ortamındaki canlı kalan miktarındaki azalış ve apoptik hücre popülasyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4.3).



Şekil 4.4. 24 saat BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde Tali testleri ile tespit edilen yaşayan, ölü ve apoptik hücrelerin dağılımı.



Şekil 4.5. 48 saat BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde Tali testleri ile tespit edilen yaşayan, ölü ve apoptik hücrelerin dağılımı.

Tablo 4.3. 24 ve 48 saat BÇE ile muamele edilmiş MCF-7 meme kanseri hücrelerinden Tali deneylerinde elde edilen apoptotik, ölü ve yaşayan hücrelerin kontrol karşısında istatistiksel değerlendirilmelerinden elde edilen p değerleri.

	p değerleri		
	Yaşayan	Ölü	Apoptik
24 saat inkübasyon			
40k	0.0146	0.0557	0.1416
20k	0.0322	0.1998	0.1535
48 saat inkübasyon			
40k	0.0188	0.0284	0.0023
20k	0.0340	0.5734	0.0352

4.3. Real Time PCR (RT-PCR) Reaksiyonu

RT-PCR öncesi elde edilen RNA örnekleri RT-PCR çalışmasında kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edildi. Takibinde gen ekspresyonu için reverse transkriptaz enzim protokolü ile cDNA'ya dönüştürüldü. PCR çalışmalarında her hücrede aynı seviyede eksprese olma özelliğine sahip β -aktin geni deneysel standart kontrol olarak kullanıldı. Sonuçlar ekspresyon dereceleri dikkate alınarak birlikte değerlendirildi ve bulunan gen konsantrasyon değerleri kontrol gen konsantrasyonuna oranlayarak, hedef bölge gen ekspresyon değerleri tespit edildi. Buna ek olarak, BÇE uygulamalarına bağlı olarak elde edilen rölatif gen ekspresyon ifadeleri JMP yazılımı kullanarak Tukey-HSD testi ile kıyaslandı. Sonuçlar en az 3 paralel çalışmanın ortalaması \pm standart hata olarak ifade edilmiştir ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olarak değerlendirilmiştir.

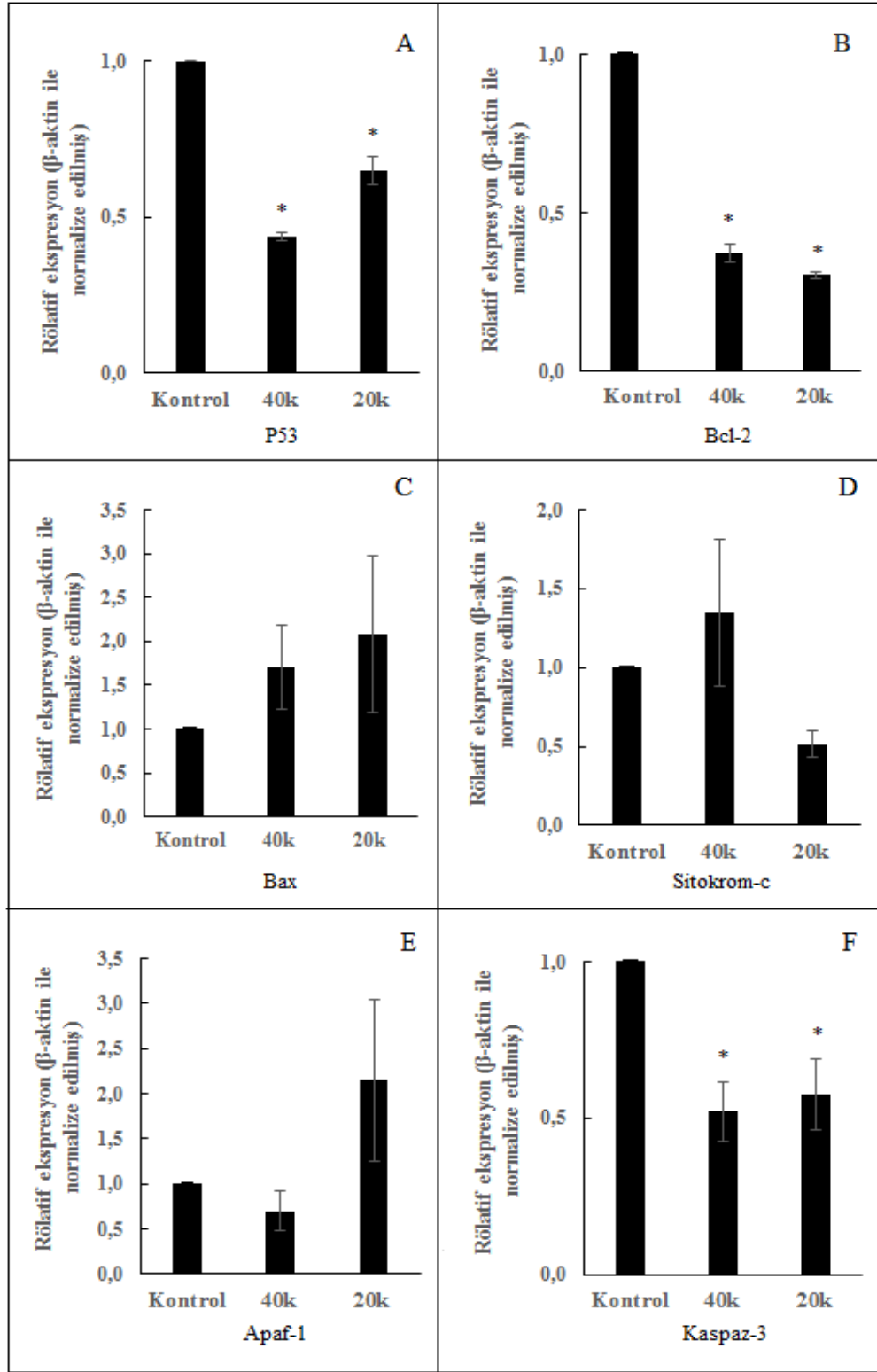
24 saat BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücre serilerinde RT-PCR sonucunda genlerdeki değişimler incelendiğinde, 40k ve 20k dilüe BÇE ile inkübe edilen hücrelerde P53 gen ekspresyonunun sırası ile %56 ve %35 azaldığı (Şekil 4.6.A); Bcl-2 gen ekspresyonunun sırası ile %63 ve %70 azaldığı (Şekil 4.6.B); Bax gen ekspresyonunun sırası ile %70 ve %100 arttığı (Şekil 4.6.C) ve Kaspaz-3 gen ekspresyonunun sırası ile %48 ve %43 azaldığı (Şekil 4.6.F) gözlemlendi. Apaf-1 gen ekspresyonunun ise 40k ortamda %30 azalırken 20k ortamda %115 artmıştır (Şekil 4.6.E). Tam tersinir olarak Sitokrom-c gen ekspresyonu ise 40k dilüe BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde %34 artarken 20k dilüe BÇE ile inkübe edilen hücrelerde %49 azalmış (Şekil 4.6.C) olarak tespit edildi.

