

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİN HAMSTER OVERİ HÜCRE HATTINDA DOKSORUBİSİN İLE
BİRLİKTE EPİGALLOKATEŞİN GALLAT, ROSMARİNİK ASİT
UYGULANMASIYLA RAPAMİSİN MEMELİ HEDEFİ PROTEİN
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sinem HELVACIOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Ocak, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİN HAMSTER OVERİ HÜCRE HATTINDA DOKSORUBİSİN İLE
BİRLİKTE EPİGALLOKATEŞİN GALLAT, ROSMARİNİK ASİT
UYGULANMASIYLA RAPAMİSİN MEMELİ HEDEFİ PROTEİN
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sinem HELVACIOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 16.01.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr.Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Muhammed HAMİTOĞLU, Üye
Yeditepe Üniversitesi

Danışmanım Dr.Öğr.Üyesi Şenay VURAL KORKUT sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Çin Hamster Overi Hücre Hattında Doksorubisin ile birlikte Epigallokateşin gallat, Rosmarinik Asit Uygulanmasıyla Rapamisin Memeli Hedefi Protein Düzeylerinin Araştırılması başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Sinem HELVACIOĞLU

İmza

Aileme
ve
sevdiklerime

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında günümüzde kanser hastaları tarafından kullanılan bir ilaç olan Doksorubisin'in sitotoksitesitesi ve Rapamisin memeli hedefi protein düzeyi araştırılırken iki bitkisel fenolik birleşik olan Rosmarinik asit ve Epigallokateşin gallat'ın bu parametreler üzerindeki etkileri incelenmek istenmiştir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, bilgi ve yardımlarını benimle paylaşan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve olumlu bakış açısıyla beni daha çok çalışmaya yönlendiren saygıdeğer danışman hocam; Dr. Öğr. Üyesi Şenay VURAL KORKUT'a, çalışmam boyunca bir an olsun yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Muhammed HAMİTOĞLU'na, çalışmalarına yardım eden, sorunlarıma çözüm bulmaya çalışan sevgili Doç. Dr. Aylin Yaba UÇAR'a ve her zaman bana destek olan bu hayattaki en büyük şansım olan aileme, sorunlarımı sıkılmadan dinleyen arkadaşım Selin AKYÜZ'e ve yaşadığım tüm zorlukları benimle göğüslemeye ant içmiş, beni her zaman yüreklendiren, sevgi dolu ARAS AKYÜZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sinem HELVACIOĞLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	6
1.3 Hipotez.....	6
2 KANSER	8
2.1 Kanserde Tedavi.....	11
2.1.1 Anti-tümör Antibiyotikler.....	9
2.1.2 Doksorubisin.....	10
2.2 Doksorubisin ile Tedavi.....	11
2.3 Doksorubisin Etki Mekanizması.....	13
2.4 Doksorubisin Direnç Gelişimi.....	15
2.5 Doksorubisin Toksisitesi.....	17
2.5.1 Kalp Toksisitesi.....	19
2.5.2 Beyin Toksisitesi.....	19
2.5.3 Karaciğer Toksisitesi.....	20
2.5.4 Böbrek Toksisitesi	20
3 ROSMARİNİK ASİT	19
4 EPİGALLOKATEŞİN GALLAT	27
5 SİTOTOKSİSİTE ve SİTOTOKSİSİTE BELİRLEME YÖNTEMLERİ	27
5.1 Metabolik Aktivitenin Ölçülmesine Dayalı Yöntemler	27
5.1.1 3-(4,5-dimetiltiyazol- 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) Canlılık Testi.....	28

5.1.2 (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disulfonat) (WST-1) Canlılık Testi.....	29
5.2 Membran Geçirgenliğinin Ölçülmesine Dayalı Yöntemler	30
5.3 Morfolojik Değişikliğin Mikroskopik Olarak Gözlemlenmesi.....	30
5.4 Alamar Mavisi Yöntemi	30
5.5 Sülforodamin B (SRB) Yöntemi.....	31
5.6 Laktat Dehidrojenaz (LDH) Yöntemi	31
6 mTOR ve SİNYAL YOLAĞI	32
6.1 Sinyal Yolağı.....	33
7 WESTERN BLOT	37
8 MATERYAL ve METOT	39
8.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	39
8.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	41
8.3 Kullanılan Sarf Malzemeler.....	42
9 YÖNTEM	43
9.1 Hücre Hattı.....	43
9.1.2 Hücre Kültürü	43
9.1.3 Hücrelerin Çoğaltılması	44
9.1.4 Hücre Kültürünün Pasajlanması.....	45
9.1.5 Hücrelerin Dondurulması	45
9.2 Numunelerin hazırlaması.....	46
9.3 WST-1 Testi.....	46
9.4 Hücre Lizatlarının Hazırlanması.....	48
9.5 Western Blot Analizi.....	48
9.6 İstatistiksel Analizler.....	51
10 SONUÇ ve ÖNERİLER	52
10.1 Sitotoksisite Sonuçları.....	52
10.1.1 CHO hücrelerine DOKS uygulanması	52
10.1.2 CHO hücrelerine EGCG uygulanması.....	53
10.1.3 CHO hücrelerine RA uygulanması	54
10.1.4 CHO hücrelerine DOKS, RA, EGCG ve kombinlerinin uygulanması.....	55
10.2 Western Blot Analizi ile mTOR Aktivasyonunun Değerlendirilmesi	56

10.2.1 DOKS Doz-Cevap Sonuçları.....	57
10.2.2 DOKS ve RA Doz-Cevap Sonuçları	58
10.2.3 DOKS ve EGCG Doz-Cevap Sonuçları.....	60
KAYNAKÇA	67
TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR	77

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikadaki dönme sayısı
g	Gram
kD	Kilodalton
Kg	Kilogram
l	Litre
m ²	Metre kare
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
Kbapp	Nükleotid başına bağlanma alanları
°C	Santigrat
cm ²	Santimetre kare

KISALTMA LİSTESİ

4E-BP14E	Bağlanma Proteini 1
ABC	ATP bağımlı taşıyıcı
ATP	Adenozin Trifosfatına
BCL2	B-Hücreli Lenfoma 2
BCRP	Meme Kanseri Direnç Proteini
BT-474	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
CHO	Çin Hamster Overi Hücresi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DOKS	Doksorubisin
dPBS	Dulbecco's Fosfat Buffer Salın
DU-145	İnsan, Prostat Karsinomu
EC	Epikateşin
ECG	Epikateşin Gallat
EGC	Epigallokateşin
EGCG	Epigallokateşin gallat
eIF4E	Ökaryotik Başlatma Faktörü 4E
FBS	Fetal Bovin Serum
FemX	İnsan Melanomu Hücresi
GSH	Glutatyon
GST	Glutatyon-S-Transferaz
GST	Glutatyon-S-Transferaz
HeLa	İnsan Serviks Adenokarsinomu Hücresi
Hep- 3B	İnsan, Siyah, Karaciğer Karsinomu
HT-29	Kolon Kanseri Hücre Hattı
IC50	Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
K-562	İnsan Kronik Miyeloid Lösemi
K562	İnsan Kronik Miyeloid Lösemi Hücreleri
LDH	Laktat Dehidrojenaz
LRP	Akciğer Direnç Proteinleri
MAPK	Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz
MCF-7	İnsan Meme Adenokarsinomu
MCF-7	İnsan, Meme Adenokarsinomu
MDA-MB 436	Meme Kanseri Hücre Hattı
MDA-MB-231	İnsan, Meme Adenokarsinomu
MDR-1	Çoklu ilaç direnci multi-drug resistance protein
MRNA	Mesajcı RNA
MRP	Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein ailesi
mTOR	Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
mTORC1	mTOR kompleks 1
mTORC2	mTOR kompleks 2
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol- 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
NCI	Ulusal Kanseri Enstitüsü
NCI-H82	İnsan, Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu

P-gp	P-glikoprotein
PANC-1	Pankreas Kanseri Hücre Hattı
PC-3	İnsan Prostat Adenokarsinomu
PC-3	Prostat Kanseri Hücre Hattı
PI3K/AKT	Kinaz Fosfatidilinositol 3-kinaz/Akt
PKC	Protein Kinaz C Ailesi
RA	Rosmarinik asit
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon Analiz Tamponu
RNA	Ribonükleik Asit
RNS	Reaktif Azot Türleri
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
S6K1p70	Ribozomal S6 Kinaz 1
SKOV3	İnsan Overi Hücreleri
SRB	Sülförödamine B
WB	Western Blotlama
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WST-1	(4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disulfonat)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Doksorubisin'in moleküler yapısı.....	11
Şekil 3.1	Rosmarinik asit'in kimyasal yapısı.....	21
Şekil 4.1	Epigallokateşin gallat'ın kimyasal yapısı	24
Şekil 6.1	Aktive olmuş PI3K/Akt/mTOR yolağı ve etkileri	33
Şekil 6.2	mTOR Aktivasyon yolakları ve cevapları.....	34
Şekil 10.1	24, 48 ve 72 saat DOKS maruziyeti sonucunda % canlılık değerleri	52
Şekil 10.2	24, 48 ve 72 saat EGCG maruziyeti sonucunda % canlılık değerleri.	53
Şekil 10.3	24, 48 ve 72 saat RA maruziyeti sonucunda % canlılık değerleri	54
Şekil 10.4	24 saat maruziyet sonucunda DOKS,RA,EGCG ve kombinlerinin % canlılık değerleri.....	57
Şekil 10.5	24 saat DOKS uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile mTOR ifade düzeyi	57
Şekil 10.6	24 saat DOKS uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile β -Aktin ifade düzeyi	55
Şekil 10.7	mTOR protein ifadesinin mTOR/ β -Aktin olarak ifade edilmesi	58
Şekil 10.8	24 saat DOKS ve RA uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile mTOR ifade düzeyi.....	58
Şekil 10.9	24 saat DOKS ve RA uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile β -Aktin ifade düzeyi	59
Şekil 10.10	mTOR protein ifadesinin mTOR/ β -Aktin olarak ifade edilmesi.....	59
Şekil 10.11	24 saat DOKS ve EGCG uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile mTOR ifade düzeyi.....	60
Şekil 10.12	24 saat DOKS ve EGCG uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile β -Aktin ifade düzeyi	60
Şekil 10.13	mTOR protein ifadesinin mTOR/ β -Aktin olarak ifade edilmesi	61

TABLO LİSTESİ

Tablo 6.1	mTORC1 ve mTORC2 komplekslerinin özellikleri.....	322
Tablo 10.1	24, 48 ve 72 saat 125-2000 nM konsantrasyon aralığında DOKS maruziyeti yapılan CHO hücrelerinde WST1 testi % canlılık ve standart sapma değerleri.....	53
Tablo 10.2	24, 48 ve 72 saat 25-400 µM konsantrasyon aralığında EGCG maruziyeti yapılan CHO hücrelerinde WST1 testi % canlılık ve standart sapma değerleri.....	544
Tablo 10.3	24, 48 ve 72 saat 0.0625-1 mM konsantrasyon aralığında RA maruziyeti yapılan CHO hücrelerinde WST1 testi % canlılık ve standart sapma değerleri.....	55

Çin Hamster Overi Hücre Hattında Doksorubisin ile Birlikte Epigallokateşin Gallat, Rosmarinik Asit Uygulanmasıyla Rapamisin Memeli Hedefi Protein Düzeylerinin Araştırılması

Sinem HELVACIOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Şenay VURAL KORKUT

Doksorubisin en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. Sitotoksik özelliğinden dolayı kanser hücrelerinde etkilidir. Fakat sadece kanser hücrelerini etkilemeyip normal sağlıklı hücreler üzerinde de istenmeyen etkilere sahiptir. Rosmarinik asit, fenolik bir bileşiktir. Kafeik asit ve 3,4-dihidroksifennillaktik asidin esteridir. Rosmarinik asit, antioksidan ve antienflamatuar etkilere sahiptir. Rosmarinik asit tek başına veya diğer antioksidanlarla, esansiyel yağ asidi takviyeleri ve diğer bitki türevi ürünlerle birlikte kullanılmaktadır. Bir başka fenolik bileşik olan epigallokateşin gallat, çay yapraklarında en bol bulunan kateşin ve güçlü antioksidandır. Epigallokateşin gallat birçok diyet takviyesinde kullanılır. Hem Epigallokateşin gallat hem de Rosmarinik asit fenolik bileşikler olsalar da, farklı kimyasal sınıflara aittirler. Epigallokateşin gallat, gallik asit ile esterleştirilmiş flavan-3-ol yapısında olan tanindir. Rosmarinik asit bir fenolik asittir. Rapamisin memeli hedefi, büyüme faktörleri, besin mevcudiyeti ve immün-düzenleyici sinyaller gibi çeşitli çevresel faktörlere cevaben hücresel büyüme ve proliferasyonu indükleyip, değiştirir.

Bu çalışmanın amacı, öncelikle Çin Hamsteri Yumurtalık hücre hattında Doksorubisin'in, Epigallokateşin gallat'ın ve Rosmarinik asit'in sitotoksitesini

hücre canlılığı için etkin olarak kullanılan WST-1 testiyle değerlendirmek ve daha sonra Western blotlama yöntemiyle Rapamisin memeli hedefi protein düzeylerinin araştırılmasıdır. 24 saat, 48 saat ve 72 saat süre ile inkübe edilen CHO hücrelerinde Rosmarinik asit, Epigallokateşin gallat ve Doksorubisin için IC50 değerleri hesaplandı. Epigallokateşin'in IC50 değerleri 24 saat için 299.512 μ M, 48 saat için 276.694 μ M ve 72 saat için 267,511 μ M olarak bulunmuştur. Rosmarinik asit 0.0625-1 mM konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca hücrelere uygulanmıştır. Rosmarinik asit, uygulanan yüksek dozlara rağmen hücre canlılığında azalmaya neden olmamıştır. Bu yüzden IC50 hesaplanamamıştır. Doksorubisin'in IC50 değeri 24 saat için 696.817 nM, 48 saat için 467 nM ve 72 saat maruz bırakılınca 131.008 nM olarak bulunmuştur. Doksorubisin'in neden olduğu sitotoksositeye karşı Rosmarinik asit'in koruyucu etkisinin daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre seçilen dozlar ile Western blot yapıldığında Doksorubisin uygulanan grupta 250 nM'dan 2000 nM doza kadar Rapamisin memeli hedefi protein seviyesi azalmıştır. Rosmarinik asit ve Epigallokateşin gallat uygulanan gruplarda da protein seviyesi kontrol grubuna kıyasla azalma göstermiştir. Bu azalmanın nedeninin oksidatif strese bağlı olduğu düşünülmektedir.

Mekanizmanın tam olarak aydınlatılması için farklı yöntemlerle *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, Rosmarinik asit, Epigallokateşin gallat, western blot, sitotoksosite

ABSTRACT

Investigation of Rapamicine Mammalian Target Protein Levels in the Chinese Hamster Ovary Cell Line with Application of Epigallocatechin Gallat, Rosmarinic Acid and Doxorubicin

Sinem HELVACIOĞLU

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Doxorubicin is commonly used chemotherapeutic agents. It is effective in cancer cells due to its cytotoxic properties. However, it not only affects cancer cells but also has undesirable effects on normal healthy cells. Rosmarinic acid is a member of many Lamiaceae families including caffeic acid ester and Rosmarinus officinalis. Rosmarinic acid has antioxidant and anti-inflammatory effects. Rosmarinic acid can be used alone or in combination with other antioxidants and other plant-derived products. Epigallocatechin gallate, another phenolic compound, is the most abundant catechin and strong antioxidant in tea leaves. Epigallocatechin gallate is used in many dietary supplements. Although both Epigallocatechin gallate and Rosmarinic acid are phenolic compounds, they belong to different chemical classes. Epigallocatechin gallate is a tannin of flavan-3-ol esterified with gallic acid. Rosmarinic acid is a phenolic acid. Rapamycin mammalian target induces and alters cellular growth and proliferation in response to a variety of environmental factors such as, growth factors, nutrient availability, and immunoregulatory signals.

The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of Doxorubicin, Epigallocatechin gallate and Rosmarinic acid in the Chinese Hamster Ovary cell line with the WST-1 assay, which is effectively used for cell viability, and the second aim

is to investigate the mammalian target protein levels by Western blotting. IC50 values for Rosmarinic acid, Epigallocatechin gallate and Doxorubicin were calculated in CHO cells incubated for 24 hours, 48 hours and 72 hours. IC50 values of epigallocatechin were 299.512 μ M for 24 hours, 276.694 μ M for 48 hours and 267,511 μ M for 72 hours. Rosmarinic acid was applied to the cells at concentrations of 0.0625-1 mM for 24, 48 and 72 hours. Rosmarinic acid did not cause a decrease in cell viability despite high doses. Therefore, IC50 could not be calculated. The IC50 value of Doxorubicin was found to be 696.817 nM for 24 hours, 467 nM for 48 hours and 131.008 nM when exposed to 72 hours. It has been found that Rosmarinic acid has a higher protective effect against cytotoxicity caused by Doxorubicin. According to these results, Western blot was performed with selected doses, Rapamycin mammalian target protein level decreased from 250 nM to 2000 nM doses in Doxorubicin treated group. In the groups treated with Rosmarinic acid and Epigallocatechin gallate, the protein level decreased compared to the control group. This reduction is thought to be due to oxidative stress.