24 saat sonundaki RT-PCR analiz sonuçlarında hem P53 ve hem de Bcl-2 geninde her iki dozda BÇE uygulaması ile (40k dilüe ve 20k dilüe) kontrole karşı gözlenen ekspresyondaki azalmanın p değeri 0.05 altında olduğu görülerek istatistiksel anlamlı kabul edildi (Şekil 4.6.B; Tablo 4.5). Bunun yanında Kaspaz-3 değerlerinde de her iki dilüsyona 24 saatte alınan baskılanmış gen ekspresyonu da istatistiksel olarak önemli idi (Şekil 4.6.D; Tablo 4.4).

48 saat BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücre serilerinde RT-PCR sonucunda genlerdeki değişimler incelendiğinde, 40k ve 20k dilüe BÇE ile inkübe edilen hücrelerde P53 gen ekspresyonunun sırası ile %100 ve %56 arttığı (Şekil 4.7.A); Sitokrom-c gen ekspresyonunun sırası ile %30 ve %269 arttığı (Şekil 4.7.D); Apaf-1 gen ekspresyonunun sırası ile %112 ve %34 arttığı (Şekil 4.7.E) ve Kaspaz-3 gen ekspresyonunun sırası ile

%36 ve %100 arttığı (Şekil 4.7.F) gözlemlendi. Bcl-2 ve Bax gen ekspresyonlarının ise 40k dilüe BÇE ile inkübe edilen hücrelerde önemli bir değişimleri görülmezken 20k dilüe BÇE ile inkübe edilen hücrelerde Bcl-2 ve Bax gen ekspresyonlarında sırası ile %18 ve %58'lik bir azalma tespit edildi (Şekil 4.7.B ve C);

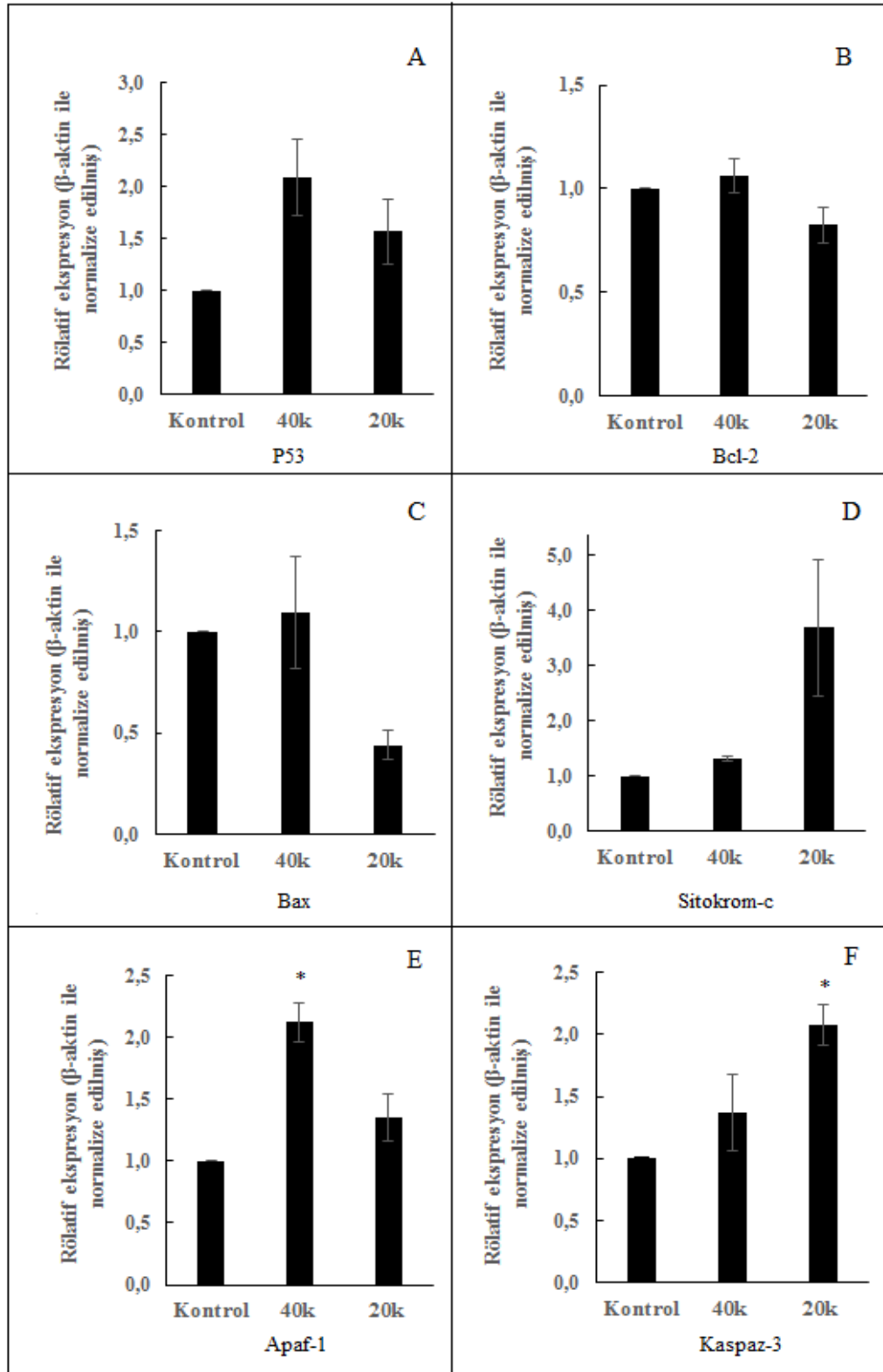
48 saat sonundaki RT-PCR analiz sonuçlarında Apaf-1 geninde (40k dilüe BÇE'nin kontrole karşı) ve Kaspaz-3 geninde (20k dilüe BÇE'nin kontrole karşı) gözlenen artışın p değeri 0.05 altında olduğu görülerek istatistiksel anlamlı çıktı. Bunun yanında Sitokrom-c gen ifadesinde kayda değer bir artış gözlemlendi (Şekil 4.7.E, F ve D; Tablo 4.5).