In vitro and *in vivo* studies with different methods should be performed to fully clarify the mechanism.

Keywords: Doxorubicin, Rosmarinic acid, Epigallocatechin gallate, western blot, cytotoxicity

1.1 Literatür Özeti

Rosmarinik asit, ilk kez biberiye (*Rosmarinus officinalis*) bitikisinden izole edilmiştir. *Lamiaceae* familyasının çeşitli bitkilerinde doğal olarak oluşan fenolik bileşiktir. Bu familya da yer alan adaçayı (*Salvia officinalis*) ve İspanyol adaçayı (*Salvia lavandulifolia*), fesleğen (*Ocimum tenuiflorum*), kekik (*Origanum vulgare*), mercanköşk (*Origanum majorana*) ve limon otu (*Melissa officinalis*) bitkilerinde de bulunmaktadır. Rosmarinik asit (RA); antioksidan, antienflamatuar ve antimikrobiyal aktivitelere sahiptir. Yapılan araştırmalar, RA'nın antioksidan aktivitesinin, E vitaminden daha güçlü olduğunu göstermiştir. RA, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını önlemeye yardımcı olarak kanser ve ateroskleroz riskini azaltmaktadır. RA, anti-enflamatuar özelliklere sahiptir [1,2]. Çalışmada yer alan diğer bitkisel bileşik Epigallokateşin gallat, yeşil ve siyah çay (*Camellia sinensis*) gibi birçok bitkide bulunan bir fenolik antioksidandır. Hücresel oksidasyonu inhibe eder ve hücrelere serbest radikallerin zarar vermesini önler. Potansiyel bir kanser kemopreventif madde olarak incelenmektedir. Aynı zamanda epigallokateşin-3-gallat olarak da bilinen epigallokateşin gallat (EGCG), epigallokateşin ve gallik asidin esteridir ve bir kateşin türüdür. Güçlü antioksidan, antienflamatuar ve antikarsinojenik özelliklere sahiptir. Yeşil çayda yoğun olmakla birlikte siyah çayda da bulunmaktadır. Kızılcık, çilek, böğürtlen ve elma gibi meyvelerde ayrıca ceviz, fındık ve antep fıstığı gibi kuruyemişlerde de bulunmaktadır [3].

Doksorubisin (DOKS), antrasiklin sınıfında yer alan geniş spektrumlu bir kemoterapötik ajandır. Günümüzde yaygın olarak kullanılır. Çocuk ve yetişkin hastalarda birinci basamak tedavide tercih edilir. Meme, mide, prostat, tiroid, testis, serviks, over, yumuşak doku ve kemik sarkomları gibi çeşitli kanser türlerinde kullanılmaktadır. DOKS'a bağlı yan etkiler genellikle normal hücrelere karşı gösterdiği sitotoksik etkiden kaynaklanmaktadır. Sadece kanser hücrelerine karşı selektif olmadığından sağlıklı hücreler üzerinde de hasar oluşturmaktadır. Bu

yüzden, tedavi sırasında veya sonrasında, birincil tümörlerden farklı olarak ikincil kötü huylu tümörlerde tedaviye bağlı olarak gelişebilmektedir [4]. Bu da tedavide oluşabilecek önemli bir sorunu oluşturmaktadır. DOKS'un ikincil tümör oluşturmada genotoksik etki göstermesi ana etkindir bu etkiyi de ürettiği serbest radikallerin hücreye zarar vermesiyle meydana getirdiği kabul edilmektedir. Bitkisel kimyasallar, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasara karşı korumada, epigenetik değişikliklerde, DNA tamir genlerini ve hücre siklusunu kontrol eden genlerin modülasyonunda, apoptozun uyarılmasında, , tümör hücresinin invazyonunda ve anjiyogenezin engellenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Antioksidan kapasitesi olan doğal bileşiklerin, DOKS'un terapötik etkisini azaltmadan, toksik etkilerinin önlenmesinde veya azaltılmasında ümit verdiği gösterilmiştir [5]. Yapılan bu çalışmada öncelikle RA, EGCG ve DOKS'un tek başına ve kombinasyonlarının 24,48,72 saat süreyle sitotoksiteleri araştırılmıştır. Bu maddeler için daha önce yapılan araştırmalar değerlendirildiğinde, maksimum inhibisyon konsantrasyonları (IC50) farklı hücre hatlarında, farklı zamanlarda uygulanmış ve yer alan çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Bir çalışmada, RA'nın glioblastoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu (24 saat inkübasyondan sonra IC50 değeri 290.5 μ M ve 48 saat sonra IC50 171.3 μ M) olarak verilmiştir. 80-130 μ M konsantrasyonundaki RA, hücre proliferasyonunu baskıladığı ve antioksidan etkiye sahip olduğunu ancak 200 μ M ve daha yüksek RA konsantrasyonlarının pro-oksidant etkiye sahip olduğu ve nekroz yoluyla hücre ölümünü başlattığı bildirilmiştir [6]. Bir diğer çalışmada RA bileşiği, *P. vulgaris* L. ve *Prunella grandiflora* L. türlerinden etanol ekstraktlarından saflaştırılarak elde edilmiştir. *Prunella* L.' den saflaştırılan RA'nın farklı kanser hücreleri üzerinde WST-1 yöntemiyle sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır. Buna göre prostat (PC-3), pankreas (PANC-1), meme (MDA-MB 436) ve kolon (HT-29) kanser hücre hatları ile GBM (T98G) hücre hatları ve lenf dokularında 10-60 ng arasında 24 ve 48 saat süreleri ile sitotoksik doz belirleme çalışmaları yapılmıştır. 48 saat inkübasyon süresinden sonra PC3 hücre hattı için 50 ng ve diğer kullanılan hücre hatlarında 60 ng RA uygulamasının antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiş ve sağlıklı hücre hatlarında RA'nın sitotoksik etkisi gözlenmemiştir [7]. Benzer bir çalışmada dört farklı insan kanser hücre hattında *in vitro* olarak RA'nın sitotoksitesini değerlendirilmiştir. İnsan serviks adenokarsinomu HeLa hücreleri,

insan melanomu FemX hücreleri, insan kronik miyeloid lösemi K562 hücreleri ve insan yumurtalık SKOV3 hücreleri kullanılmıştır. IC50 ($\mu\text{g/ml}$) değerleri HeLa hücreleri için 41.29 ± 1.28 , FemX hücre hattı için 53.24 ± 3.24 , K562 hücrelerinde 29.51 ± 0.72 ve SKOV3 hücre hattında da 59.24 ± 1.06 olarak bulunmuştur [8]. Türkiye’de yapılan araştırmada üç farklı bölgeden *Rosmarinus officinalis* toplanmıştır. Yapraklarından hem metanolik hem de süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile altı farklı ekstrakt ayrıca aktif bileşik olan karnosik asit ve RA çeşitli insan kanser hücre hatlarına uygulanmıştır. Ekstraktlar ve aktif bileşik RA, NCI-H82 (insan, küçük hücreli akciğer karsinomu), DU-145 (insan, prostat karsinomu), Hep- 3B (insan, siyah, karaciğer karsinomu, hepatosellüler), K-562 (insan kronik miyeloid lösemi), MCF-7 (insan meme adenokarsinomu), PC-3 (insan prostat adenokarsinomu) ve MDA-MB-231 (insan, meme adenokarsinomu) MTT deneyi ile sitotoksikite deneyi yapılmıştır. Hücre ölümü açısından sitotoksik etkiler PC-3, DU-145, Hep-3B, MCF-7, K-562 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 6,25 ila 100 $\mu\text{g/ml}$ aralığında değişen dozlarda 48 saat süre uygulanmıştır. RA, 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda % 98 ile 205 arasında değişen değerlerde hücre canlılığı göstermiş neredeyse hiç inhibitör etki göstermemiştir. RA, K-562 hücrelerinde en yüksek etkiye sahip olarak görülmüştür. En yüksek konsantrasyon olan 139 μM (50 $\mu\text{g /ml}$)’de %205 hücre canlılığı sergilemiştir. Diğer test edilen hemen hemen tüm hücre hatlarında sitotoksik aktivite yerine proliferatif etki göstermiştir [9]. Benzer şekilde RA’nın, insan lösemi hücrelerinde hücre canlılığı üzerinde çok az etki gösterdiğini de başka araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [10].

RA’nın sitotoksitesi 0-400 μM doz aralığında 24 saat maruziyet ile sağlıklı hücre hattı Çin hamster overi hücreleri (CHO) ve tümör hücre hatlarında, İnsan meme kanseri hücreleri (BT-474) ve HeLa kullanılarak nötral kırmızı alım yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, RA’nın CHO hücre hattında, önemli sitotoksik etkileri olduğu görülmüştür. Ancak HeLa ve BT-474 kanser hücrelerinde, bu bileşiğin farklı özellik göstererek bu hücrelerde sitotoksik olmadıkları görülmüştür. RA için CHO hücresinde IC50 değeri 150 μM olarak, HeLa ve BT-474 hücre hatlarında IC50 değeri bulunamamıştır [11].

EGCG’nin sitotoksitesini değerlendirmek için literatürde yer alan çalışmalardan birinde kullanılan hücre hatları, ilk olarak çay alımına maruz kalan insan ağız

boşluğu dokuları olduğu düşünülerek bu dokuları oluşturan hücreler kullanılmıştır. Bunun için, dil karsinomu hücresi CAL27, damak karsinomu hücresi HSC-2, S-G diş eti epitel hücresi, HSG1, tükürük bezi karsinom hücresi, HGF-1 normal jinvival fibroblastı, GN56, normal jinvival fibroblastı olmak üzere 6 farklı hücre hattı kullanılmıştır. 72 saat EGCG (0-300 μ M konsantrasyon) maruziyetinden sonra LC50 değerleri bulunmuştur. CAL27'de $45 \pm 0.8 \mu$ M, HSC-2'de $78 \pm 5.6 \mu$ M, S-G için $80 \pm 4.9 \mu$ M, HSG1 için $109 \pm 5.7 \mu$ M, HGF-1'de $246 \pm 17.9 \mu$ M ve GN56 için $171 \pm 15.6 \mu$ M olarak bulunmuştur. 24 saat maruziyette CAL27 0.18 ± 0.02 mM, HSG1 0.42 ± 0.03 mM, GN56 0.44 ± 0.05 mM olmak üzere LC50 bulunmuştur [12]. Başka bir çalışmada, insan kolorektal karsinoma (HT-29) hücreleri, EGCG'nin anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkilerini incelemek için EGCG uygulanmıştır. 36 saatlik maruziyetten sonra EGCG'nin LC50 konsantrasyonu 100 μ M olarak bulunmuştur [13]. EGCG'nin HCT116 kolorektal ve HepG2 hepatoselüler karsinoma hücrelerinin büyümesini önleme kabiliyeti MTT deneyi ile değerlendirilmiştir. MTT deneyinde, EGCG'nin HCT116 hücre hattında LC50 değeri 24 saat sonra 71.3, 72 saatlik maruziyetten sonra LC50 değeri 46.7 μ M olarak bulunmuştur. HepG2 hücresinde IC50 değeri 24 saat sonra 196.4, 72 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 141.6 μ M olarak bulunmuştur [14]. EGCG tarafından konsantrasyona bağlı büyüme inhibisyonu MTT analizi ile değerlendirilmiştir. İnsan kolon adenokarsinomu (HT-29) ve insan meme adenokarsinomu (MCF-7) hücre hatları kullanılmıştır. 48 saat maruziyetten sonra LC50 değerleri, MCF-7 hücreleri için $11.2 \pm 1.4 \mu$ M, HT-29 hücreleri için $136.3 \pm 2.1 \mu$ M bulunmuştur. MTT sonuçları, EGCG'nin, MC-7 hücrelerinde HT-29 hücrelerine kıyasla anlamlı derecede daha yüksek sitotoksositeye neden olduğunu göstermiştir [15]. EGCG, sağlıklı CHO hücre hattına 24 saat süreyle 1mM EGCG uygulandığında hücre canlılığı %42, 0.5mM EGCG uygulandığında hücre canlılığı %72 olarak bulunmuştur [16].

DOKS sitotoksik etkisi olan bir antikanser ilaçtır. Bu yüzden yapılan çalışmalar kanser hücre hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücre hattında gerçekleştirilen bir çalışmada DOKS'un sitotoksik etkisinin saptanması amaçlanmıştır. 72 saat uygulanan dozlar arasında 1.84 μ M dozunda hücre canlılığı %50'nin altına düşmüştür [17]. Diğer bir çalışmada DOKS'un sitotoksitesi pankreas kanser hücrelerinde 48, 72, 96, ve 120 saat maruz bırakılarak

araştırılmıştır. IC50 değeri sırasıyla 2.2, 0.4, 0.28, and 0.22 μ M olarak bulunmuştur. Hücreler DOKS ile inkübasyon süresi arttıkça hücrelerde oluşan hasar artmıştır [18]. DOKS'a duyarlı insan promyelotic HL60 ve HL60 / MX2 hücrelerinde yapıldı. Topoizomeraz II aktivitesi hücrelerde değiştirilmiştir. HL60 ve dayanıklı HL60 / MX2 hücrelerinde MTT testi ile 72 saat DOKS uygulandıktan sonra IC50 değerleri hesaplanmıştır. HL60 hücre hattında IC50 değeri 9.4nM, HL60 / MX2 hücrelerinde 1823nM olarak bulunmuştur [19].

Kanserde önemli olduğu saptanan sinyal iletim yolları arasında PI3K/AKT kinaz (Fosfatidilinositol 3-kinaz/Akt) yolu, protein kinaz C ailesi (PKC) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesi sinyalizasyon zincirleri yer almaktadır. PI3K/AKT sinyal yolağı insan kanser türlerinin gelişiminde aktive olmaktadır. PI3K yolağı bir çok büyüme faktörü ile tetiklenmektedir özellikle epidermal büyüme faktörü bunlardan birini oluşturmaktadır. Ayrıca, çok sayıda önemli sinyal yolağı bileşenlerinin aktif hale gelmesini sağlamaktadır. Bu bileşenlerden Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR), PI3K ile ilişkili protein kinaz ailesine ait bir serin/treonin kinazdır. mTOR hücre büyümesi, proliferasyonu ve metabolizması olmak üzere bir dizi hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde ve homeostazın sağlanmasında rolü oldukça büyüktür. PI3K/AKT/mTOR yolağı, hücre canlılığı ve tümör hücrelerinde proliferasyonun desteklenmesinde önemli bir rol oynar ve yüksek PI3K seviyesi, kanser açısından belirleyicidir. mTOR proteininin mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki tipi vardır. Bunlardan mTORC1, hücre büyümesinde PI3K/AKT sinyalleri veya diğer yolaklardan gelen sinyaller ile aktive edilebilen önemli bir yolaktır. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı hücre transformasyonunda, DNA tamirinde, apoptozun önlenmesinde, hücre proliferasyonunda ve çoklu ilaç direncinde yer alan proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır.

Moleküler mekanizmalarda rolü olması nedeniyle sadece kanser gelişimiyle değil aynı zamanda tedavisinde de önemli bir rol oynamaktadır. EGCG'nin birçok kanser hücre hattı üzerinde ilaç direncini azalttığı ve mTOR ve PI3K'yı inhibe edici özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir [20]. Yapılan bir araştırmada, EGCG'nin, hem PI3K hem de mTOR yolağının inhibitörü olduğunu bildirilmiştir [21]. EGCG'nin kolon kanseri hücrelerinde antineoplastik etki gösterdiği ve bu etkinin, mTOR ve Akt'nin

baskılanmasına paralel olarak AMPK'nin aktivasyonuna bağılı olduğu bildirilmiştir. AMPK aracılığıyla gerçekleşen mTOR inhibisyonu EGCG'nin antikanser aktivitesinde önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır [22]. İnsan kolorektal hücre hattında yapılan araştırmada, RA, MAPK/ERK yolağıyla apoptozu indüklediği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [23]. MAPK/ERK yolağı dolaylı olarak mTOR'u etkilemektedir. Biberiye ekstresinde gerçekleştirilen araştırmada, ekstrenin akciğer kanseri hücrelerinde Akt/mTOR seviyelerini önemli ölçüde azaltarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu arttırarak akciğer kanserinde belirgin antitümör özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [24].

Yapılan bir araştırmada, HepG2 karaciğer kanser hücre hattında PI3K/Akt sinyalinin DOKS tarafından aktivasyonunun ve bunun EGCG tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir [25].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, Rosmarinik asit ve Epigallokateşin gallat isimli iki fenolik etken maddenin antitümör antibiyotikler içinde en önemli antineoplastik ilaç olan Doksorubisin'in istenmeyen yan etkilerine karşı koruyucu etkilerini Çin hamster overi hücre hattında araştırmaktır. Bir diğer amaç ise uygulanan bu maddelerin tek başına ve kombinasyonlarının hücre proliferasyonuna olan etkisini hücre hattı üzerinde rapamisin memeli hedefi proteini üzerinden göstermektir.

1.3 Hipotez

Doksorubisin kanserli hücrelerle birlikte normal hücrelere de sitotoksik özelliği nedeniyle zarar verebilmektedir. Oluşturduğu serbest radikallerle oksidatif strese neden olarak sağlıklı hücrelerin ölümüne yol açar. Oksidatif stres oluşumunu önleyebilen veya geciktirebilen antioksidan özelliklere sahip bitkisel kaynaklı fenolik yapıdaki birleşikler olan Rosmarinik asit ve Epigallokateşin gallat'ın Doksorubisin'in oluşturduğu sitotoksositeye karşı koruyucu etkilerini değerlendirmek bu çalışmayı oluşturan hipotezlerden biridir. Ayrıca, Doksorubisin normal hücrelerde oluşturduğu genotoksositeyle birlikte ikincil kötü huylu tümörlere neden olabilmektedir. Tümör oluşumuyla birlikte hücrelerde

proliferasyon artmakta ve kontrolsüz çoğalma gerçekleşmektedir. Bu durum iki ucu keskin bıçak gibidir. Bir yandan oluşan oksidatif stres ile hücre ölümü gerçekleştiği için mTOR seviyesinin azalmasının beklenmesi diğer yandan ikincil tümörlerin oluşumuna bağlı olarak hücre proliferasyonundaki artış ile mTOR seviyesinin artmasının beklenilmesi iki farklı durumu teşkil etmektedir. Literatürde yer alan çalışmalar değerlendirildiği zaman Doksorubisin'in sağlıklı hücreler üzerinde ve bitkisel etken maddelerle birlikte uygulandığında mTOR seviyesi üzerinde gerçekleşebilecek değişikliklerle ilgili veri bulunmamaktadır. Hücre çoğalması ve büyümesinde etkili olan yolda yer alan mTOR seviyesinin değişmesi beklenilmektedir ve bu önemli proteine western blotlama yöntemi ile seviyesinde meydana gelen değişmelerin analiz edilmesi çalışmayı oluşturan hipotezin bir diğer ürünüdür.

Cancer (kanser) terimi, tıbbın babası olarak bilinen Yunan fizikçi Hippocrates (MÖ 460-370) tarafından oluşturulmuştur. Hipokrat, kendi eski pratiği ve gözlemiyle birlikte eski Mısır'ın tıbbi fikirlerini miras alarak kanser bilgisine öncülük etmiştir. Kanseri özel bir hastalık kategorisi olarak tanımlamış ve kanserin infiltrasyon kapasitesine sahip kan damarları açısından zengin olduğunu ifade etmiştir [26]. Günümüzde kanser, ailesel (genetik), çevresel faktörler, beslenme şekli ve kişisel alışkanlıklar gibi etkenler altında hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ve çoğalmasıyla oluşan kompleks bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Çevresel faktörler ve kalıtsal etkenler kanser gelişimi ile ilişkilidir. 100'den fazla kanser türünün insan vücudunu etkilediği bilinmektedir [27]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun yayınladığı raporda küresel kanser yükünün artmaya devam ettiği bilgisi yer almaktadır. 2000 yılında, 5,3 milyon erkek ve 4,7 milyon kadında kötü huylu tümör geliştiğini ve 6,2 milyon kişinin hastalıktan hayatını kaybettiğini belirtmiştir. Önümüzdeki 20 yılda yeni vakaların sayısının % 50 artış göstereceğini ve 2020 yılına kadar yeni hastaların sayısının 15 milyona ulaşması beklenmektedir [28].

Türkiyede ki son verilen resmi rakamlar değerlendirildiğinde yılda 163.500 civarında yeni kanser vakası teşhis edilmektedir. Ülkemizde bir gün içinde yaklaşık olarak 450 kişinin kanser teşhisi aldığı bu rapor ile ortaya koyulmuştur [29].

2.1 Kanserde Tedavi

Kanser artık dünya için önemli bir sağlık problemi olup sistemik tedaviyle tümör büyümesinin kontrolü, tümör küçülmesi, lokal ve sistemik semptom kontrolü sağlanmaktadır. Kanserde sıklıkla kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Biyolojik tedavi yöntemleri, hormon tedavileri ve hedefe yönelik tedaviler daha az sıklıkla kullanılmaktadır. Kemoterapinin amacı kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlar kullanarak öldürmektir. Bu tedavide sitotoksik antineoplastik ajanlar kullanılır.

İlk uygulanan tedavi birinci basamak tedavi olarak adlandırılır. Cerrahi girişim öncesinde tümörün boyutunu küçültmek üzere uygulanan tedavi neoadjuvan tedavi, birinci basamak tedavinin arkasından verilen tedavi adjuvan tedavi olarak bilinir [30].

Kemoterapide farklı tedavi seçenekleri vardır. Aşağıda kemoterapi uygulamaları esnasında verilen ilaçlar yer almaktadır.

- Alkilleyici Ajanlar
- Kortikosteroidler
- Anti-Metabolitler
- Anti-tümör Antibiyotikler
- Mitotik İnhibitörler
- Topoizomerez İnhibitörler
- İnterferon
- Radyoaktif İzotoplar
- Hormon ve Hormon Antagonistleri

2.1.1 Anti-tümör Antibiyotikler

Günümüzde en etkili antikanser ilaçlar arasında olup çok sayıda kanser türünün tedavisinde kullanılmaktadırlar. Çeşitli bakteri türlerinden izole edilen diğer antibiyotikler ile birlikte, mikroorganizma kökenli kemoterapötik ajanlar olarak antikanser ilaçların kategorizasyonunda sitotoksik antibiyotikler kategorisinde bulunmaktadır. Tedavide kullanılan antrasiklin ilaçlar; Doksorubisin, Daunorubisin, Epirubisin, İdarubisin ve Mitoksantron yer almaktadır. Antrasiklinler, kırmızı aromatik poliketidlerdir ve aglikondaki yapısal farklılıklar yanında farklı şeker rezidülerinden dolayı çeşitli şekillerde bulunmaktadırlar [31].

Antrasiklinlerin çeşitli mekanizmaları vardır. DNA interkalasyonu, reaktif serbest radikallerin oluşması ve topoizomerez inhibisyonu bu mekanizmaları içermektedir.

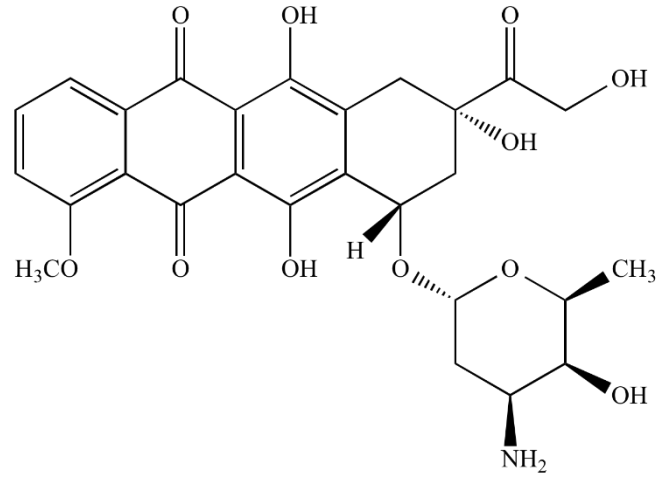
Antrasiklinlerin temel yapısı, bir glikosidik bağlantıyla bir şeker kısmına bağlanmış bir antrakinon omurgasına sahip olan bir tetrasiklik moleküldür. Bir hücre

tarafından alındığında, dört halka yapısı DNA baz çiftleri arasında birleşirken, şeker kısmı DNA'nın küçük (minör) oyuk içine oturmakta ve bitişik baz çiftleri ile etkileşime girmektedir. Antrasiklinler hücreler tarafından kolayca alınır ve çekirdeğe yerleşir. Antrasiklinlerin kromofor kısmı, bir araya getirme işlevine sahiptir ve DNA'nın bitişik bazları arasına girerek eklenir [32].

2.1.2 Doksorubisin

Toprak bazlı mikroorganizmalardan antikanser bileşiklerin aranması 1950'lerde başlamıştır. Parlak kırmızı bir pigment üreten yeni bir *Streptomyces peucetius* suşu izole edilmiş ve fare tümörlerine karşı aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bakteriden yeni bir antibiyotik üretilmiştir. Yeni bileşik, daunorubisin olarak adlandırılmış ve akut lösemi ile lenfoma tedavisinde başarıyla kullanılmıştır [33], [34]. Doksorubisin (DOKS), 1967 yılında (Farmitalia Araştırma Laboratuvarları) İtalya'da *Streptomyces peucetius* türünden elde edilen mutant bir suştan izole edilmiştir. *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, *S. peucetius*'tan elde edilmiştir, mutajenik işlemle, vejetatif ve hava miselinin rengine ve antibiyotik üretme kabiliyetine bağlı olarak ana kültürden farklıdır. *S. peucetius* var. *caesius*, hem çalkalama şişelerinde hem de karıştırılmış fermentörlerde glikoz, bira mayası ve inorganik tuzlar içeren bir ortam üzerinde batık ve havalandırılmış kültürde DOKS biriktirilir. Ürünün izolasyonu solvent ekstraksiyonu, tamponlu selüloz kolonlarında kromatografi ve hidroklorür olarak kristalleştirme ile gerçekleştirilmiştir [34]. Doksorubisin'in piyasadaki ismi adriyamisindir ve rengi kırmızı olduğundan dolayı kullanan hastalar tarafından kırmızı şeytan olarak da bilinmektedir. DOKS'un kimyasal yapısı açıdan, eter oksijeni ile bağlanan bir tetrasiklin kısmı ve amino-şeker kısmından oluşur. Amino-şeker daunoamine bağlı tetrasiklik kinoid aglikon adriyamisin (14-hidroksidanomisin) içerir. Sübstitüe kısımları ve kinon-hidrokinon sistemi, sert bir DOKS yapısını belirlemektedir. Amino-şeker grubunun amino grubu, DOKS'un suya afinite açısından farklı olabilecek çeşitli maddelerle bağlanma imkanı sunan en reaktif DOKS grubudur. Bu özelliği sayesinde, DOKS'un hücre yapılarında birikiminde değişiklikler olabilmektedir [35].

DOKS yapısında bir tetrasiklin halkası ve daunoamin şekeri içerir. DOKS, antrasiklin antibiyotikleri antikanser ilaç grubunda bulunur.



Şekil 2.1 Doksorubisin'in moleküler yapısı [36]

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından, “(7S, 9S) -7-[(2R, 4S, 5S,6S)-4-amino-5-hidroksi-6-metil- loksan-2-il] oksi6,9,11-trihidroksi-9-(2-hidroksiasetil)-4-metoksi8,10-dihidro-7H-tetrasen-5,12-dion”şeklinde adlandırılmaktadır. Doksorubisin'in kimyasal formülü $C_{27}H_{29}NO_{11}$ 'dir. Yüzlerce analog arasında, sadece birkaçı rutin klinik kullanıma ulaşmıştır. Bunların arasında en iyi bilinen ve en yaygın kullanılan Doksorubisindir. Ana metabolik özellikleri, bir keton grubunun bir hidroksil grubuna indirgenmesidir; bu ana bileşenden genellikle daha az aktif bir -ol türevi verir. Karaciğerde metabolize edilir. DOKS'un ana metaboliti, belli bir antitümör aktivitesine sahip olan aldo-keto redüktazlar tarafından üretilen 13-OH-doksorubisinoldür. DOKS hızlı bir dağılım aşaması ve yavaş bir eliminasyon aşaması ile karakterize edilir. DOKS yarı ömrü 12-18 saattir ve bu süre içerisinde dağılır. DOKS'un plazma proteinine bağlanması yaklaşık olarak % 75'tir. Bununla birlikte, kan-beyin bariyerini geçemez. DOKS'un plazma içinde art arda yarı ömrü yaklaşık 5 dakika, 1 saat ve 30 saattir. Toplam plazma klerensi yaklaşık 30 l / sa / m²'dir ve sabit durumda toplam dağılım hacmi yaklaşık 15 l / kg'dir [37].

2.2 Doksorubisin ile Tedavi

DOKS en yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. Çocuk ve erişkin hastalarda birinci basamak tedavide tercih edilmektedir. DOKS, gastrointestinal sistem tarafından emilmez. İlaç dokuları aşırı derecede tahriş ettiğinden, intravenöz

yoldan verilmektedir. Suda çözünür, metanolde az çözünür, pratikte kloroform, eter ve diğer organik çözücülerde çözünmez.

Ayrıca, transüretal rezeksiyon (önleyici tedavi) sonrasında gerekse terapötik amaçlar için intravesikal yoldan verildiğinde yüzeysel mesane tümörlerinde de endikedir [38]. Aşağıda yer alan kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır.

- Akut Lenfoblastik Lösemiler
- Akut Miyeloblastik Lösemi
- Endometriyum Kanseri
- Yumuşak Doku Sarkomları
- Ürotelyal Karsinom
- Bronkojenik Karsinom
- Mide Karsinomu
- Kaposi Sarkomu
- Hodgkin Lenfoma
- Hodgkin-dışı Lenfoma
- Metastatik Meme Kanseri
- Multipl Miyelom
- Mikozis Fungoides
- Nöroblastoma
- Metastatik Over Kanseri
- Overi Kanseri
- Kemik Sarkomu
- Sezary Sendromu
- Yumuşak Doku Sarkomu
- Tiroid Karsinomu
- Waldenström Makroglobulinemisi

- Wilms Tümörü
- Uterus Sarkomları

2.3 Doksorubisin Etki Mekanizması

DOKS'un etki mekanizması karmaşık ve tamamen anlaşılmamış olmakla beraber interkalasyon yoluyla DNA ile etkileştiği ve DNA sentezini engellediği düşünülmektedir [39]. DOKS, düzlemsel kromofor kısmı kovalent olmayan şekilde DNA'da yer alan iki baz çifti arasına girerek interkale olur. DNA baz çiftlerinin arasına yerleştiği ve baz çiftlerine paralel olarak bağlandığı interkalasyon olarak adlandırılan bir mekanizma ile DNA'ya (Kbapp 2.2~10-6M; nükleotid başına bağlanma alanları $n = 0.28$) yüksek verim ile kendiliğinden bağlanır [40]. İlaçla tedaviyi izleyen süreçte interkalasyon ile DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonunu inhibe eder. DOKS, DNA'da proteinle ilişkili tek iplik veya çift iplik kırılmalarına neden olabilir. Bu kırılmalarla bağlantılı proteinin daha sonra topoizomerez II ve enzimin kendisi tarafından katalize edilecek hasar olduğu gösterilmiştir [41]. Topoizomerez II, DNA'ya interkalasyon yapan antikanser ilaç aileleri için ortak bir hedeftir. Topoizomerez II adenosin trifosfatına (ATP)'ye bağımlı olarak çalışır. Temel biyolojik işlevi, süpersarmal DNA'nın her iki iplikçiğinin açılması ve replikasyon çatalının oluşmasıdır. Bu yüzden DNA replikasyonunda önemli bir işlevi vardır. Kromozomal replikasyonu takiben birbirine kitlenen ve karışan DNA moleküllerinin ayrılmasını sağlarlar. Ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin DNA replikasyonu için gereklidir. Tip I topoizomerez, DNA çift sarmalının bir sarmalını keser, gevşeme meydana gelir ve daha sonra kesilmiş sarmal yeniden bağlanır. Bir sarmalın kesilmesi, molekülün kesimin bir tarafındaki parçasının kesilmemiş sarmalın etrafında dönmesine izin verir, böylece stresi helikste fazla veya az bükülmeye gerek olmadan stresi azaltır. Bu tür bir stres, DNA sarmalının "süper sarmal" olduğu veya daha yüksek sarmal derecelerinde açıldığı zaman ortaya çıkar. Tip I topoizomerezlar hidroliz için ATP gerektirmez. Tip II topoizomerez DNA'nın iki zincirini de kırarak bağlantı sayısını değiştirerek DNA'ya iki süper halkasal dönüş ilave ederler. Tip II topoizomerez enzimi 170 kD homodimer yapıdadır, her iki DNA zincirine bağlanır ve açılan ipliğin 5' fosforil ucu ve proteinin her bir alt biriminin bir tirozin kısmı (bölünme kompleksi olarak

bilinir) ile geçici bir kovalent bağ oluşturarak her birini açar, böylece başka bir DNA molekülünün geçmesine izin verir. Sitotoksik ve klinik olarak ilgili konsantrasyonlarda doksorubisin, bölünme kompleksini stabilize eder. Transkripsiyon sırasında DNA'nın heliks yapısının açılmasını sağlayan Topoizomeraz II enziminin ilerleyişi engellenir. DOKS, DNA ikileşmesi sırasında topoizomerazın DNA'yı kesmesinin ardından meydana gelen topoizomeraz-DNA kompleksini stabilize ederek DNA ikili sarmalının tekrar birleşmesini engeller ve böylece DNA ikili sarmalının birleşmesini durdurur. Daha yüksek konsantrasyonlarda doksorubisin topoizomeraz II aktivitesini inhibe eder, ancak ilaç DNA'dan çıktıktan sonra, topoizomeraz II'nin inhibisyonu tersine çevrilir. Hücreler bölünmeye başladığında topoizomeraz II seviyeleri genom boyunca hızla artar ve tümör hücrelerinin değişmiş regülasyonu, topoizomeraz II zehirlerinin tümör seçiciliği için bir gerekçe sağlar. Üç faktör bu enzimi inhibe eder; yüksek tuz konsantrasyonu, düşük sıcaklık ve yüksek ilaç konsantrasyonları. Tüm bu faktörlerin DOKS'un sitotoksitesini düzenlediği bilinmektedir [42]. Topoizomeraz I ve II ile etkileşen ilaçlar, kanser tedavisinde kullanılırlar ve gelecekte kullanılması için ümit vericidir. Fakat, bu ajanların kendileri de hücrelerde genotoksik etki göstererek mutasyonlara ve kansere yol açabilmektedirler [43]. DOKS, ayrıca polimeraz enziminin aktivitesini inhibe edebilir, gen ekspresyonunun düzenlenmesini etkileyebilir ve DNA'ya serbest radikal hasarı verebilir. DOKS, kendiliğinden geniş bir tümör yelpazesine karşı bir antitümör etkisine sahiptir. DOKS hücre döngüsüne spesifik bir ilaç değildir. DOKS'un moleküler yapısına bağlı olarak antikanser mekanizması ise kinon yapısı ile ilişkilidir. Kinon-hidroksikinon fonksiyonel grubunun siklik oksidasyon-redüksiyonu ile gerçekleşir.