Şekil 4.6. 24 saat 40k ve 20k dilüe BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücre serisinde RT-PCR analizi ile (A) P53, (B) Bcl-2, (C) Bax, (D) Sitokrom-c, (E) Apaf-1 ve (F) Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri.

Tablo 4.4. RT-PCR analiz sonucu 24 saat BÇE uygulanmış MCF-7 hücre serisinde eksprese olan gen yüzdeleri, konsantrasyonun kontrole karşı p değerleri.

Gen	BÇE	Kontrole karşı
		p değeri
P53	40K	<0.000
	20K	<0.000
Bcl-2	40K	<0.000
	20K	<0.000
Bax	40K	0.685
	20K	0.439
Sitokrom-c	40K	0.659
	20K	0.464
Apaf-1	40K	0.918
	20K	0.343
Kaspaz-3	40K	0.017
	20K	0.029



Şekil 4.7. 48 saat 40k ve 20k dilüe BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücre serisinde RT-PCR analizi ile (A) P53, (B) Bcl-2, (C) Bax, (D) Sitokrom-c, (E) Apaf-1 ve (F) Kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri.

Tablo 4.5. RT-PCR analiz sonucu 48 saat BÇE uygulanmış MCF-7 hücre serisinde eksprese olan gen yüzdeleri, konsantrasyonun kontrole karşı p değerleri.

Gen	BÇE	Kontrole karşı
		p değeri
P53	40K	0.069
	20K	0.375
Bcl-2	40K	0.805
	20K	0.241
Bax	40K	0.914
	20K	0.120
Sitokrom-c	40K	0.950
	20K	0.082
Apaf-1	40K	0.004
	20K	0.281
Kaspaz-3	40K	0.454
	20K	0.022

5. BÖLÜM

TARTIŞMA

Dünyada kadınlarda % 23'lük bir oranla diğer kanser türlerine göre daha fazla görülen meme kanseri, % 14 mortalite oranı ile en önemli hastalıklardan biridir [21]. Kanser her türü olmakla beraber meme kanseri içinde yeni, spesifik, etkin ve yan tesiri az olan bir ilaç ya da kimyasal ajan keşfetmek için günümüzde çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Teşhis ve tedavisinde kayda değer gelişmeler olmasına rağmen, mortalite oranlarının yıllar içerisinde artış göstermesi meme kanserinin hala insanlığı tehdit eden en önemli kanser türü olduğu görülmektedir [55].

Kemoterapide kullanılan birçok ilacın amacı, kontrolsüz ve hızla çoğalan kanserli hücreleri özellikle çoğalmaları sırasında onları tahrip edip yok etmektir. Hastalar üzerinde uygulanan kemoterapik tedavilerde kayda değer olumlu gelişmeler olmasına rağmen bazı durumlarda bu ilaçlar sağlıklı hücreleri olumsuz etkileyerek ciddi doku tahribatlarına neden olurlar ve dolayısı ile tedavi süresince hastada birçok sağlıklı hayati organ da bu tedavi metodundan olumsuz etkilenir. Vücut direnci bu yan etkilerin en önemlilerindedir. Bazı anti-kanser ilaçları immün sistem üzerinde baskılanmaya neden olarak vücudu savunmasız bırakırlar. Bu tür bazı anti-kanser ilaçlar vitamin A, E, C, çinko, katalaz, süperoksitdismutaz, Sitokrom-c ve glutatyon gibi hücresele antioksidanların etkisini azaltırlar ve buna bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin seviyesinde yükselmelere neden olurlar [56]. Bu sebeple kemoterapi ile tedavi edilen hastaların tedavilerinde kullandıkları ilaçlarla birlikte ROS düzeylerini düşürecek ve savunma mekanizmasını güçlendirecek antioksidan maddelerle eş zamanlı olarak verilmesi tedavi modalitelerinden biridir. Çalışmalar bu tür kombine uygulamaların kanser öncesi lezyonları önlediği ve yan etkileri en aza indirdiği yöndedir [57, 6].

Ayrıca kullanılan ilaçlara karşı gelişen direnç ile tedaviler istenilen etkiyi gösterememektedir. Kanser tedavilerinde ilaç direnci başarıyı etkileyen önemli bir unsurdur. Uygulanan tedavi ile apoptoza gitmesini istediğimiz kanserli hücrede ilaca direnç gelişmesi durumunda apoptoz olmadığı ve çoğalmaya devam ettiği görülmektedir [58]. Hücrelerin kanserleşmesinde apoptoz yolağında meydana gelen aksaklıkların önemli bir rolü vardır. BÇE'nin kanser hücrelerinde çoğalmayı durdurduğu ve hücreleri apoptoza götürdüğü ile ilgili birçok çalışma rapor edilmiştir [52, 6, 59]. Farklı birçok vakada hastalara uygulanan BÇE'nin nispeten güvenli sitotoksik profil çizmesi ve ciddi yan etkileri olduğunu gösteren çalışmalar rapor edilmemesi ve birçok hastanın yaşam kalitesini arttırması ile kanser tedavilerinde önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Bizde yaptığımız çalışmada yukarıda sıraladığımız antioksidan, antikanserojen, antitümöral, kombine uygulamalarda kemoterapinin oluşturduğu yan etkileri azaltan ve güvenilir özellikleriyle bilinen BÇE'nin MCF-7 hücre serisi üzerindeki antiproliferatif ve apoptik etkilerini *in-vitro* koşullarda incelemeyi hedefledik.