Antrasiklinlerin kinon kısmı, sitokrom P450 redüktaz, NADH dehidrojenaz ve ksantin oksidaz gibi oksidoredüktif enzimlerin varlığında aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) ürettikleri redoks reaksiyonlarına girebilirler. Kinonun yarı-kinona dönüştürülmesi sırasında serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller aktif olarak oksijen ile tepkimeye girerek süperoksitleri, hidroksil radikalleri ve peroksitlerin üretirler. Ek olarak, hücresel demir mevcudiyeti redoks reaksiyonlarını katalize eder ve ayrıca ROS oluşturur. Detoksifiye edilemeyen aşırı ROS, oksidatif stres, DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır ve böylece apoptozu tetikler [44]. +2 değerli katyonların şelasyonu ile oksijen radikalleri ve süperoksit oluşumuna neden

olurlar. DOKS diğerk bir etki mekanizması ise hücre membranına bağlanarak, membran fonksiyonunu buna bağli olarak fosfatidilinositol aktivasyonuna kenetli iyon transport mekanizmasını bozmasıdır [45]. Bu etki mekanizmaları oksidatif strese ve DNA hasarına yol açarak ilacın toksisitesine neden olurlar.

2.4 Doksorubisin Direnç Gelişimi

İlaç direnci, hastalıkların tedavilere toleranslı hale gelmesiyle sonuçlanan bir olgudur. Kanseler, uygulanan geleneksel tedavilere karşı direnç geliştirebilme kabiliyetine sahiptirler. Başlangıçta birçok kanser türü kemoterapiye duyarlı olsalar da, zamanla bir takım mekanizmalar yoluyla direnç geliştirebilirler. Kanserde ilaca karşı gelişen çeşitli direnç mekanizmaları öne sürölmüştür. DOKS gibi kemoterapötik ajanlara karşı kanser hücrelerinde gelişen direnç mekanizmaları; P-glikoprotein (P-gp) ya da çoklu ilaç direnci (MDR-1) . Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein ailesi (MRP), meme kanseri direnç proteini, (BCRP) ve akciğerk direnç proteini (LRP) gibi ilaç taşıma proteinlerinin aracılık ettiğı mekanizmalar bulunmaktadır [46,47]. Bir diğerk direnç mekanizması ise tümör hücrelerinde radyasyon ve sitotoksik etkenler tarafından indüklenen apoptoza dirençle ilgilidir. Apoptozisi indükleyen kemoterapötik etkinin inhibisyonu, sitostatik ilaçların hedef enzimlerinde mutasyonlar, p53 gen mutasyonu direnç mekanizmalarında yer almaktadır. P-gp, 170 kDa'luk transmembran proteindir. Yedinci kromozom üzerinde bulunan, MDR-1 geni tarafından kodlanmaktadır.

P-gp, ATP bağımlı olarak çalışır ve hücre içine alınan ilacın dışarı pompalanmasına neden olarak, hücre içinde ilaç miktarını azalttığı saptanmıştır. P-gp artışı ile hidrofobik olan DOKS gibi birçok antikanser ilaca karşı direnç gelişebilmektedir. İnsanda, P-gp birçok dokuda bulunmaktadır. Birçok tümör hücresi P-gp taşımakla birlikte, sonraki çalışmalarda direncin gelişmesinde yalnızca P-gp'nin sorumlu olmadığı, çoklu ilaç direncine sebep olan ve taşınmada görevli ATP bağımlı taşıyıcı protein olan (ABC proteinleri) ilgisi olduğu gösterilmiştir [48].

ABC taşıyıcı ailesi yaklaşık olarak 49 gen tarafından kodlanır. Sekans benzerliklerine göre ABCA, ABCB , ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG olarak yedi tane alt gruba ayrılmıştır [49,50]. Bu gruplar içerisinde 14 üyenin ilaç taşınmasında görevlidir. ABC taşıyıcı proteinleri, hücre membranında yerleşiktir ve ATP varlığında çalışan

birincil aktif taşıyıcılar olup çeşitli endojen bileşiklerin ve ksenobiyotiklerin membranlardan taşınmasını sağlarlar. ABC taşıyıcıları, hem normal dokularda hemde birçok kanserli dokuda ekspre olmaktadır. Bu proteinler, antikanser ilaçların kanser hücrelerinden dışarıya çıkmalarını, ilacın kanserli dokuda birikmesini önlemekte ve uygulanan tedavide başarısızlığı yol açmaktadır. ABC taşıyıcıları, ilaç farmakokinetiğini farklı aşamalarda etkilemektedir. Çoklu ilaç direnci olarak tanımlanan bu durumun oluşması nedeniyle antikanser ilaçlar tümör hücrelerinin içinde birikmemekte ve ilaçların hedeflenen yerde konsantrasyonu istenilen seviyede olmadığı için düşük aktivite göstermektedirler.

MRP-1, taşıyıcı ABC ailesinin ABCC alt ailesinin bir üyesidir. Bu protein, 190 kDa büyüklüğünde ve 16. kromozom tarafından kodlanmaktadır. MRP-1'in aşırı ekspresyonu sonucu DOKS'a karşı belirgin direnç oluşmaktadır [51]. MRP'ler genel olarak anyonik özellikteki organik ilaçları taşımaktadır. BCRP'de MRP ve P-gp'de olduğu ATP bağımlı taşıyıcı protein ailesindendir, BCRP'nin aşırı ekspresyonu hücre içi ilaç miktarını azaltır ve bu da dolaylı da olsa ilaç direncine neden olur. Antikanser ilaçlara karşı gelişen direnç mekanizmaları şunlardır:

- Çoklu İlaç Direnci
- İlacın Hücre İçine Alımının Azalması
- İlacın Etkin Metabolitine Biyotransformasyonunun Azalması
- DNA Hasarının Onarımının Hızlanması
- Epitelyal-Mezenkimal Geçiş ve Metastaz
- Hedef Enzimin Sentezinin Artması
- Hücrenin Apoptoza Eğiliminin Azalması
- Kanserli Hücrede Glutasyon veya Glutasyon-S-Transferaz Enziminin Artması
- Epigenetik Mekanizmalar
- Kanser Hücresi Heterojenitesi

DOKS'a karşı gelişen direnç ilacın kullanımını sınırlayan bir diğer problemdir. Direnç gelişimi multifaktöriyeldir. Bu mekanizmalardan biri ilacın hücre dışına atan efluks pompalarının aktivitesinin artması ve ilacın akümüülasyonunun azalmasıdır.

Bu mekanizma, ATP bağlayıcı kaset (ABC) B1 [çoklu ilaç direnci proteini (MDR) 1, P glikoprotein (Pgp)] ve ABCC1 [(MRP) -1] ve diğer taşıyıcılar (ABCC2, ABCC3, ABCG2 , ve RalA-bağlayıcı protein 1) ile ilişkilidir. DOKS direncindeki en yaygın değişikliklerden biri, efluksta yer alan proteinlerin genlerinin ekspresyonunun artmasıdır. Bu artış, hücre içi ilaç düzeyinin azalması ve oluşan direnci açıklamaktadır [52].

Bir ilacın etkinliği, moleküler hedef ve bu hedefin ekspresyonunu etkileyen mutasyon ve modifikasyonlardan etkilenir.

Kanserde, bu tip değişiklikler sonucunda ilaç direnci gelişir. DOKS'un moleküler hedefi olan topoizomera II enziminin aktivite değişiklikleri , ilacı etkisiz bırakacak kadar hücre içinde azalması ya da topoizomera II genindeki mutasyonlar ile duyarsız hale gelmesiyle direnç gelişmesidir [53].

Faz II metabolizmasında yer alan bir enzim olan Glutasyon-S-Transferaz (GST) glutasyonun ilaçlara konjugasyonunu katalize ederek daha fazla suda çözünür hale getirir ve böylece hücreden atılmalarını kolaylaştırır. GST hücre proliferasyonunda, sinyal iletiminde, hücre farklılaşmasında ve hücre ölümünde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. GST ve izoenzimlerinin özellikle GSTP1-1'in kanser hücrelerinde fazla miktarda bulunduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır. GSTP1'in ekspresyonu ile doksorubisin direnci ile korelasyon gösterir [54].

MRPs ve GSTs arasında sinerjizma vardır. Ekspresyonlarındaki paralel artış ile tümör hücrelerinde Doksorubisin'e karşı direnç geliştiği bildirilmiştir [55]. DNA tamir genleri, BRCA1 ve BRCA2, meme kanseri teşhisinde yer alan duyarlı bir markördür. Bu genler, DNA hasarına neden olan kemoterapilere verilen yanıtın belirteçidir [56]. Bazı çalışmalar BRCA1 ekspresyonunun azalmasıyla DOKS'un direncinin arttığını göstermişlerdir [57].

2.5 Doksorubisin Toksisitesi

DOKS, antitümör etkinliği olan antibiyotikler içinde en önemli antineoplastik ilaçtır. Ancak etki mekanizması aynı zamanda DOKS'un toksisite oluşturan mekanizmasıdır. Antrasiklin ilaçlarının ana yan etkileri çok yönlü sitotoksik etkilerdir ve kardiyotoksisite en belirgin olanıdır. 1970'lerde faz II ve III çalışmalarında DOKS üzerine yapılan erken klinik değerlendirmeler, akut kusma,

bulantı, gastrointestinal problemler, kellik ve nörolojik sistemdeki rahatsızlıkların (genellikle halüsinasyonlar ve sersemlik) ortak yan etkileri olduğunu göstermiştir [58]. DOKS, spesifik olarak tümöre yönelik değildir ve vücuttaki diğer birçok hücre tipinin büyümesini etkileyebilir.

Bu, bağışıklık sisteminin çökmesine neden olur ve bağışıklık hücrelerinin sayısı azaldıkça, hasta mikrobiyal enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelir, yorgunluk ve iyileşme süresi uzar. Bu etkilerin ciddiyeti ve bunların ortaya çıkması, doksorubisin dozuna ve hastanın kemik iliğinin yenilenme kapasitesine bağlıdır. Doksorubisinin sürekli olarak küçük bir damar içine uygulanmasıyla, fleboskleroz (damar duvarlarının kalınlaşması) gibi problemler ortaya çıkabilir ve yerel dokularda veya organlarda ekstrevasasyonlar meydana gelirse, nekroz oluşabilir. Ekstrevasasyonun diğer yan etkileri arasında selülit, tromboflebit ve ağrılı doygunluk (dokunun patolojik sertleşmesi) sonucu eklem hareket sınırlaması görülebilmektedir [59].

DOKS kullanımı ile gelişebilecek yan etkiler şunlardır:

- Kardiyomiyopati ve Aritmi
- İkincil Maligniteler
- Ekstrevasasyon ve Doku Nekrozu
- Şiddetli Miyelosupresyon
- Tümör Lizis Sendromu
- Radyasyon Hassasiyeti
- Deri ve tırnak hiperpigmentasyonu
- Aşırı duyarlılık – Anafilaksi
- Gastrointestinal Sorunlar
- Nörolojik - Periferik Duyusal ve Motor Nöropati
- Vasküler - Fleboskleroz, Flebit / Tromboflebit, Tromboembolizm
- Oküler - Konjonktivit, Keratit, Lakrimasyon

2.5.1 Kalp Toksisitesi

DOKS kaynaklı toksisitenin en büyük riski kardiyotoksisitedir ve bunun için çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Bu nedenle, doksorubisin uygulaması dozla sınırlı olmalıdır. Hastalar akut ile kronik arasında değişen koşullar ile farklı şekilde etkilenir. DOKS, kalpteki kardiyomiyositlerin yapısal değişikliklerinden ve onları büyütmeekten sorumludur. Bundan sorumlu genler, beyin natriüretik peptidi ve atriyal natriüretik peptididir . Yüksek oranda ifade edildiğinde, bu iki gen kardiyak hipertrofiye neden olmaktan sorumludur. Kardiyotoksisitenin ortaya çıkmasının alternatif bir yolu, doksorubisinin kalp kası içindeki mitokondri üzerindeki etkisidir. Mitokondriyal protein ekspresyonu seviyesini değiştirerek, doksorubisin ve NADH dehidrojenazın redoks çevrimini artırır. DOKS varlığında, ROS seviyesi artar, mitokondriden serbest bırakılan sitokrom c ile apoptozu aktive eder.

DOKS bağlı kardiyotoksisitenin patojenezinde; antioksidan enzimlerde azalmanın, serbest radikal oluşumunun ve lipid peroksidasyonunda artmanın rol oynayabileceğini desteklemektedir [4]. Ömür boyu vücutta DOKS birikimi 500 mg/m²'ye yaklaşırsa, kardiyomiyopati riski sıklıkla artmakta ve hastaların %20'sinde konjestif kalp yetmezliği ile sonuçlanmaktadır [60].

2.5.2 Beyin Toksisitesi

DOKS aracılı beyin toksisitesini araştırırken, beyine neden olan toksisitenin dolaylı olduğunu not etmek önemlidir, çünkü doksorubisin kan-beyin bariyerini geçemez. Doksorubisin, beyindeki mikrogliyal hücrelerin enflamatuar sitokinler üretmesini tetikleyerek TNF-a üretimini uyarır. TNF-a, aşırı üretildiğinde, endüktif nitrik oksit sentaz ifadesini aktive ederek reaktif azot türlerinin(RNS) seviyelerinin yükselmesine neden olur. RNS seviyeleri sürekli arttıkça, proteinler nitrasyona maruz kalır, protein nitrasyona maruz kaldıktan sonra, ROS oluşumunu uyarır, mitokondri geçirgenliği değişir. Mitokondri porlarından sitokromu c salınımı olur, hücre ölümü apoptoz yoluyla gerçekleşir. Nihayetinde bu eylemler, beynin bilişsel bozulmaya uğrayan çeşitli alanlarından sorumludur [61].

2.5.3 Karaciğer Toksisitesi

DOKS kaynaklı hücre ölümü ve doku hasarı için başka bir yaygın bölge karaciğerdedir ve hastaların % 40'ı karaciğer hasarı geçirerek tedavi görmektedir. Metabolizma ve detoksifikasyon aktivitesiyle bilinen karaciğer, yüksek konsantrasyonlarda doksorubisin metabolize ederek, çok sayıda ROS üretir. Sonuç olarak ROS, DNA hasarı, lipid peroksidasyonu üretimi, E vitamini seviyelerini düşürmek, düşük glutatyon (GSH) seviyesini düşürmek ve oksidatif işlemlerin dengelenmesine neden olmak üzere aşırı miktarda hasara neden olur. Doksorubisin aracılı toksisitenin neden olduğu son ana eylem, hem ADP hem de ATP'nin yanı sıra hepatositlerde patolojik koşullara neden olan AMP'nin inorganik fosfat seviyelerinin düşürülmesinden sorumlu olmasıdır [62].

2.5.4 Böbrek Toksisitesi

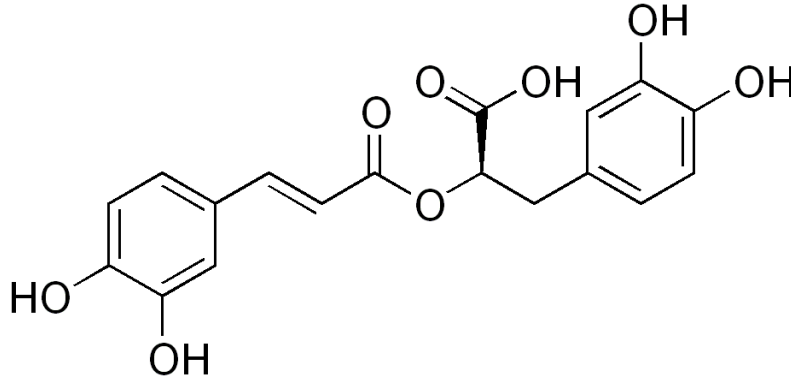
DOKS kaynaklı nefropati, ilacın mitokondrinin normal işleyişine müdahale ettiği ve mitokondrinin I ve IV komplekslerinin aktivitesini azalttığı zaman meydana gelir. Bu, trigliserit, süperoksit ve sitrat sentaz seviyelerinin yükselmesine neden olurken, E vitamini ve antioksidan bileşiklerin seviyelerini azaltırken lipid peroksidasyonu meydana gelmektedir. Nefron yapısı değişikliği, yerel geçitlerden sızan proteinlere maruz kaldığında ve böbrek dokusuyla temas ettiği zaman değişir.

Böbreklerin glomerulini etkileyen hastalığın, hipertansiyona, steroidlere ve proteinüriye direnç gösterdiği ve sonunda böbrek yetmezliğine yol açtığı bilinmektedir [63].

3

ROSMARİNİK ASİT

Rosmarinik asit (RA), çeşitli bitkilerde bulunan kimyasal bir bileşiktir. RA ilk olarak 1958'de *Rosmarinus officinalis*'den iki İtalyan bilim insanı Scarpati ve Oriente tarafından izole edilmiş ve saflaştırılmıştır; daha sonra izole ettikleri bitkiye göre adlandırmışlardır [64]. Kafeik asit ve 3,4 dihidrofenillaktik asidin esteri olan RA, *Lamiaceae* familyasının türlerinde yaygın olarak bulunan doğal olarak oluşan bir fenilpropanoittir. *Lamiaceae* familyasının *Nepetoideae* alt familyasında da bulunur [65]. IUPAC tarafından (2R) -3- (3,4-dihidroksifenil) -2 - [(E) -3- (3,4-dihidroksifenil) prop-2-enoil] oksipropanoik asit olarak isimlendirilmiştir ve $C_{18}H_{16}O_8$ moleküler formülüne sahiptir.



Şekil 3.1 Rosmarinik asit'in kimyasal yapısı [66]

RA, gastrointestinal sistemden ve deriden iyi emilir. Tüketilen RA, sistemik olarak metabolize olmamış durumda olabileceği gibi ayrıca m-kumarik asit, m-fenilhidroksipropiyonik asit, sülfatlanmış kafeik, kumarik ve ferulik asit formları gibi çeşitli metabolitler olarak da bulunur [67]. Bu metabolitler, alımdan sonra insan kanında / idrarında bulunur [68]. RA, perilla (*Perilla frutescens* L.), biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), adaçayı (*Salvia officinalis* L.), fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) ve nane (*Mentha arvensis* L.) yaygın olarak kullanılan mutfak bitkilerinde bulunan polifenolik maddelerden biridir. Polifenoller, karsinogenezi, tümör hücresi

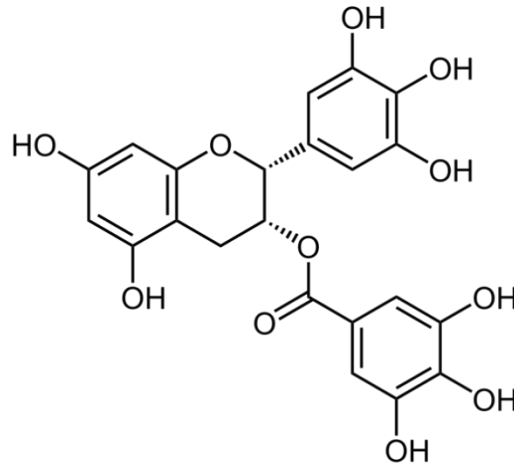
çoğalmasını, apoptozu, metastazı ve inflamasyonu etkilediği bilinen bir grup kimyasaldır.

RA, eczacılık endüstrisi, gıda ve kozmetik endüstrisi için ilginç bir etken madde haline getiren bir dizi biyolojik aktiviteye sahiptir. RA, antioksidan, anti-inflamatuar, antimutajenik, antianjiyojenik, anti-apoptotik, antifibrotik, kemoprotektif, nöroprotektif, atopik dermatitin azaltılması, keratinositlerin fotoproteksiyonu ve Alzheimer hastalığının önlenmesi gibi bir dizi biyolojik aktiviteye sahiptir [69]. Sınırlı sayıda çalışmada RA'nın DOKS'un neden olduğu DNA hasarını önleme yeteneğini araştırılmıştır. RA'nın V79 hücrelerinde DOKS tarafından tetiklenen kromozom kırıklarına ve DNA hasarını azalttığını göstermiştir. Aynı araştırma grubu, RA'nın, fare mikronükleus analizinde DOX tarafından indüklenen kromozom hasarını azaltmada da etkili olduğunu ortaya koymuştur. RA'nın antigenotoksik mekanizmaları tam olarak anlaşılmamasına rağmen, RA'nın antioksidan aktivitesi DNA hasarının azalmasına katkıda bulunabilir [64]. RA ile yapılan anti-karsinojenik çalışmalara ve gösterdiği etkilere bakıldığında RA'nın böbreklerde sisplatin kaynaklı oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozu iyileştirdiği gösterilmiştir [67]. Ayrıca, RA'nın, stres genlerinin ekspresyonunu değiştirerek ve hücre içi antioksidan kabiliyetini artırdığı bulunmuştur [71]. RA, 1,2-dimetilhidrazin (DMH) kaynaklı sıçan kolon karsinogenitesine karşı kemopreventif potansiyel göstermiştir ve kolon kanserine karşı muhtemel kemopreventif bir ajandır [72]. Kronik RA tüketimi, kolorektal karsinogenez modeli oluşturulmuş Apc (Min) faresinin plazma ve bağırsak kanalındaki adenom gelişimini ölçülebilir şekilde yavaşlatmıştır [73]. RA, DMBA (7,12-dimetilbenz (a) antrasen) kaynaklı oluşan cilt kanserine karşı güçlü antikanser, anti-lipid peroksidatif ve apoptotik etkilere sahip olarak bulunmuştur [74]. RA ile yapılan çalışmalarda deneylerde yer alan tüm hücre hatlarında sitotoksik aktivite yerine proliferatif etki göstermiştir [75]. Sağlıklı hücrelerde rosmarinik asit fraksiyonlarının sitotoksik etkisini analiz etmek için insan periferik kan lenfositleri kullanılmıştır. Rosmarinik asitin sitotoksik etkisi gözlenmemiştir [76].

Sınırlı sayıda çalışma RA'nın kemoterapötik ajanların neden olduğu DNA hasarını önleme yeteneğini araştırmıştır.

Furtado ve diğ. (2009) RA'nın V79 hücrelerinde DOKS tarafından tetiklenen kromozom kırılmasını ve DNA hasarını azalttığını göstermiştir. Aynı araştırma grubu, RA'nın, fare mikronükleus analizinde DOKS tarafından indüklenen kromozom hasarını azaltmada da etkili olduğunu göstermiştir [77]. RA'nın antigenotoksik mekanizmaları tam olarak anlaşılmamasına rağmen, RA'nın antioksidan aktivitesi DNA hasarının azalmasında katkıda bulunduğu düşünülmüştür [65].

Epigallokateşin gallat (EGCG), aynı zamanda epigallokateşin-3-gallat olarak da bilinen epigallokateşin ve gallik asidin esteridir ve bir kateşin türüdür. [(2R, 3R) - 5,7-dihidroksi-2- (3,4,5-trihidroksifenil) -3,4-dihidro-2H-kromen-3-il] 3,4,5-trihidroksibenzoat (IUPAC) olarak isimlendirilir ve $C_{22}H_{18}O_{11}$ moleküler formülüne sahiptir.



Şekil 4.1 Epigallokateşin gallat'ın kimyasal yapısı [78]

Çaydaki en bol kateşin olan EGCG, insan sağlığını ve hastalığını etkileme potansiyeli nedeniyle temel araştırma altındaki bir polifenoldür. EGCG birçok diyet takviyesinde kullanılır. Çayda en yüksek miktarda bulunan polifenol grubu; kateşinler ve theaflavinlerdir. Kateşinler içerisinde ise epigallokateşin gallat (EGCG), epikateşin (EC), epikateşin gallat (ECG) ve epigallokateşin (EGC) en önemli çay kateşinleri olarak değerlendirilmektedir. Kateşinler ayrıca, polifenoller olarak bilinen daha geniş bir bitki bileşiği grubuna dahil edilir. EGCG ve diğer ilgili kateşinler, serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasara karşı koruma sağlayabilecek güçlü antioksidanlar olarak işlev görür. Ek olarak, EGCG gibi kateşinlerin iltihaplanmayı azaltabileceğini ve kalp hastalığı, diyabet ve bazı kanserler dahil olmak üzere bazı kronik rahatsızlıkları önlediği yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [79].

EGCG en çok yeşil çayda bulunur, ancak diğer çay, meyve ve bazı kabuklu yemişlerde daha az miktarda olmak üzere bulunmaktadır.

Epigallokateşin gallat ve epikateşin gallat formları siyah çayda bulunan toplam kateşin miktarının %27'sini oluşturmaktadır [80, 81].

Kurutulmuş yeşil çay yapraklarında en fazla (100 g başına 7380 mg), beyaz çayda (100 g başına 4245 mg) ve daha az miktarda siyah çayda (100 g başına 936 mg) bulunmuştur. Eser miktarda elma kabuğu, erik, soğan, fındık, ceviz ve keçiboynuzu tozunda bulunmuştur (100 g'da 109 mg'da). Çayın içinde bulunan kateşinlerin antioksidan kapasitesinin vitaminlere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Sıralama bu şekilde bulunmuştur, epigallokateşin gallat> epikateşin gallat> gallokateşin> epikateşin> epigallokateşin olarak verilmiştir [82]. EGCG, E vitamininden 25 kat, C vitamininden ise 100 kat fazla antioksidan aktiviteye sahiptir. Kateşinlerin biyoyararlanımı sınırlıdır çünkü absorpsiyonları düşüktür ve eliminasyonları fazladır. Kateşinler içinde yarılanma ömrü en fazla olan kateşin, EGCG (173 dk)'dir [83]. Ağızdan alındığında, EGCG zayıf emilime sahiptir. Günlük alımda 8-16 fincan yeşil çayın eşdeğeri olan EGCG mide bulantısı veya mide yanması gibi olumsuz etkilere sahiptir. Tüketimden sonra, EGCG kan seviyesi 1,7 saat içinde en yüksek seviyeye ulaşır. Absorbe edilmiş EGCG'nin plazma yarı ömrü yaklaşık 5 saattir, fakat değişmemiş EGCG'nin çoğu 0 ila 8 saat arasında idrarla atılır [84].

EGCG; kanser ile bağlantılı genlerin ekspresyonuyla ilişkili enzimlerin, telomerazı ve DNA metiltransferazı baskılar. Yapılan deney hayvanı çalışmalarında ve *in vitro* çalışmalarda EGCG'nin antimutajenik, antiproliferatif, pro-apoptotik ve anti-anjiyojenik etkileri olduğu görülmüştür [85]. Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI), EGCG'nin kanserin oluşumunu önleyen bir madde olduğunu belirtmişlerdir [86]. EGCG, insan prostat kanseri [87], insan epidermoid karsinoma [88], meme karsinoma MCF-7 [89], ve pankreas kanser hücre hatlarında [90] apoptoz aktivitesi artmıştır. EGCG'nin antioksidan özelliğinin, yapısında yer alan aromatik halkalara ve hidroksil gruplarına bağlı olabileceği belirtilmiştir. Bu kimyasal yapısına bağlı olarak serbest radikalleri yakaladığı ve nötr hale getirdiği öne sürülmüştür.

EGCG oksidatif strese karşı koruma sağlarken, apoptik yolları da etkilediği gösterilmiştir [91]. EGCG kanserli hücrelerde apoptoz indüksiyonu ve hücre replikasyonunun inhibisyonunu gerçekleştirerek tümörün gelişimini ve büyümesini

engellediği gözlemlenmiştir. Buna karşın, sağlıklı hücrelere etki etmemekte veya etkisi az olmaktadır [92]. EGCG'nin insan vücudu üzerindeki moleküler mekanizmalarına bakıldığında zaman düşük EGCG konsantrasyonlarının normal fizyoloji ve patofizyolojide kardiyovasküler ve metabolik fonksiyonlar üzerinde yararlı etkileri olduğu gibi hücre içi sinyalleşme, nükleer ve mitokondriyal fonksiyonlar ve lizozomal otofajiyi içeren hücresel olayları da doğrudan veya dolaylı olarak uyarır. Buna karşılık, yüksek EGCG konsantrasyonu, hücresel bütünlüğe zarar veren ve nükleer ve mitokondriyal fonksiyonu ve lizozomal otofajiyi bozan ciddi strese neden olabilir [93]. EGCG'nin DOKS kaynaklı gelişen oksidatif strese, kardiyotoksisiteye ve enflamasyona karşı koruyucu etkisi *in vivo* deneylerle gösterilmiştir [94]. Sadece DOKS ile gelişen istenmeyen etkilere değil aynı zamanda yapılan bir çalışmada heksavalent kromiyum [Cr (VI)] isimli reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve hücre ölümüne yol açan çeşitli DNA lezyonlarının oluşmasına neden olan bir insan kanserojenidir. EGCG, insan normal bronş epitel BEAS-2B hücrelerini Cr (VI) kaynaklı oksidatif stres ve hücre ölümünden doza bağlı bir şekilde koruduğunu gösterilmiştir [95].

SİTOTOKSİSİTE ve SİTOTOKSİSİTE BELİRLEME YÖNTEMLERİ

Sitotoksosite, moleküler düzeyde gerçekleşen mekanizmalar sonucunda çeşitli makromoleküllerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin yapısında, fonksiyonlarında ve işleyişinde belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır [96]. Sitotoksik maddeler, hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu değiştirip durduran maddelerdir. Hücre hatları üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli fonksiyon ve yapı değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel çalışmalar yapılır [97]. Bu nedenle hücre popülasyonlarında hücre canlılığı ve proliferasyonlarını çalışabilmek için bazı metodlar geliştirilmiştir. Sitotoksosite testlerinde hücre hatları kullanılarak olası reaksiyonlar *in vitro* olarak değerlendirilmektedir. Bir kimyasalın olası toksisitesiyle ilgili ön bilgi edinilir ve bu veriler ışığında istenen klinik araştırmalar ve *in vivo* deneyler planlanıp yapılabilir. Sitotoksisiteyi belirleme yöntemleri aşağıda yer almaktadır;

- Metabolik Aktivitenin Ölçülmesine Dayalı Yöntemler
- Membran Geçirgenliğinin Ölçülmesine Dayalı Yöntemler
- Morfolojik Değişikliğin Mikroskopik Olarak Gözlemlenmesi
- Alamar Mavisi Yöntemi
- Sülförödamın B (SRB) Yöntemi
- Laktat Dehidrojenaz (LDH) Yöntemi

5.1 Metabolik Aktivitenin Ölçülmesine Dayalı Yöntemler

Sitotoksik yanıtı ölçmek amacıyla *in vitro* testlerde hücrelerin enzimatik aktiviteleri ölçülür. Enzimatik aktiviteyi ölçen testler kolorimetrik metodlar yardımıyla, 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülföfenil)-2H-tetrazolyum (WST), 3-(4,5-dimetiltiyazol- 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT),

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT), gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak hücrelerin özellikli boyanması esasına dayalı ölçüm yaparlar.

Tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenme reaksiyonu gerçekleştirirler ve formazan denilen yapıya dönüşürler. Formazan yapısının oluşmasıyla beraber renk değişikliği gerçekleşir. Tuzun içerisinde yer alan tetrazolyum halkası sadece aktif mitokondri tarafından kırılabilir. Kısacası, renk reaksiyonunu ancak canlı hücrelerde meydana gelirler [98]. Ölü hücreler ise aktif bir mitokondriye sahip olmadığından tetrazolyum bileşiklerini kıramaz yani indirgeme yeteneklerini kaybetmişlerdir bu yüzden bir renk değişimi meydana gelmez. Renk değişimiyle beraber canlılığın *in vitro* olarak belirlenmesi tetrazolyum tuzlarını biyolojik araştırmalarda önemli bir yere koymuştur [99]. Öncelikle kolorimetrik MTT metodu geliştikten sonra, WST-1, WST-8, XTT, MTS gibi farklı özelliklere sahip tuzlar ile yapılan metotlar eklenmiştir [100,101].

Tetrazolyum bileşikleri, ikiye ayrılırlar hücre içine girebilme ve hücre kültürü ortamında çözünme özelliklerine göre [102]. Bu bileşikler ile yapılan hücre canlılığı testleri, üç basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamakta hücreler belirli zaman araştırılan kimyasal ile muamele edilirler. İkinci basamakta uygulanan madde hücre ortamından uzaklaştırılıp tetrazolyum tuzu hücre ortamına eklenir ve inkübatöre konularak 1-4 saat boyunca inkübe edilir. Bu sırada, canlı hücreler tetrazolyum bileşiklerini indirgeyip formazana dönüştürerek renk değişimini gerçekleştirirler. En son adımda ise gerçekleşen renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı hesaplanarak, belirlenir [103].

5.1.1 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT)

Canlılık Testi

MTT metoduyla hücre hatlarında canlı veya ölü hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak belirlenebilmektedir. MTT, pozitif yüke sahip bir bileşiktir, ökaryot hücrelerin membranını kolay şekilde geçerek hücre içerisinde indirgenebilir.

Yaşayan hücrelerde mitokondride bulunan süksinat dehidrojenaz enziminin aktivitesi gözlenirken, ölen hücrelerde gözlenmemektedir. Total dehidrojenaz aktivitesi ile canlı hücre sayısı arasında doğru ilişki olduğu gösterilmiştir [104]. Hücre ortamına eklenen maddeler eğer hücrelerin ölümüne sebep oluyorsa aynı zamanda bu hücrelerde enzim aktivitesinin azaldığı veya yok olduğu araştırmalarda gösterilmiştir. Bunun için, hücreler bu enzimlerin değişime uğrattığı MTT maddesine maruz bırakılmaktadır. Canlı hücrelerde mitokondride bulunan süksinat dehidrojenaz enzimiyle MTT boyasının tetrazolium halkası açılmakta, bunun sonucunda açık sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüşmektedir. Ardından bu kristaller çözülerek oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre ile ölçülmektedir [102].