BÇE'nin insan meme kanser modeli olan MCF-7 hücrelerinin *in vitro* koşullarda gösterdiği hücresel proliferasyonu üzerinde oluşturabileceği muhtemel sitotoksik etkisini irdelemeyi hedefleyen çalışmalarımızda MTT testini kullandık. MTT deneyi canlı hücrenin metabolik aktivitesi temelinde dizayn edilmiş kolorimetrik bir deneydir. Hücresel NAD(P)H-bağımlı oksidoredüktaz enzimlerinin aktivitesi ortamda bulunan hücre sayısı ile orantılı olup incelenen ortamda metabolik olarak aktif olan canlı hücre sayısını gösteren belirteçlerdendir. Bu enzimler çözünür sarı renkli tetrazolium boya olan MTT'yi çözünmez mor renkli formazan yapısına indirgerler. Sonuçta oluşan renkli ortamların 500 veya 600 nm dalga boyunda spektrofotometre ile yapılan ölçümleri en çok kullanılan sitotoksik ve sitostatik fonksiyon ölçümlerindendir ve hücre canlılığının bir belirteci olarak rutin kullanılan testlerdendir. Çalışmalarımızda metabolik açıdan fonksiyonel hücre popülasyonunun uygulanan BÇE konsantrasyonuna bağımlı olarak BÇE konsantrasyonu arttıkça anlamlı derecede azaldığını gördük. BÇE hem 24 saat hem de 48 saatlik uygulamalarında kanser hücrelerinin metabolik faaliyetlerini durdurarak bir *in-vitro* insan meme kanser modeli olan MCF-7 hücrelerinin çoğalmaları üzerinde baskılayıcı bir fonksiyona sahip olduğunu gösterdi. 24 saatlik uygulamalarda 640k dilüsyonda başlayarak artan konsantrasyonların hepsinde MCF-7 hücrelerinin spontan

proliferasyonlarının baskılanmasında istatistiksel değerde anlam elde edilirken 48 saatlik uygulamaların hepsinde aynı etkinin izlenmesinde istatistiksel değerde anlam elde edildi (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Tablo 4.1, Tablo 4.2).

MTT değerlerini zaman-bağımlı olarak değerlendirdiğimizde ise 24 saat için hesaplanan IC50 değerine en yakın olan 320k dilüsyonundan başlayarak artan konsantrasyonlardaki BÇE uygulamalarının sonuçlarında bu tür modele uygun bir veri değerlendirilemedi. MCF-7 kanser hücrelerinden hesaplanan IC50 değerlerinden çok daha fazla dilüe ortamlar olan 1280k ve 640k uygulamalarına alınan antiproliferatif yanıtlar her ne kadar bu konsantrasyonlar için yanıtların zaman-bağımlı olduğunu ifade etse de tüm değer birlikte incelendiğinde yanıtların doz-bağımlı modellerle sınırlı olduğu belirlendi (Tablo 4.1, Tablo 4.2).

Sungurluoğlu A. ve ark. K562 kronik myeloid lösemi hücre serilerini BÇE'nin %10 konsantrasyonundaki sulu ve etanollü ekstresi ile muamele ederek yaptıkları çalışmada hücre canlılığını ve apoptik hücreleri 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda MTT testi ve "DNA laddering" ile incelemişlerdir. Sulu ve etanollü buğday çimi ekstresi ile uygulama gören K562 hücreleri kendi kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında tüm MTT değerlerinin önemli ölçüde farklı olduğunu gözlemişlerdir. En fazla antiproliferatif ve apoptik etkiyi ise 48 saatte buğday çiminin sudaki ekstresi ile muamele edilmiş hücre serilerinde apoptik hücre sayısının 4.6 kat artışı ve hücre canlılık oranının %34 azalışı ile gözlemişlerdir [59]. Hussain A. ve ark. ise MCF-7 hücreleri üzerinde BÇE'nin büyümeyi bastırma etkisini MTT testi ile değerlendirmişler, 24 ve 48 saat boyunca değişen çeşitli konsantrasyonlarda BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücre hattında hücre canlılık oranının hem doza hem de zamana bağlı olarak azaldığını gözlemişlerdir [6].

Apoptoz sinyali alan hücre küçülerek büzüşür. Daha sonra hücre apoptotik cisimcikler denilen küçük parçalara bölünür. Bu süreçte normal hücrede sitoplazmik yüzeyde yer alan PS membranın hücre dışı yüzeyinde tespit edilir. Apoptozu nekrozisten ayıran spesifik özelliklerinden biri olan bu membran lipidinin konumu deneysel olarak da apoptik hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır [60]. Çalışmamızda BÇE uygulaması sonucu insan meme kanser MCF-7 hücre serisinde gözlenen canlı hücre oranındaki düşüşün apoptoza bağlı olup olmadığı apoptozun bu spesifik özelliklerinden yararlanarak geliştirilmiş olan deneysel Tali görüntü tabanlı sitometre kullanılarak inceledik. PS bağlayan yeşil floresan anneksin apoptotik hücreleri, nükleik asit boyası

olarak kabul edilen kırmızı-floresan propidium iyodür ise membran bütünlüğü bozulmuş ölü ya da nekrotik hücreleri belirlemek için kullanıldı. Yapılan test sonucunda BÇE'nin her iki konsantrasyonda da hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarda yaşayan hücre popülasyonunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmalar tespit edildi (Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Tablo 4.3) ve bu bulgular MTT ile BÇE'nin her iki inkübasyon süresinde de tespit edilen antiproliferatif etkisine ait verilerimizi destekledi.

24 saatlik BÇE inkübasyonunda canlı hücre popülasyonunda her iki dilüsyon ile istatistiksel bir azalma olurken hem ölü hem de apoptik hücre popülasyonlarında istatistiksel anlama erişmemekle beraber artmış oranlar tespit edildi. Bu da BÇE uygulamasının sonucunda azalmış olan canlı hücre popülasyonundaki kaybın hem apoptik hem de ölü popülasyonlar içerisine dağıldığını ve dolayısı ile BÇE'nin hem direkt sitotoksik etkiye hem de apoptik etkiye sahip olabileceğine işaret etti (Şekil 4.4 ve Tablo 4.3). 24 saatlik süreçte tespit edilen apoptik hücre oranları kontrole göre 40k dilüsyonda 6.46 kat ve 20k dilüsyonda 6.31 kat artışla izlendi. Meme kanser MCF-7 hücrelerinin 48 saat BÇE ile inkübe edilmesi takibinde elde edilen değerlerin incelenmesi ise her iki dilüsyonda artmış olan apoptik hücre popülasyonunun önemini ortaya koydu ($p < 0.05$) (Şekil 4.5 ve Tablo 4.3). BÇE, 48 saat sonunda apoptik hücre miktarında kontrole göre 40k dilüsyonda 12.53 kat ve 20k dilüsyonda 7.73 kat artışa neden oldu. 24 saatlik ortamlarda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, 48 saat inkübasyon ile daha da artmış olarak izlenen bu apoptik popülasyonun zaman-bağımlı olarak kendini belirgin bir şekilde ortaya koyması BÇE'nin MCF-7 insan meme kanser hücreleri üzerinde *apoptozisi indükleyici fonksiyonel bir ekstrakt* olarak değerlendirilebileceğini vurguladı.