5.1.2 (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disulfonat) (WST-1) Canlılık Testi

Sitotoksik etki ve metabolik aktivitenin belirlenmesi için kullanılan diğer bir yöntem ise WST-1 testidir. WST-1 testide radyoaktif olmayan, kolorimetrik ve spektrofotometrik bir yöntemdir. WST-1 negatif yüklüdür ve hücre membranını geçemezler. Bu yüzden tetrazolyumun formazan ürününe redüksiyonuna yardımcı olmak için elektronları sitoplazma ya da plazma membranına transfer edebilen fenazin metil sülfat ya da fenazin etil sülfat gibi bir orta seviye elektron alıcıyla birlikte kullanılırlar. Elektron alıcı olarak kullanılan molekül, hücre içerisine girerek sitoplazmadan ya da plazma membranından elektron alır ve hücre kültürü ortamına geri dönerek tetrazolyum bileşiğini indirger. İndirgenme sonucu oluşan formazan suda ve hücre ortamında çözünebilir niteliktedir. Tetrazolyum bileşikleri canlı hücreler tarafından direk hücre kültür medyumunda çözünebilen formazan ürünleri oluşturmak için indirgenebilirler. Bu gelişmiş tetrazolyum bileşikleri test prosedüründeki bir basamağı formazan çökeltilerinin çözünmesi için test ortamına ikinci bir reaktif (alkol veya dimetil sülfoksit) eklenmesi gerekmediğinden, bu protokol günümüzde daha çok tercih edilmektedir [104]. WST-1 aktif enzimler tarafından formazan tuzuna dönüşmektedir. Canlı hücrelerde aktivitesi yüksek olan mitokondriyal dehidrojenaz enzimi ile suda çözünür renkli formazan bileşiğini oluşturmaktadır. Aktif metabolik aktiviteye sahip olan hücre miktarıyla formazanla boyanan hücre sayısında doğru ilişki vardır. Canlı hücreler tarafından metabolik

aktivite sonrasında oluşan formazan boya, spektrofotometreyle hücrelerin absorbans değeri ölçülmektedir [106].

5.2 Membran Geçirgenliğinin Ölçülmesine Dayalı Yöntemler

Hücre zarını geçirgenliği, hücre zarını kolayca geçen boya sayesinde kolay, ucuz ve basit bir yolla belirlenebilmektedir. Metodun prensiplerden biri canlılığını kaybolmaya başlayan hücrelerde, hücre zarı geçirgenliği artar. Boyanın hücre zarını geçip geçememesine bağlı olarak canlı ve ölü hücreler belirlenmektedir. Bu metotta kullanılan iki çeşit boya vardır bunlardan biri vital boya diğeri ise vital olmayan non-vital boyalardır. Nötral kırmızısı vital bir boyadır, canlı hücreye aktif transportla taşınır ve lizozomlarda birikir. Tripan mavisi ise non-vital boyadır.

Hücrenin canlılığı sona erdiğinde hücreviçine girmektedir [107]. Negatif yüklü olan tripan mavisi canlı hücrelerin membranından geçemez. Canlı hücrelerde boya hücre içine giremez. Sadece, ölü hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop ile bakıldığında mavi renk görünürler. Tripan mavisi boyasıyla araştırma yaparken boyanın uygulanma süresi önemlidir.

Belirli süreden daha uzun süre maruz kalırsa canlı hücreler de ölü hücreler gibi mavi renge boyanmaktadır. Bu yüzden dikkat edilmelidir [108].

5.3 Morfolojik Değişikliğin Mikroskopik Olarak Gözlemlenmesi

Mikroskopik gözlem ile hücredeki morfolojik değişikliklerin saptanması ile gerçekleştirilir. Bir maddenin sitotoksitesi, madde hücrelere uygulanmadan önce ve sonrasında hücre sayısı veya büyümesiyle ölçülür. Hücreler hücre kültür kaplarında kültüre edilir. Eğer uygulanan madde toksik değilse hücreler büyümeye devam ederler. Materyal sitotoksik ise hücreler büyümeyi durdurur ve sitopatik özellikler gösterir veya hücre şekli değişir. Hücre yoğunluğu kalitatif, semi kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilir.

5.4 Alamar Mavisi Yöntemi

Son zamanlarda alamar mavisi yöntemi, oksidasyon-redüksiyon indikatörü kullanılarak hücre proliferasyonunu ölçmek için kullanılır. Aktif bileşeni olan resazurin hücre zarından geçebilir ve zararlı değildir. Floresan aktivitesi olmayan,

resazurinin rengi mavi olan bir bileşiktir. Hücre içinde indirgenerek şiddetli kırmızı floresan renk veren resofurine dönüşür. Resofurin'in floresan özelliği bulunduğu için duyarlılığı yüksektir. Alamar mavisi yöntemi diğer bir sitotoksosite testi olan MTT testine göre daha hassas ve performansı daha yüksektir [109,110].

5.5 Sülförödamın B (SRB) Yöntemi

SRB yöntemi bir diğer sitotoksosite yöntemidir, bu yöntemle hücre çoğalması değerlendirilir. SRB bir kemosensitivite testidir. SRB, bazik amino asitlere bağlanan aminoksanten yapısında floresan bir boyadır. SRB kırmızı renklidir ve suda çözünürlüğü yüksektir. Yöntemin esası, mitokondriyal fonksiyona bağımlı değildir.

Temelinde boya miktarı ile total protein miktarı arasında korelasyon bulunmaktadır. Hücre sayısı ile ilgili bilgi veren kolorimetrik bir metottur [111].

5.6 Laktat Dehidrojenaz (LDH) Yöntemi

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise ölü veya hasar görmüş hücrelerden salınan sitoplazmik enzim aktivitesinin ölçülmesine dayanmaktadır. LDH, hücrelerin sitoplazmalarında bulunan bir enzimdir. Hasarlı/ölü hücrelerden salınan LDH aktivitesi belirlenir [112,113].

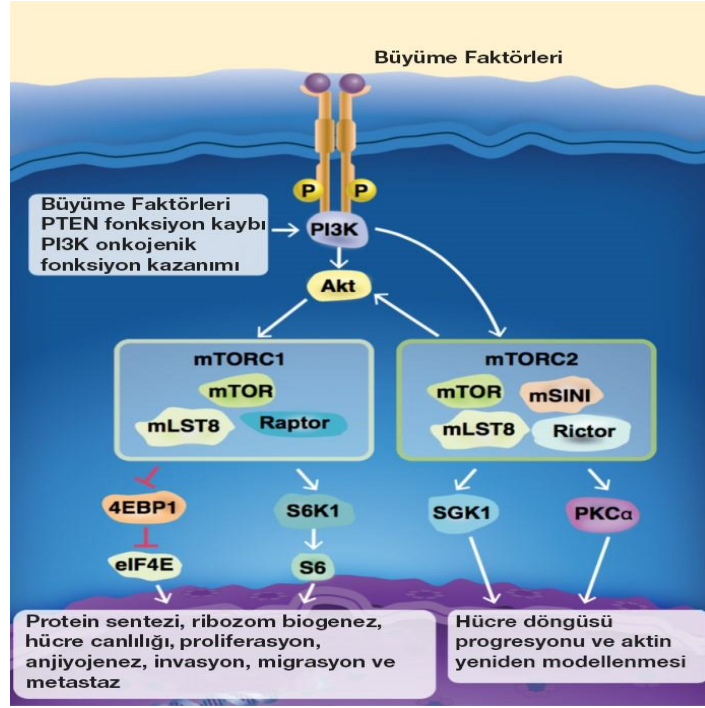
Hücreler, toksik etkilere maruz kaldığında hücrenin plazma membranı hasar görür ve LDH hücre kültürüne kolaylıkla geçebilmektedir. Bu sayede, LDH enzim aktivitesi ölçülerek hücrenin ne kadar hasar gördüğü kolorimetrik olarak değerlendirilir. [113].

Her hücre tipinin kendine özgün LDH miktarı bulunmaktadır ve hücrenin pasaj sayısı ve hücrenin yaşı LDH miktarını etkileyebilmektedir. Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılır ve LDH aktivitesi belirlenir.

mTOR (Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) 289 kDa ağırlığında evrimsel olarak korunmuş bir serin-treonin kinazdır. Rapamisin antifungal bir antibiyotiktir. Bu antibiyotikle yapılan çalışmalar hem mTOR proteininin hem de içinde bulunduğu yolağın keşfedilmesine yardımcı olmuştur [113]. Çoğalma, yaşama, diferansiyasyon ve motilite gibi hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli role sahiptir [94]. mTOR farklı proteinlere bağlanarak, mTORC1 (mTOR kompleks 1) ve mTORC2 (mTOR kompleks 2) olmak üzere 2 kompleks oluşturmaktadır. mTORC1 alt yolağında bulunan ökaryotik başlatma faktörü 4E (eIF4E)-bağlanma proteini 1 (4E-BP1) ve p70 ribozomal S6 Kinaz 1 (S6K1)'i fosforlayarak protein sentezini aktive etmektedir [113]. Çizelge 6'da mTORC1 ve mTORC2'nin özellikleri verilmiştir.

Tablo 6.1 mTORC1 ve mTORC2 komplekslerinin özellikleri [115]

Bileşenler	mTORC1	mTORC2
	Raptor mTOR mLST8	Rictor Protor-1 mTOR mLST8 mSINI
Bilinen substratlar	4E-BP1 S6K1 PRAS40	Akt PKC- α
Biyolojik süreç	Cas bağımlı translasyon Ribozom biyogenez Otofaji Hipoksikadaptasyon	Büyüme faktörü sinyalizasyonu Sitoskeleton organizasyonu



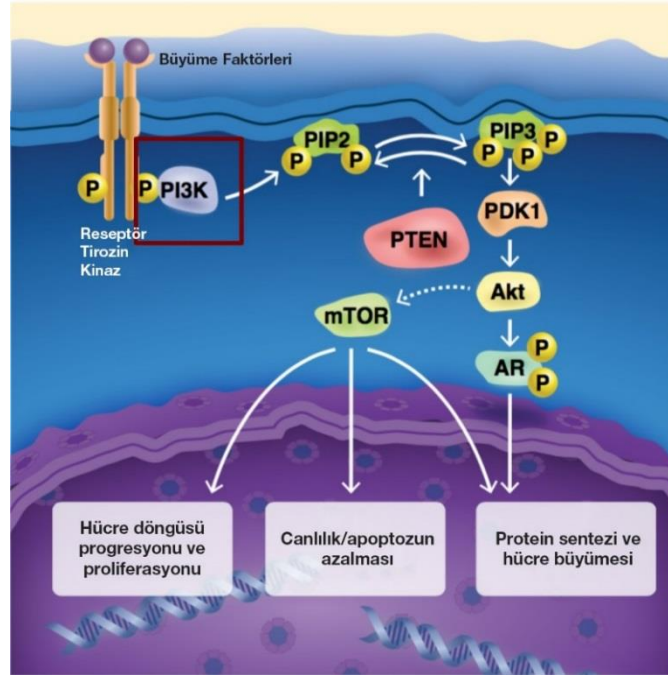
Şekil 6.1 Aktive olmuş PI3K/Akt/mTOR yolağı ve etkileri [116]

6.1 Sinyal yolağı

mTORC1 sinyali, büyüme faktörleri, besin mevcudiyeti ve immün-düzenleyici sinyaller gibi çeşitli çevresel faktörlere cevaben hücreSEL büyüme ve proliferasyonu indükler. Büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer kostimulatör sinyaller PI3K'ün ve takibinde Akt aktivasyonunu sağlarlar. Akt, mTORC1 baskılayıcı faktör Tuberoz Skleroz Kompleks'i inhibe eder [117]. Akt ayrıca, mTORC1'de inhibitör rol oynayan PRAS40'ı fosforile ederek, bu proteinin kompleksten ayrılmasını sağlar. TSC inaktivasyonu sayesinde GTP-bağlı Rheb proteini mTORC1 ile interaksiyona girer; bu sayede mTORC1, p70-S6 kinaz (S6K) ve ökaryotik başlatıcı faktör 4E bağlayıcı protein (4E-BP)'nin fosforilasyonuna neden olarak hücre büyüme ve proliferasyonunu sağlayan protein translasyonunun indüklenmesini sağlar. mTORC2 de hücre sağ kalımı ve hücre iskeleti organizasyonunda görev almaktadır [118]. Kanserde önemli olduğu saptanan sinyal iletim yolları arasında PI3K/AKT kinaz yolu, PKC ve MAPK ailesi sinyalizasyon zincirlerinde yer almaktadır. PI3K/AKT sinyal yolağı kanserin oluşmasında rol alan önemli yolaklardan biridir ve bu yolak çeşitli insan kanser türlerinde kontrolsüz olarak aktive olmaktadır.

PI3K yolağı epidermal büyüme faktörü gibi pek çok büyüme faktörleri ile tetiklenmekte ve çok sayıda önemli sinyal yolağı bileşenlerinin aktif hale gelmesini

sağlamaktadır. Bu bileşenlerden mTOR, PI3K ile ilişkili protein kinaz ailesinden serin/treonin kinazdır. PI3K/AKT/mTOR yolu, hücre canlılığı ve tümör hücrelerinde proliferasyonun desteklenmesinde önemli bir rol oynar. Normal hücre fonksiyonların yerine getirilebilmesi için gerekli olan başlıca sinyal yollarından biridir ve yüksek PI3K seviyesi, kanser açısından belirleyicidir. Kanser genom çalışmaları insan kanserlerinde en fazla değişime uğrayan yolak olarak belirlenmiştir. mTOR proteininin mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki tipi vardır. Bunlardan mTORC1, hücre büyümesinde PI3K/AKT sinyalleri veya diğer yollardan gelen sinyaller ile aktive edilebilen önemli bir yolaktır. Şekil 6.1’de gösterilmiştir.



Şekil 6.2 mTOR Aktivasyon yolları ve cevapları [116]

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu; hücre proliferasyonu, hücre transformasyonu, apoptozun önlenmesi, DNA tamiri, MDR1 gibi proteinlerin ekspresyonunu arttırıp değiştirdiği için ayrıca ilaç direncine neden olan moleküler mekanizmalarda rolü olması sebebiyle kanser gelişiminde ve tedavisinde önemli bir rolü vardır.

Bu yolğun çoğunlukla kanserde işleyişi bozulur ve bu sebeple de mTOR önemli bir antitümör hedef haline gelmiştir. mTOR proteininin aktifleştirici mutasyon ya da amplifikasyonları tespit edilen kanser türleri; pankreas, over, meme, idrar yolu, üst

solunum yolları, yemek borusu, cilt, akciğer, kolorektal, renal ve endometriyaldır. Antikanser ajanlar olarak mTOR inhibitörleri, *in vitro* ve *in vivo* olarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedirler.

Bu nedenle mTOR inhibitörleri birçok kanser türünün tedavisinde kullanılması hastalar için umut vadetmektedir [119]. Hücre ölümüne yol açan sinyal kaskadı yolunun bazı noktalarında apoptoz indüksiyonuna direnç gösterme özelliğine veya edinilmiş bir kabiliyete sahip olan kanser hücreleri, genellikle kemoterapiye veya radyoterapiye dirençli olma eğilimindedir. mTOR, PI3K sinyal iletiminin aktivasyonunda etkili temel bir kinazdır. mTOR proteini sitoplazmada bulunan mTOR kompleks mTORC1 ve mTORC2 bileşenlerinden oluşur. mTOR inhibitörleri sadece mTORC1'e özgüdürler, mTORC2'yi de etkilememektedir. mTOR, ilişkili protein komplekslerine bağlı olarak iki farklı fonksiyon göstermektedir. Buna örnek olarak mTORC1, mTOR'un ilişkili düzenleyici proteinlerinden ve diğer çeşitli proteinlerden oluşmaktadır [120]. mTORC1, mRNA translasyonunda protein sentezini düzenleyen mekanizmaları kontrol ederek hücresel büyümeyi yönetir ve ribozomal proteinler ile birlikte G1'in S-fazı hücre döngüsüne dönüşünü ve anjiyogenez düzenler. PI3K/AKT yolağının yukarı akış olan kısmı olan mTORC1, hormonlar, büyüme faktörleri, hipoksi ve hücre içi enerji düzeyleri gibi farklı sinyaller tarafından düzenlenmektedir. Ayrıca hipoksi durumlarında tümörün büyümesini sağlayan anjiyogenez yollarında yer alan hipoksi ile indüklenmiş faktörlerin, mRNA translasyonuna da yardımcı olur. mTOR kinaz aktivitesinin substratlarından biri 4EBP-1'dir ve mRNA translasyonunu başlatma faktörü 4E (eIF4E) aktivitesini düzenler. 4EBP-1 proteini pasif hücrelerde eIF4E aktivitesini baskılar böylece mRNA translasyonun başlamasını engeller [121,122]. Apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde de mTOR etkilidir. mTOR aktivasyonu hücre ölümünü düzenleyen p53, B-hücreli lenfoma 2 (BCL2), BCL2-antagonisti, p21, p27 ve c-myc gibi molekülleri inhibe eder.