MCF-7 hücrelerinin kültürde çoğalmalarına yönelik bölünme süreleri ortalama 24 saattir [61]. Bizim değerlendirme koşullarımız hem ortalama tek bölünme süresi olan akut dönemi (24 saat) hem de takibinde gelişecek ikinci hücre bölünme periyodunu da içermektedir (48 saat). Tali sonuçlarının tümü göz önüne alınarak değerlendirildiğinde, BÇE'nin akut olarak azda olsa MCF-7 hücreleri üzerinde direk bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. İlk 24 saatlik akut dönemde her iki dilüsyonda da konsantrasyona bağımlı olmamakla beraber ölü hücre miktarlarında bir artış gözlenmiştir (40k dilüsyonda 2.04 kat, 20k dilüsyonda 1.69 kat) (Şekil 4.4). Apoptoz, hücre ölümüne yol açan son derece düzenli spesifik biyokimyasal bir dizi olayın aktif

olarak başlamasından ve yayılmasından doğmaktadır. Bu işlem, zarar gören ya da işlevselliğini yitiren hücreleri elimine etmekle sonuçlanır. Apoptozis sürecinin, etki edilen mekanizmanın uyarılmasından sonra 12 ila 24 saat arasında tamamı ile işlevle girdiği tahmin edilmektedir. Ancak hücre kültürü içinde gözle görülür morfolojik değişikliklerin 2 saatten daha kısa bir süreç içerisinde tespit edilebildiği belirtilmektedir [62, 63, 64]. Tali deneylerimizde biz de BÇE'nin ilk 24 saatte hücrel apoptozu uyardığını ve istatistiksel anlamda apoptik değerlere deneysel olarak 48 saat sonra erişileceğini gözledik.

P53 hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA zarar gördüğünde DNA tamir proteinlerini harekete geçirir ya da DNA tamir edilemeyecek kadar zarar gördüğünde apoptozu başlatır. Yaptığımız çalışmada 24 saat inkübasyon sonucunda apoptozun başlamasına rağmen P53 ekspresyonunda azalış (40k dilüsyonda %56, 20k dilüsyonda %35) tespit ettik. Her ne kadar bu yanıt beklenmedik olsa da, yaptığımız literatür incelemesi bu verinin bazı muhtemel nedenlerini ortaya koydu. Bunlar sırası ile Wnt yolağı, MdmX (Mdm4 olarak da bilinir) yolağı ve eşik mekanizmasıdır.

a) Wnt Yolağı: Bir organizmada hem embriyonik hem de ergin dönemde görev alan çeşitli sinyal yolları vardır. Bu yollardan biri de Wnt sinyal yoludur. Wnt sinyal yolları, ergin dönemde kendini yenileyen hücrelerin adezyonunda, hedef hücre genlerinin transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, embriyonik dönemdeki hücrelerde ise hücre polaritesinin, proliferasyonunun sağlanmasında, farklılaşmada ve hücre göçünde önemli ölçüde rol oynamaktadır. Wnt ailesi hem otokrin hem de parakrin karakterde davranma yeteneğine sahiptir. Wnt sinyal yolunun çeşitli kanser türleri ve birçok ciddi hastalıklar ile olan ilişkisi literatürde geniş yer bulmaktadır. Wnt7, sıralı birçok sinyali etkileyerek hücre dışı matrixi yeniden biçimlendirir ve tümör hücrelerine invaziflik ve dolayısı ile metastaz yapabilme özelliği kazandıracak uygun bir ortam hazırlayarak onu agresif hale getirebilir [65]. PC12 sinir hücreleri kullanarak yapılan bir in vitro çalışmada, Wnt7b transkript ve protein seviyelerinin P53 ile doğrudan düzenlendiğini ortaya koymuştur. P53 gen ekspresyonundaki susturma, hücrede Wnt7b protein düzeylerinin düşmesine neden olmuştur [66]. Bu sürpriz bulgu verilerimizi daha anlamlı hale getirmiştir. Çünkü MCF- 7 hücreleri, bir meme kanserli bayan hastanın metastatik lokalizasyonundan orijine olan epitelyal meme bez adenokarsinomasıdır.

Protein içeriği açısından incelendiğinde ise doğal tipte P53 ekspresyonuna sahipken onkogenik tipte Wntb ekspresyonuna sahiptir [67]. Ortamlarımızda BÇE uygulaması ile ilk 24 saatte azalan P53 indirek olarak Wntb protein seviyelerinin azalmasına neden olarak hücrel proliferasyonun durdurulmasını sağlamış olabilir. İn vivo koşullarda böyle bir yanıt meme kanser hücrelerin invazifliğinin ve metastaz yapma özelliğinin baskılanması ile sonuçlanır.

b) MdmX Yolağı: MCF-7 hücreleri normal P53 ekspresyonuna sahip olmakla beraber MDM2 (Murine Double Minutes) aile üyelerinden MdmX'in normal üstü düzeylerde artmış ifadesine sahip bir meme kanser hücre dizisidir. MDM2 geni P53'ü kontrol altında tutar ve bu özelliği ile P53'ün G1/S geçişinde siklusu durdurma ve apoptoz etkisini engeller. MDM2 proteini fonksiyonel olarak sitoplazmada P53 gene bağlanarak aktivitesini bloke eder. Hücrel stres durumunda MDM2, P53'e bağlanma yerine asetilasyon ve fosforilasyon yoluyla yapısal değişikliğe uğrar. Bu yüzden MDM2 proteini P53'ü bağlayamaz ve serbest kalan P53 transkripsiyonel aktivite göstererek G1 ve G2 kontrol noktalarında siklusu durdurarak tamir için zaman kazandırır ya da apoptoza neden olur. MCF-7 hücre hattında MdmX genin aşırı ifadesi tümör oluşumuna katkıda bulunabilir. MdmX, Mdm2 gen ailesinin bir üyesi olarak P53 geni ile kompleks oluşturur ve onu negatif yönde kontrol eder [68]. Tümör hücrelerinde aşırı sentezlenen MdmX geni P53 genin etkinleşmesini baskılar. Hatta P53 gen aktivasyonunu sağlayacak muhtemel ajanın fonksiyonel yeteneğini de tehlikeye düşürebilir. Bu nedenle, P53 aktivasyonu sağlayacak muhtemel tedavi edici ajanın, aşırı MdmX sentezleyen tümör hücrelerine karşı etkisi azalır [69]. Bizim çalışmamızda da 24 saat inkübasyon sonucunda P53 gen ekspresyonundaki düşüş MCF-7 hücrelerinde MdmX genin normal olmayan aşırı ekspresyonuna bağlı olabilir.