Çalışmalarda mTOR'un tümör hücre motilitesinde, anjiyogenezinde ve kanser metastazlarının regülasyonunda önemli rol oynadığını gösterilmiştir. Hücre yaşam yollarından biri olan (PI3K)/AKT/mTOR yolağı son zamanlarda tümör oluşumu sırasında değişen ana sinyal yolları araştırılırken, AKT kinazın proliferasyon, apoptoz, farklılaşma ve hücre metabolizma gibi pek çok hücre işleminde önemli

bir düzenleyicisi olduğu ortaya çıkmıştır [122]. Bu sinyal yolağının çeşitli kanser türlerinde bozulmasının sıkça gözlenmesi AKT/mTOR yolağının tümör gelişminde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Akt proteininin aktifleştirici mutasyon ya da amplifikasyonları tespit edilen kanser türleri; böbrek, over, akciğer, cilt, tiroid, idrar yolu, menenjiyal, meme ve endometriyaldir.

Western blotlama (WB) tekniği, santral doğma görüşüne göre; DNA dan proteine doğru gerçekleşen genetik bilgi akışının sonlandığı proteinlerin tespit edilmesine dayanan bir tekniktir. Western Blot işlemini ilk tanımlayan 1979 yılında H. T. Towbin, ve 1981 yılında W. N. Burnettedir. Western blot (bazen protein immnoblott olarak adlandırılır), bir doku homojenat veya ekstrakt örneğindeki spesifik proteinleri tespit etmek için moleküler biyoloji, immnojenetik ve diğer moleküler biyoloji disiplinlerinde yaygın olarak kullanılan bir analitik tekniktir. Western blot kullanarak araştırmacılar, hücrelerden ekstrakte edilen karmaşıık bir protein karışımından spesifik proteinleri belirleyebilirler. Üç teknik kullanılır: büyüklüklerine göre proteinleri ayırma, katı bir desteğe aktarma ve hedef proteini görüntülemek için uygun bir birincil ve ikincil antikor kullanarak işaretleme. Kısacası, elektroforez işlemini yardımıyla jelde hareket ettirilen proteinlerin membrana üzerine geişı ve membrana transfer olmuş proteinlerin immunolojik metotlarla görüntülenmesi temeline dayanmaktadır [123]. Bu yöntem membran üzerinde bulunan az miktardaki proteinleri (1-5 ng) seviyesine kadar saptamaya elverişlidir. Araştırılan bir proteinin örnekte olup, olmadığı ve bulunuyorsa göreceli (yarı kantitatif) olarak farklı gruplar arasındaki miktarı hesaplanabilir. Western blotlama ile hedef proteinin belirlenmesinde ilk işlem homojenizasyondur. Bu aşamada, hücrelerin zar yapıları parçalanır ve elde edilen karışım homojenattır. Blotlama işleminden önce araştırılan örnekteki proteinler elektriksel ortamda jel üzerinde hareket ettirilmektedir. Proteinlerin ayrıştırılması için elektroforez kullanılmaktadır. Proteinler molekül ağırlıklarına göre artı kutba g etmektedir ve jel üzerinde bant şeklinde yoğunluk oluşturmaktadır. Western blotlama tekniği elektroforez işlemini takiben beş adımda gerçekleştirilir. İlk olarak proteinlerin membrana aktarımı (blotlama), ikinci olarak protein bağlanmamış yerlerin ilgisiz proteinlerle kapatılması yani bloklama işlemi ardından birincil antikor uygulanmasında protein kendine özgü antikorla muamele edilir [124].

Primer antikor seçimi tanınacak antijene bağlıdır, sonrasında ikincil antikor uygulanır ve sekonder antikor primer antikorun geliştirildiği canlıya bağlı olarak seçilir, primer antikor hangi canlıya ait ise sekonder antikorda aynı canlıya ait olmalıdır ve son olarak görüntülemeye antijen-antikor bağlantısının gerçekleştiği bölgelerde, antikordaki özel işaret aracılığıyla belirlenir [124].

8.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Doksorubisin hidroklorür Sigma
- Epigallokateşin gallat Sigma
- Rosmarinik asit Sigma
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS) Gibco
- Ham's F12 Hücre medyumunu Pan Biotech
- Tripsin-Edta (1:250) Gibco
- Fötal sığır serum (FBS) Gibco
- Antibiyotik (Penisilin/Streptomisin) Gibco
- WST-1 Roche
- LDS (lityum dodesil sülfat) sample buffer 4X Invitrogen
- NuPage MES SDS Running Buffer (20X) Invitrogen
- NuPage Reducing Agent (10x) Invitrogen
- Nitroselüloz transfer membran advansta
- RIPA Lysis Buffer System Santa-cruz

- PierceE ECL Western Blotting Substrate Thermo Scientific
- NuPAGE Novex Protein Gels Invitrogen
- Blotto, non-fat dry milk Santa cruz
- Glisin Fluka
- Metanol Sigma
- Tris baz Sigma
- Sodyum klorür Sigma
- TWEEN® 20 Sigma
- mTOR (7C10) Rabbit mAb Cell signaling technology
- Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody Cell signaling technology
- β -Actin (13E5) Rabbit mAb Cell signaling technology
- Etil Alkol Umaylab
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) Sigma
- Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa Thermo Fisher

8.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

• Laminar kabin	Esco
• İnkübatör	Binder
• Otoklav	Systec
• Buzdolabı	Arçelik
• Derin Dondurucu (-20°C)	Siemens
• Derin Dondurucu (-80°C)	New Brunswick
• İnkübatör (37 °C % 5 CO ₂ 'li)	Benchmark
• Faz-kontrast invert mikroskop	Zeiss
• Soğutmalı santrifüj	Sigma
• Otomatik pipetör	Hirschmannlaborgerate
• Pipet 10-100 µl	Transferpette Otomatik Pipet
• Pipet 20-200 µl	Eppendorf Otomatik Pipet
• Pipet 100-1000 µl	Eppendorf Otomatik Pipet
• Pipet 1-10 µl	Echo pipette Otomatik Pipet
• Vorteks	Heidolph Reax Top
• Analitik Terazî	Ohaus Explorer 214C
• Ayarlanabilir 8 kanallı pipet	Capp
• Mikroplakalı spektrofotometre	Thermo LabSystems
• Elektroforez Düzenegî	Molgen
• Güç kaynağı	Molgen

- ChemiDoc

BioRad

8.3 Kullanılan Sarf Malzemeler

- pH metre Oakton
- Falkon tüp (50 ml) Capp
- Hücre kültür kabı (25 cm²; 75 cm²) Corning flask
- Kriyo vial (1,5 ml) Isolab
- Mikroplaka (96 kuyulu) SPL Life science
- Pipet ucu (100-1000 µl) Mettler Toledo
- Pipet ucu (10-100 µl) Capp
- Falkon tüp (15 ml) Capp
- Steril enjektör ucu filtre (0,22 µm) Tpp
- Otoklavlanabilir schott şişe (250 ml; 500 ml; 1 l) Isolab
- Otoklav Bandı Isolab
- Nitril eldiven Hos-Pet
- Mikrotüpler için uygun portüp Isolab
- Falkon tüpler için uygun portüp Isolab
- Enjektör (2 ml) Set inject
- Blotlama kağıdı Thermo
- Neubauer-improved Lamı Isolab

9.1 Hücre Hattı

Çin hamsteri (*Cricetulus griseus*) ovaryumunun sağlıklı epitel hücre hattıdır. Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri, genellikle biyolojik ve tıbbi araştırmalarda ve ticari olarak terapötik proteinlerin üretiminde kullanılır. Özellikle rekombinant proteinleri eksprese etmek için genetik, toksisite taraması, beslenme ve gen ekspresyonu çalışmalarında geniş kullanım alanı bulmuşlardır. CHO hücreleri, rekombinant protein terapötiklerinin endüstriyel üretimi için en yaygın kullanılan memeli konakçılarıdır. 1948'de Çin hamsteri ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde araştırma laboratuvarlarında kullanılmıştır. 1957'de, Theodore T. Puck, Dr. George Yerganian'ın Boston Kanseri Araştırma Vakfı'ndaki laboratuvarından dışı Çin hamsteri almış ve orijinal Çin hamster overi (CHO) hücre hattını üretmek için kullanmıştır. O zamandan beri, CHO hücreleri, süspansiyon kültürü ve yüksek protein üretimindeki hızlı büyümeleri nedeniyle tercih edilen bir hücre hattı olmuştur [125].

9.1.2 Hücre Kültürü

Çin hamster overi hücre kültürü (5.pasaj) Tarım Bakanlığı Şap Enstitüsünden (Ankara) temin edildi. Bu hücreler hazır Ham's F12 kültür hücresi medyumunu (Pan Biotech, P04-14500) içerisinde, %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki inkübatörde, 25 cm²'lik flasklar içerisinde steril şartlarda inkübe edildi. Bu şekilde hücrelerin çoğalmaları sağlandı.

Her 500 ml medium içerisine ;

Ham's F12 Besi Yeri	500 ml
FBS	50 ml
Penisilin- streptomisin	5 ml

Fetal bovine serum (Gibco) ticari olarak satın alındı. Biyolojik güvenlik kabininde 50 ml'lik steril falkon tüplere bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Penisilin (10000 U/ ml) – streptomisin (10 mg/ ml) solüsyonu (Gibco) ticari olarak satın alındı. Biyolojik güvenlik kabininde 15ml'lik stereril falkon tüplere bölünerek kullanılıncaya kadar 20°C'de saklandı.

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS) Tamponu: Ticari olarak alındı ve biyolojik güvenlik kabininde 50 ml'lik falkonlara bölüdü. Oda sıcaklığında saklandı. Hücre kültürü çalışmalarının her basamağı steril kabinde gerçekleştirildi. Kabin kullanmadan önce ve sonra UV ışınına 30 dk. maruz bırakıldı ve kabinin içi ve kabinin içine alınan her malzeme %70'lik etil alkol ile steril edildi. Böylece, hücrede oluşabilecek kontaminasyon riski önlendi.

9.1.3 Hücrelerin Çoğaltılması

Hücrelerin çoğaltılması işlemi aşağıda yer alan basamakları takip ederek yapılmıştır.

1. -80°C'de, dondurma çözeltisi (%10 DMSO ve hücre medyumumu) içerisinde saklanan CHO hücreleri, araştırmadan inkübatörde oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Hücre kültürü çalışmalarında yapılan her işlem kontaminasyonu önlemek için steril şartlarda güvenlik kabininde gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan tüm eşyalar %70'lik alkol çözeltisi ile temizlendi.

2. İnkübatörde 37°C'ye getirilen hücre medyumumu ile vial içinde bulunan hücreler steril 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı, pipet yardımıyla besiyeri ile iyice homojenize edildikten sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

3. Santrifüjden sonra üst berrak kısım (süpernatant) atıldı. Daha sonra, hücre pelletine 1 ml besiyeri eklendi, yavaşca pipetleme yapılarak hücreler süspande edildi.

4. Hücreler 1 ml hücre ortamında içinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine 4 ml besiyeri eklenir. 5 ml'lik hücre süspansiyonu 25 cm²'lik flasklara ekildi. 75 cm²'lik flask kullanıldığında ise 15 ml besiyeri içerisinde 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldılar.

9.1.4 Hücre Kültürünün Pasajlanması

Hücre kültür flasklarının tüm yüzeyini tamamen kaplamış halde bulunan yoğunlaşmış hücreler için konfluent ifadesi kullanılır. Hücreler konfluent duruma geldiğinde pasajlanmalıdır.

1. Pasajlama için flask inkübatörden alındı, laminar kabinde flask içerisindeki medyum uzaklaştırıldı.
2. Tripsin konulmadan önce hücre medyumunun uzaklaştırılması için flask yüzeyi PBS ile yıkanmıştır. Böylece, tripsin aktivitesini azaltacak serum protein kalıntılarından uzaklaştırılmıştır.
3. Flaska yapışan hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması için 25 cm² flask için 1 ml tripsin 75 cm²'lik flask için 2 ml tripsin kullanıldı.
4. Tripsin içeren flask 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 5-10 dk. bekletildi.
5. Tripsin aktivasyonunu durdurmak amacıyla 25 cm² flaska 3 ml serumlu besiyeri, 75 cm²'lik flaska 5 ml serumlu besiyeri eklendi, pipetleme yapıldı ve hücreler 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Hücreler Neubauer lamı yardımıyla sayıldı.
6. Neubauer Lamında bulunan 4 kare içerisinde yer alan hücreler sayıldı ortalaması ardından 1 ml' deki hücre sayısı bulundu . Hücre sayısı, toplam hacim (tripsin+hücre medyumunu) ile çarpılır daha sonra 10⁴ ile çarpılarak hesaplanmıştır.
7. Falkon santrifüje konulup 1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve hücre pelleti 1 ml besiyeri ile süspanse edildi. Hücrelerin 1 ml'deki sayısı göz önüne alınarak yaklaşık 5x10⁵ hücre/ml olacak şekilde içerisinde 5 ml besiyeri bulunan 25 cm² flaslara ekildi. 75 cm² flaslklar için 10⁶ hücre/ml olacak şekilde içerisinde 15 ml besiyeri bulunacak şekilde ekim yapıldı.
8. Yeni pasajlanan hücrelerin pasaj numarası bir değer artacak şekilde %90 bağıl nem, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildiler. Hücre hattının devamlılığının sağlanması için pasajlama işlemi haftada 3 kez yapıldı.

9.1.5 Hücrelerin Dondurulması

Hücre kültüründe meydana gelebilecek kontaminasyon gibi risklere karşı hücreler belli aralıklar ile dondurularak saklandılar.

1. Hücrelerin pasajlanması işlemi sırasında tripsin kullanılarak hücreler kaldırılmıştır. Daha sonra konulan tripsin miktarının 3 katı kadar hücre medyumu kullanılmıştır sonra toplam hacmi 4 ml olan hücre vasatı, falkon tüp (15 ml) içine konulmuştur ve 1000 rpm (dakikadaki dönme sayısı)'de, 5 dk. santrifüj edilmiştir. Hücre sayısı invert mikroskopta neubauer lamı yardımıyla sayılmıştır.

2.Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüp içerisine DMSO içeren hücre medyumu eklenerek hücre peleti pipetleme yapılarak karıştırılmıştır.

3.Yaklaşık 10^6 hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre stokları soğuğa dayanıklı kriyo viallere aktarılmıştır, sırasıyla -20°C 'de 30 dk., -80°C 'de saklanmıştır.

Hücre Dondurma Besi Yeri

%10 DMSO

%90 FBS içeren besi yeri

9.2 Numunelerin hazırlaması

Doksorubisin hidroklorür : 1 mg doksorubisin hidroklorür 1.7 ml PBS (1X) içinde çözöldü. 1 mM konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. 100 µl olacak şekilde steril eppendorf tüplere dağıtıldı. Alüminyum folyo ile kapatılarak -20°C 'de saklandı.

Rosmarinik asit: 0.00216 g Rosmarinik asit 3 ml Ham's F12 besiyeri içinde çözöldü. Böylece 2 mM'lık RA çözeltisi elde edildi. Deney günü taze olarak hazırlanıp, seyreltilerek kullanıldı.

Epigallokateşin gallat: 0.000550 g Epigallokateşin gallat 3 ml Ham's F12 besiyeri içinde çözöldü. Böylece 400 µM'lık EGCG çözeltisi elde edildi. Deney günü taze olarak hazırlanıp, seyreltilerek kullanıldı.

9.3 WST-1 Testi

Bu testte WST-1 (Roche Cell Proliferation Reagent) kullanıldı.

Testin yapılışı:

96 kuyucuklu plaklara her kuyucuğa toplam hacmi 100 µl olacak şekilde 5×10^3 hücre, süspansiyon halde ekilmiştir. Hücre ekiminin ardından 96 kuyucuklu plaka 37° C'de, % 5 CO₂ oranı bulunan inkübatörde 24 saat inkübe edildikten sonra farklı konsantrasyonlarda RA, DOKS ve EGCG veya kombinasyonları eklenmiştir. Her bir grup için 3 kuyucuk kullanılmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonunda her kuyucuğa WST-1 (10 µl) solüsyonu eklenmiştir ve 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 60 dk bekletilmiştir. Kör kontrol amacıyla kuyucuğa 100 µL besiyeri ve 10 µl WST-1 eklendi. 1 saatin sonunda mikroparka 150 rpm'de 1 dk. orbital çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra mikroparka okuyuculu spektrofotometre yardımıyla 450 nm'de absorbans ölçülmüştür. Elde edilen optik densitometre değerlerinin, kontrol grubu optik densitometre değerlerine göre hücre canlılığı (%) olarak ifade edilmiş ve her grubun kendi kontrol grubunun hücre canlılık oranlarının %100 olduğu varsayılarak hesaplamalar yapılmıştır. Bir mikroparkadaki tekrarlar için absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ve kontrol ile örnek absorbanslarından kör absorbansı çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri elde edilerek hesaplama yapıldı. Çalışmada sitotoksik etki potansiyelleri IC₅₀ üzerinden değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı-konsantrasyon ölçü eğrisinin elde edilmesinin ardından IC₅₀ değeri eğri üzerinden hesaplanmıştır.

Metabolik aktivitenin belirlenmesinde aşağıdaki formülasyon uygulanmıştır.

% Metabolik aktivite (Hücre canlılığı) :

(Uygulama yapılan grubun absorbans değeri/Kontrol grubunun absorbans değeri)*100

Mosmann (1983) deney materyali uygulandıktan sonraki hücre canlılığı oranına göre sitotoksik etkiyi aşağıdaki skala ile derecelendirmiştir [95].