c) Eşik Mekanizması: Genel olarak P53 tümör baskılayıcısı hücre çoğalmasını durdurma yani "arrest" ya da apoptoza gönderme hedefinde herhangi bir hücrel strese cevap olarak özgün transkripsiyonel yolları uyardığı bilinmektedir. Ancak bu iki farklı hücrel kaderi tayin eden olaylar arasındaki seçimin moleküler mekanizması henüz tam olarak detaylanmış değildir. Proapoptik genler ile karşılaştırıldığında proarrest genlerinin promotörlerinin P53 gen afinitesi daha yüksek olmasından dolayı, P53 geni seçici olarak arrest genlerini aktive ettiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. 2013 yılında Karacikova M. ve ark. hücrelerde P53 ekspresyon seviyelerine dayalı bir apoptik eşik değerinin varlığını rapor etmişlerdir. Bu eşik altında P53 ekspresyon seviyelerinin hücre siklusunu durdurmaya

başlatmak için yeterli fakat apoptozu başlatmaya yeterli olmadığını birçok hücre hattı ile göstermişlerdir. Ayrıca antiapoptik Bcl-2 ailesi protein inhibitörleri ile bu apoptik eşğin azaltılması hücreleri P53 kaynaklı apoptoza karşı daha duyarlı hale getirir [70]. Çalışmalarımızda hücre siklusu olduğu kadar hedeflenen gen ekspresyonlarına ait hücrel protein düzeylerini değerlendiremedik. Çalışma boyutlarını tabii olarak ekonomik açıdan daha üst düzeylere çıkaracak bu çalışmaların sonuçlarına da sahip olsaydık muhtemel olarak bu değişimin kurduğumuz modeldeki nedenine tam ulaşabilecektik. Bununla beraber çalışmamızda, bu literatür verileri ile de beklenildiği üzere 24 saat BÇE inkübasyonu sonucunda gen ekspresyonlarında görüldüğü gibi istatistiksel olarak düşük Bcl-2 gösteren hücreler, istatistiksel olarak da düşük P53 ekspresyon seviyesi gösterdiler (Şekil 4.6).

Apoptoz iki yoldan aktive olabilir ve bu olay pek çok gen tarafından kontrol edilir. Bcl-2 ailesi genleri apoptozisin içsel yolağında görev alırlar. Bcl-2 gen ailesinin üyelerinden biri olan Bax bir apoptozis regülatörüdür ve Bcl-2'ye benzeyen protein 4 olarak da bilinir. Bax, Bcl-2 ile heterodimerler oluşturur ve apoptik aktivatör olarak fonksiyon yapar. 24 saatlik BÇE uyguladığımız ortamlarda apoptik uyarımın bir belirteci olarak Bax geninde de konsantrasyona bağımlı olarak önemli artışlar gözledik (40k dilüsyon %70 ve 20k dilüsyon %100) (Şekil-4.6E). Bcl-2 ve Bax genlerindeki bu değerler BÇE'nin apoptozis indüksiyonunu mitokondriyal yolak ile gerçekleştirdiğini ifade etmektedir. Verilerimizi destekleyerek gen değişimlerini inceleyerek yapılmış başka bir çalışmada da BÇE uygulanmış MCF-7 hücrelerinde Bax gen ekspresyonu arttığı gözlenmiştir [6].

Bcl-2 normalde aktif formda mitokondri membranının dışında bulunur ve mitokondriyal membranda porların geçirgenliğini inhibe ederek Sitokrom-c'nin mitokondri dışına çıkışını engeller. Bax geni ise porların geçirgenliğini değiştirerek Sitokrom-c'nin sitozole geçişini sağlar. Sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınımı apoptoz için geri dönülmez bir aşamadır. Bax/Bcl-2 oranındaki artış ile mitokondriyal yolağa bağılı başlayan apoptozu işaret eden verilerimiz Sitokrom-c'nin artan gen ekspresyon sonuçları (40k dilüe 1.30 kat, 20k dilüe 3,69 kat) ile desteklenmiştir (Şekil 4.7.D). Sitoplazmada konsantrasyonu artan Sitokrom-c, Apaf-1'e bağlanıp apoptozom kompleksinin oluşmasına olanak sağlar. Çalışmalarımızda da aynı yönde olmak üzere Apaf-1 gen ifadesi hem 24 saat hem de 48 saat BÇE ile inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde

artış ile sonuçlanmıştır (Şekil 4.6.E ve Şekil 4.7.E). Bu bize BÇE ile inkübe edilmiş MCF-7 hücre hattında apoptozu başlatarak onları ölüm yolunda sürüklediğini göstermektedir.

Çalışmamızın en değerli bölümü ise Kaspaz-3 gen ekspresyonlarına BÇE ile 48 saat inkübasyon ile aldığımız sonuçlar teşkil etmektedir. Deney sonrası yaptığımız literatür taraması MCF-7 hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara rezistans olmasının nedeninin taşıdığı farklı Kaspaz-3 izoformundan kaynaklandığını tespit ettik [71]. MCF-7 çok az düzeyde tam Kaspaz-3 formu olmak üzere genel olarak kısaltılmış Kaspaz-3 izoformuna sahip bir meme kanser hücre dizisidir. MCF-7 hücrelerinde Kaspaz-3'ün yer alamadığı apoptoz mekanizmasında ise sıra ile Kaspaz 9, 7 ve 6'nın aktivasyonları ile gerçekleşmektedir [72]. Doğal tip Kaspaz-3 geni aktarılması MCF-7 hücrelerinin kemoterapötik ilaç dayanıklılığını kırmaktadır. Çalışmalarımızda ise iki gün BÇE ile inkübe edilen ortamlarda MCF-7 hücrelerinin Kaspaz-3 ifadelerinde artışlar tespit ettik. 40k BÇE dilüsyonunda bu artış %36 iken 20k dilüsyonda bu artışın miktarı %100 idi ($p<0.05$) (Şekil 4.7). BÇE ile artan bu Kaspaz-3 formunun hangisi olduğunu bilmiyoruz. Fakat BÇE eğer kısaltılmış olmayan doğal form Kaspaz 3'ün artışını sağlayacak bir fonksiyona sahipse, bu BÇE ekstraktının ve/veya bileşenlerinin kemorezistansın önlenmesi açısından önemli bir çalışma hedefi olmasını sağlayacaktır.

BÇE hem literatürdeki yeri ve hem de *in vitro* insan meme kanser modeli olan MCF-7 hücre dizisi üzerinde yaptığımız çalışmalarda gösterdiği antiproliferatif ve apoptotik özellikleri nedeni ile kendisini meme kanseri tedavisine hedefli olarak hem daha moleküler *in vitro* ve hem de *in vivo* çalışmalara aday olarak sergilemektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res.* 2004;6(6):229-39. Epub 2004 Aug 26.
- [2] Aydinler A, Topuz E. *Meme kanseri tanı tedavi takip*. Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul 2007.
- [3] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
- [4] Kulkarni SD, Tilak JC, Acharya R, Rajurkar NS, Devasagayam TP, Reddy AV. Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) as a function of growth under different conditions. *Phytother Res.* 2006 Mar;20(3):218-27.
- [5] Hänninen O, Rauma AL, Kaartinen K, Nenonen M. Vegan diet in physiological health promotion. *Acta Physiol Hung.* 1999;86(3-4):171-80.
- [6] Hussain A, Gheewala TM, Vas AJ, Shah K, Goala P, Khan S, Hinduja S, Sharma C. Growth inhibitory and adjuvant therapeutic potential of aqueous extract of *Triticum aestivum* on MCF-7 and HeLa cells. *Exp Oncol.* 2014 Mar;36(1):9-16.
- [7] Bal DG, Foerster SB, Backman DR, Lyman DO. Dietary change and cancer: challenges and future direction. *J Nutr.* 2001 Jan;131(1):181S-185S.
- [8] Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 2003 Oct;3(10):768-80.
- [9] Tan AC, Konczak I, Sze DM, Ramzan I. Molecular pathways for cancer chemoprevention by dietary phytochemicals. *Nutr Cancer.* 2011;63(4):495-505.
- [10] Michaud-Levesque J, Bousquet-Gagnon N, Béliveau R. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. *Exp Cell Res.* 2012 May 1;318(8):925-35.
- [11] Jayaprakasam B, Vanisree M, Zhang Y, Dewitt DL, Nair MG. Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. *J Agric Food Chem* 2006;54(15):5375–5381.
- [12] Mi Y, Zhang C, Li CM, Tanedac S, Watanabea G, Suzukic AK, Tayaa K. Quercetin protects embryonic chicken spermatogonial cells from oxidative damage intoxicated with 3-methyl-4-nitrophenol in primary culture. *Toxicology Letters*, 2009;190:61–65.
- [13] Cao X, Liu M, Tuo J, Shen D, Chan CC. The effects of quercetin in cultured human RPE cells under oxidative stress and in Ccl2/Cx3cr1 double deficient mice. *Exp Eye Res.* 2010 Jul;91(1):15-25.
- [14] Li X, Shang L, Wu Y, Abbas S, Li D, Netter P, Ouzzine M, Wang H, Magdalou J. Identification of the human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of the phytochemical ferulic acid. *Drug Metab Pharmacokinet* 2011;26(4):341-350.
- [15] Kocabaş N. Homosisteinin indüklediği oksidatif stres üzerinde quercetin'in koruyucu etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya A.B.D. Afyonkarahisar, 2008.

- [16] Menendez JA, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Analyzing effects of extra- virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *Int J Mol Med* 2008;22(4):33-439.
- [17] DeSantis C, Jemal A, Ward E, Thun MJ. Temporal trends in breast cancer mortality by state and race. *Cancer Causes Control*. 2008 Jun;19(5):537-45
- [18] Aslan G. Tümör immünolojisi. *Turkish Journal of Immunology*, 2010;15:7-13.
- [19] Dilsiz, N. *Moleküler Biyoloji*, Palme yayıncılık 2. Baskı Ankara 2009.
- [20] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
- [21] B. Keskinliç, M. Gültekin, A. Serdar Karaca, C. Öztürk, G. Boztaş, M. Zayıfoğlu Karaca, E. Şimşek Utku, E. Hacıkamiloğlu, H. Turan İsmet Dede, S. Dündar. *Türkiye Kanser Kontrol Programı* T.C. Sağlık Bakanlığı Yayın No: 1. Ankara 2015.
- [22] Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, Steliarova Foucher E, Swaminathan R, Ferlay J, editors (2014). *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X*. IARC Scientific Publication No. 164. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- [23] Karolina Holm, Genetic and Epigenetic Characterisation of Breast Tumours. Division of Oncology, Department of Clinical Sciences, Lund Lund University, Sweden 2011 ISBN 978-91-86871-01-7 ISSN 1652-8220.
- [24] Manjer, J., et al., Breast cancer incidence in relation to smoking cessation. *Breast Cancer Res Treat*, 2000. 61(2): p. 121-9.
- [25] Tannock, I. F., Hill, R. P. 1992. *The Basics Science of Oncology*. 2nd Ed. New York.
- [26] Bonadona V, Sinilnikova OM, Chopin S, Antoniou AC, Mignotte H, Mathevet P, Brémond A, Martin A, Bobin JY, Romestaing P, Raudrant D, Rudigoz RC, Léoné M, Chauvin F, Easton DF, Lenoir GM, Lasset C. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations to the incidence of breast cancer in young women: results from a prospective population-based study in France. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 Aug;43(4):404-13.
- [27] Karakuş E. Östrojen-bağımlı meme kanseri ve sodyum-bağımlı organik anyon taşıyıcı. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2010;5:155-166.
- [28] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):342-8.
- [29] MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep*. 2004 Jul;5(7):674-8.
- [30] Tsujimoto Y, Regulation of apoptosis by the Bcl-2 family of proteins. In *Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death* ed. Jacobson MD, McCarthy N, Oxford University Press (OUP) 2002; pp136-160.
- [31] Barr PJ, Tomei LD. Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (N Y)*. 1994 May;12(5):487-93.
- [32] Cho S, Hahm JH, Hong YS. Analysis of p53 and BAX mutations, loss of heterozygosity, p53 and BCL2 expression and apoptosis in basal cell carcinoma in Korean patients. *Br J Dermatol*. 2001 Apr;144(4):841-8.

- [33] Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.* 2003 Jul-Sep;7(3):249-57.
- [34] Roy N, Cardone MH, Thecaspases: consequential cleavage. In *Apoptosis: the molecular biology of program medcelldeathed.* Jacobson MD, McCarthy N, Oxford UniversityPress (OUP) 2002;pp93-135.
- [35] Thompson LU. Antioxidants and hormone-mediated health benefits of whole grains. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1994;34(5-6):473-97.
- [36] Jacobs DR Jr, Meyer KA, Kushi LH, Folsom AR. Whole-grain intake may reduce the risk of ischemic heart disease death in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Am J Clin Nutr.* 1998 Aug;68(2):248-57.
- [37] Jacobs DR Jr, Andersen LF, Blomhoff R. Whole-grain consumption is associated with a reduced risk of noncardiovascular, noncancer death attributed to inflammatory diseases in the Iowa Women's Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2007 Jun;85(6):1606-14.
- [38] Meyer KA, Kushi LH, Jacobs DR Jr, Slavin J, Sellers TA, Folsom AR. Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women. *Am J Clin Nutr.* 2000 Apr;71(4):921-30.
- [39] Nicodemus KK, Jacobs DR Jr, Folsom AR. Whole and refined grain intake and risk of incident postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer Causes Control.* 2001 Dec;12(10):917-25.
- [40] Lai CN, Dabney BJ, Shaw CR. Inhibition of in vitrometabolic activation of carcinogens by wheatsprout extracts. *Nutr Cancer* 1978;1:27-30.
- [41] Ben-Arye E, Goldin E, Wengrower D, Stamper A, Kohn R, Berry E. Wheatgrass extract Juice in the Treatment of Active Distal Ulcerative Colitis: A Randomized Double-blind Placebo-controlled Trial. 2002;37(4): 444-9.
- [42] Nenonen MT, Helve TA, Rauma AL, Hänninen OO. Uncooked, lactobacilli-rich, vegan food and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1998 Mar;37(3):274-81.
- [43] Marawaha RK, Bansal D, Kaur S, Trehan A. Wheat grass juice reduces transfusion requirement in patients with thalassemia major: a pilot study. *Indian Pediatr.* 2004 Jul;41(7):716-20.
- [44] Padalia S, Drabu S, Raheja I, Gupta A, Dhamija M. Multitude potential of wheatgrass juice (Green Blood): An overview. *Chron Young Sci* 2010;1:23-8.
- [45] Das A, Raychaudhuri U, Chakraborty R. Effect of freeze drying and oven drying on antioxidant properties of fresh wheatgrass. *Int J Food Sci Nutr.* 2012 Sep;63(6):718-21.
- [46] Lai CN. Chlorophyll: the active factor in wheatsprout extracts inhibiting the metabolic activation of carcinogens in vitro. *Nutr Cancer*1979;1:19-21.
- [47] Fernandes CJ, O'Donovan DJ. Natural antioxidant therapy for patients with hemolytic anemia. *Indian Pediatr.* 2005 Jun;42(6):618-20.
- [48] Calzuola I, Marsili V, Gianfranceschi GL. Synthesis of antioxidants in wheat sprouts. *J Agric Food Chem.* 2004 Aug 11;52(16):5201-6.
- [49] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003 Jan;91 Spec No:179-94.
- [50] Falcioni G, Fedeli D, Tiano L, Calzuola I, Mancinelli L, Marsili V, Gianfranceschi G. Antioxidant activity of wheatsprouts extracts in vitro: Inhibition of DNA oxidative damage. *J Food Sci* 2002;67:2918-22.

- [51] Shyam R, Singh SN, Vats P, Singh VK, Bajaj R, Singh SB, Banerjee PK. Wheat grass supplementation decreases oxidative stress in healthy subjects: a comparative study with spirulina. *J Altern Complement Med*. 2007 Oct;13(8):789-91.
- [52] AYDOS, Oya Sena; AVCI, Aslıhan; ÖZKAN, Tülin; KARADAĞ, Aynur; GÜRLEYİK, Ebru; ALTINOK, Buket; SUNGUROĞLU, Asuman Antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) extract on CML (K562) cell line *Turkish Journal of Medical Sciences*; Aug 2011;41(4):657-663.
- [53] <http://www.altinbasaktohum.com.tr/tohum/aldane/>
- [54] Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., The water culture method for growing plants without soil, *Circular California Agricultural Experiment Station*. 347, 461 (1938).
- [55] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61: 69-90.
- [56] Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev*. 2008 Oct-Dec;1(1):15-24.
- [57] Türk G. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2013, 17: 73-92.
- [58] Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci*. 2003 Jan;94(1):15-21.
- [59] Sunguroğlu, A., Karadağ, A., Özkan, T., Altinok, B., Aydos, S., Antiproliferative and apoptotic effects of wheatgrass extracts on chronic myeloid leukemia (CML) cellline. *PlantaMed* 2007; 73: 991-3.
- [60] Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer*. 1994;30A(14):2068-73.
- [61] Sutherland RL, Hall RE, Taylor IW. Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells. *Cancer Res*. 1983 Sep;43(9):3998-4006.
- [62] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
- [63] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992 Nov;119(3):493-501.
- [64] Messam CA, Pittman RN. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. *Exp Cell Res*. 1998 Feb 1;238(2):389-98.
- [65] Avgustinova A, Irvani M, Robertson D, Fearn A, Gao Q, Klingbeil P, Hanby AM, Speirs V, Sahai E, Calvo F, Isacke CM. Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nat Commun*. 2016 Jan 18;7:10305.
- [66] Brynczka C, Merrick BA. The p53 transcriptional target gene wnt7b contributes to NGF-inducible neurite outgrowth in neuronal PC12 cells. *Differentiation*. 2008 Sep;76(7):795-808.
- [67] Gartel AL, Feliciano C, Tyner AL. A new method for determining the status of p53 in tumor cell lines of different origin. *Oncol Res*. 2003;13(6-10):405-8.
- [68] Marine JC, Dyer MA, Jochemsen AG. MDMX: from bench to bedside. *J. Cell Sci*. 2007 Feb 1;120(Pt 3):371-8.

- [69] Hu B, Gilkes DM, Farooqi B, Sebti SM, Chen J. MDMX over expression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor. Nutlin. *J BiolChem*. 2006 Nov 3;281(44):33030-5.
- [70] Kracikova M, Akiri G, George A, Sachidanandam R, Aaronson SA. A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2013 Apr;20(4):576-88.
- [71] Mehta K, Devarajan E, Chen J, Multani A, Pathak S. Multidrug-resistant MCF-7 cells: an identity crisis? *J Natl Cancer Inst*. 2002 Nov 6;94(21):1652-4.
- [72] Ye Liang, Chaohua Yan, Nina F Schor Apoptosis in the absence of caspase 3 *Oncogene*. 2001 4 Oct; 20(45): 6570-6578.