%90 ve üzeri hücre canlılığı → sitotoksik değil

%60-90 hücre canlılığı → hafif derecede sitotoksik

%30-59 arası hücre canlılığı → orta derecede sitotoksik

%30 ve altı hücre canlılığı → şiddetli derecede sitotoksik

9.4 Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Protein elde etmek için hücre lizisi gerçekleştirilmiştir. Adherent hücrelerden protein elde etme işlemi aşağıdaki gibidir.

1.6 kuyucuklu hücre plakasına soğuk PBS eklenerek ve hafifçe sallanarak hücreler yıkandı daha sonra PBS atıldı.

2. Her kuyucuğa 300 µl tripsin eklendi ve 5 dk. 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre koyuldu.

3. Hücreler kaldırıldıktan sonra soğuk 1 ml hücre medyumu eklendi.

4. 15 ml'lik falkonlara hücre süspansiyonu aktarıldı.

5. 1500 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra süpernatant atılmıştır.

6. Deney gruplarından izole edilen hücreler 1.5 ml'lik mikrofüj tüplerine kondu. Soğuk 300 µl RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer) liziz buffer, 10 µl PMSF, 15 µl Proteaz inhibitör kokteyli ve 10 µl sodyum ortovanadat eklenir.

7. Homojenizasyon işlemi için insülin iğnesi kullanılmıştır. Bu işlem buz içinde yapılmıştır. 3 dk. iğne ile homojenize edilmiştir.

8. Homojenizasyon işleminden sonra hücrelerin proteinli kısmını ayırtırmak amacıyla santrifüj yapılır. 14000 rpm'de, 4°C derecede, 7 dakika santrifüj edilir.

9. Süpernatant kısım deneyde kullanılmak üzere mikropipet yardımıyla 0.5 ml'lik mikrofüj tüplerine eşit miktarda koyularak, -80 °C' de kullanıncaya kadar saklanmıştır.

10. Örneklerden 1 µl alınarak Gen5 programı ile spektrofotometrik analiz yapılarak protein ölçümü yapıldı. Tüm gruplarda yaklaşık olarak 1.5 mg/ml protein miktarı ölçüldü.

9.5 Western Blot Analizi

1x TBST (1l)

Trizma-Base 6.055 g

NaCl	8.766 g
------	---------

Distile su	800 ml
------------	--------

pH; 7.4'e ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı. Hazırlanan TBS 1x olduğu için Tween 20'de 1000'e 1 oranında koyuldu. 1000 ml TBS için 1 ml Tween 20 konuldu.

Blotlama tamponu (1l)

Trizma- Base	3 g
--------------	-----

Glisin	14.3 g
--------	--------

Metanol	200 ml
---------	--------

Distile su	800 ml
------------	--------

Trizma-Base ve glisin 700 ml distile su içerisinde çözündürüldü. pH 7.8-8 arasında olmalıdır. Ayrıca bir pH ayarlaması yapılmaz. Üzerine 200 ml metanol eklenir toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır. 4°C derecede kullanıncaya kadar soğutuldu.

Ticari olarak satın alınan NuPage MES SDS Running Buffer (20X)

20 kat dilue edildi.

Distile su	950 ml
------------	--------

Running Buffer	50 l
----------------	------

1. Deney gruplarından izole edilen protein örneklerinden 13 µl alınarak yükleme tamponu (5 µl LDS ve 2 µl redükleme ajanı) ile karıştırıldı. 10 dk. 70 °C'de inkübe edildi.

2.Elektroforez sistemi kuruldu. Ticari olarak alınan jel distile su ile yıkandı ve alt kısmında bulunan bant kısmı çıkartılarak tankın içine yerleştirildi.

3.Yürütme tankının içine 1xruning buffer eklendi. Jelin tarak kısmı çıkartıldı ve kuyucuklar running buffer ile yıkandı.

- 4.Yıkama işleminden sonra ilk kuyucuk boş bırakıldıktan sonra 2. kuyucuğa prestained protein belirteci 7 µl konuldu. Jelin diğer boş kuyucuklarına 18 µl örneklerden yüklendi.
- 5.Örnekler yüklendikten sonra sistem yerleştirilip elektrotlar bağlandı akabinde voltaj ayarlandı.
- 6.Elektroforezde numuneler ilk önce 120V 30mA'de 20 dakika, sonrasında ise 80V 30mA'de yürütüldü.
- 7.Elektrofezin ardından jeldeki proteinleri membrana aktarmak için immunoblotting yapıldı.
- 8.Membran ve jel sandviç yöntemiyle western blot transfer aparatına (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) yerleştirildi. Bu işlem için sünger ve filtre blotlama tamponu ile ıslatıldı. Siyah kısma öncelikle sünger konuldu üzerine bir adet kalın transfer kağıdı ve onunda üzerine jel koyuldu. Jelin üzerine membran boşluk ve baloncuk olmayacak düzgün bir şekilde yerleştirildi ve yine sırasıyla filtre kağıdı ve sünger konuldu.
9. Transfer aparatına yine siyah taraf siyah tarafa gelecek şekilde yerleştirildi.
- 10.Blotlama işlemi 15V 90mA'de gece boyu +4°C'de gerçekleştirildi.
11. Proteinlerin nitrosellüloz membrana transferinden sonra, pH'sı 7.4 olan, % 0.1 Tween-20-Tris Buffer Solüsyonu (TBS-T) ile yıkama yapılarak membran TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile oda ısında 1 saat süre bloklandı.
- 12.Membran daha sonra 1:1000 oranında dilüe edilmiş mTOR antikoru veya β-aktin (10 ml TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu + 10 µl mTOR/ β-aktin antikoru) ile +4°C'de gece boyu inkübe edildi. β-aktin referans protein, kontrol olarak kullanılmıştır.
- 13.İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanarak, sekonder antikorla oda sıcaklığında 2 saat % 5 oranında süt tozu ile 1xTBST içerisinde hazırlanan sekonder antikor (1:2000 dilüe Anti-Mouse IgG veya Anti-Rabbit IgG) ile inkübe edilmiştir.
- 14.İnkübasyon bittikten sonra 3'er kez TBST ile yıkama yapılmıştır.

15.İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanıp kemiluminisans ile 5 dakika karanlıkta inkübe edilip ardından görüntülendi.

16. Membran üstünde çıkan bantlar ImageJ programıyla analiz edilmiştir.

9.6 İstatiksel Analizler

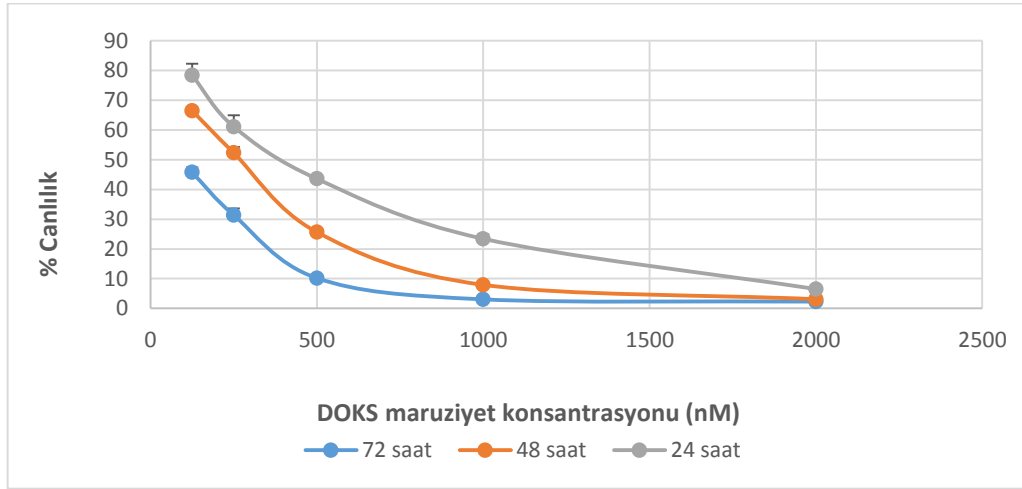
Yapılan deney sonuçlarından elde edilen verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism 5 programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD şeklinde verilmiştir. Gruplar arası anlamlılıklar, varyans analizi yöntemi tek-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçların güven aralığı $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

10.1 Sitotoksisite Sonuçları

Sitotoksisiteyi belirlemek için 24,48 ve 72 saat süreyle DOKS, EGCG ve RA, CHO hücrelerine uygulanmıştır. Hücre canlılığını azaltan DOKS dozuna karşılık EGCG, RA ve kombinasyonlarının koruyucu etkilerine bakılmıştır. Sitotoksisite sonuçlarına göre bulunan konsantrasyonlar Western analizinde de kullanılmış ve mTOR proteinine bakılmıştır.

10.1.1 CHO hücrelerine DOKS uygulanması

DOKS 24, 48 ve 72 saat (125-2000 nM) aralığında uygulandı ve IC50 değerleri bulunmuştur.



Şekil 10.1 24, 48 ve 72 saat DOKS maruziyeti sonucunda % canlılık değerleri

Tablo 10.1 24, 48 ve 72 saat 125-2000 nM konsantrasyon aralığında DOKS maruziyeti yapılan CHO hücrelerinde WST1 testi % canlılık ve standart sapma değerleri.

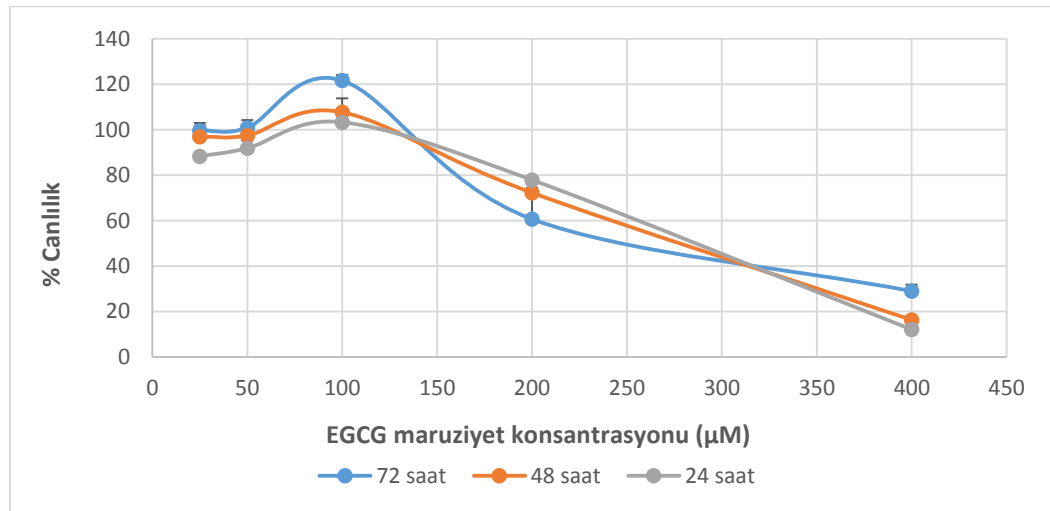
Maruziyet konsantrasyonu (nM)	% Canlılık $\pm$ SD		
	24 saat	48 saat	72 saat
125	78,39 $\pm$ 3,92	66,49 $\pm$ 0,74	45,75 $\pm$ 1,67*
250	61,12 $\pm$ 3,83*,a	52,32 $\pm$ 2,00*,a	31,40 $\pm$ 2,17*,a
500	43,58 $\pm$ 0,41*,a,b	25,66 $\pm$ 0,01*,a,b	10,19 $\pm$ 0,73*,a,b,
1000	23,42 $\pm$ 1,44*,a,b,c	7,93 $\pm$ 0,30*,a,b,c	3,04 $\pm$ 0,52*,a,b,c
2000	6,51 $\pm$ 0,78*,a,b,c,d	3,10 $\pm$ 0,07*,a,b,c,d	2,30 $\pm$ 0,19*,a,b,c

* p<0,05 negatif kontrol ile kıyaslanmıştır. ^a p<0,05, DOKS 125 nM, ^b p<0,005, DOKS 250 nM, ^c p<0,005 DOKS 500 nM ve ^d p<0,005 DOKS 1000 nM ile kıyaslanmıştır. (Sonuçlar üç çalışmanın ortalaması $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirilmiştir. Kontrol grubu olarak fosfat tamponlu tuz çözeltisi uygulanmıştır. (Doksorubisin'e maruz bırakılmayan grup olan negatif kontrol için hücre canlılığı %100 alınmıştır). Her grup kendi zaman diliminde uygulanan gruplarla kıyaslanmıştır.

DOKS'un 24 saat maruziyetten sonra IC₅₀ değeri 696.817 nM, 48 saat maruz bırakılınca 467 nM ve 72 saat maruz bırakılınca 131.008 nM olarak bulunmuştur. Maruziyet süresi arttıkça hücrelerin yarısını öldüren doz miktarı da azalmıştır.

10.1.2 CHO hücrelerine EGCG uygulanması

EGCG 24, 48 ve 72 saat (25-400 μ M) aralığında uygulandı ve IC₅₀ değerleri bulunmuştur.



Şekil 10.2 24, 48 ve 72 saat EGCG maruziyeti sonucunda % canlılık değerleri

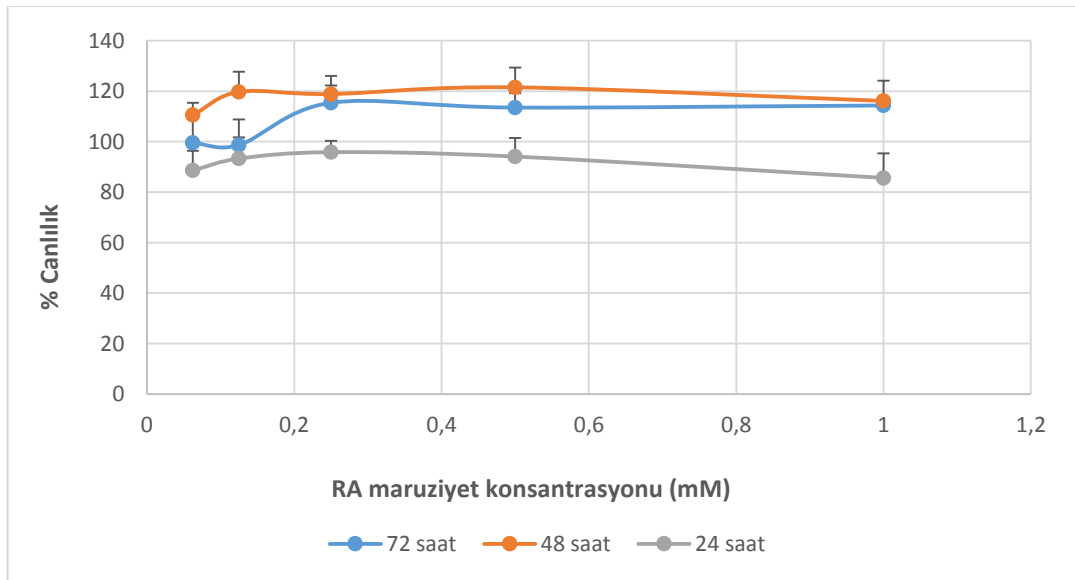
Tablo 10.2 24, 48 ve 72 saat 25-400 μM konsantrasyon aralığında EGCG maruziyeti yapılan CHO hücrelerinde WST1 testi % canlılık ve standart sapma değerleri

Maruziyet konsantrasyonu (μM)	% Canlılık $\pm$ SD		
	24 saat	48 saat	72 saat
25	99,64 $\pm$ 1,01	96,96 $\pm$ 6,02	88,32 $\pm$ 2,15
50	100,89 $\pm$ 3,33	97,47 $\pm$ 1,57	91,87 $\pm$ 3,32
100	121,67 $\pm$ 10,48	107,70 $\pm$ 0,89 ^{a,b}	103,32 $\pm$ 2,51 ^a
200	60,66 $\pm$ 0,41 ^{a,b,c}	72,26 $\pm$ 2,26 ^{a,b,c}	77,91 $\pm$ 10,82 ^{b,c}
400	28,95 $\pm$ 3,71 ^{a,b,c}	16,27 $\pm$ 1,43 ^{a,b,c,d}	12,03 $\pm$ 2,79 ^{a,b,c,d}

* $p < 0,05$ negatif kontrol ile kıyaslanmıştır. ^a $p < 0,05$, EGCG 25 μM , ^b $p < 0,005$, EGCG 50 μM , ^c $p < 0,005$ EGCG 100 μM ve ^d $p < 0,005$ EGCG 200 μM ile kıyaslanmıştır). Epigallokateşin gallat uygulanan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır. Her grup kendi zaman diliminde uygulanan gruplarla kıyaslanmıştır. Kontrol grubu olarak fosfat tamponlu tuz çözeltisi uygulanmıştır. EGCG'nin 24 saat maruziyetten sonra IC50 değeri 304.980 μM , 48 saat maruz bırakılınca 276.694 μM ve 72 saat maruz bırakılınca 267,511 μM olarak bulunmuştur. Maruziyet süresi arttıkça hücrelerin yarısını öldüren IC50 değeri de azalmıştır.

10.1.3 CHO hücrelerine RA uygulanması

RA 24, 48 ve 72 saat (0.0625- 1 mM) aralığında uygulandı ve uygulanan yüksek dozlara rağmen RA'nın hücre canlılığına olan etkisi bulunamamıştır. IC50 değeri bulunamamıştır.



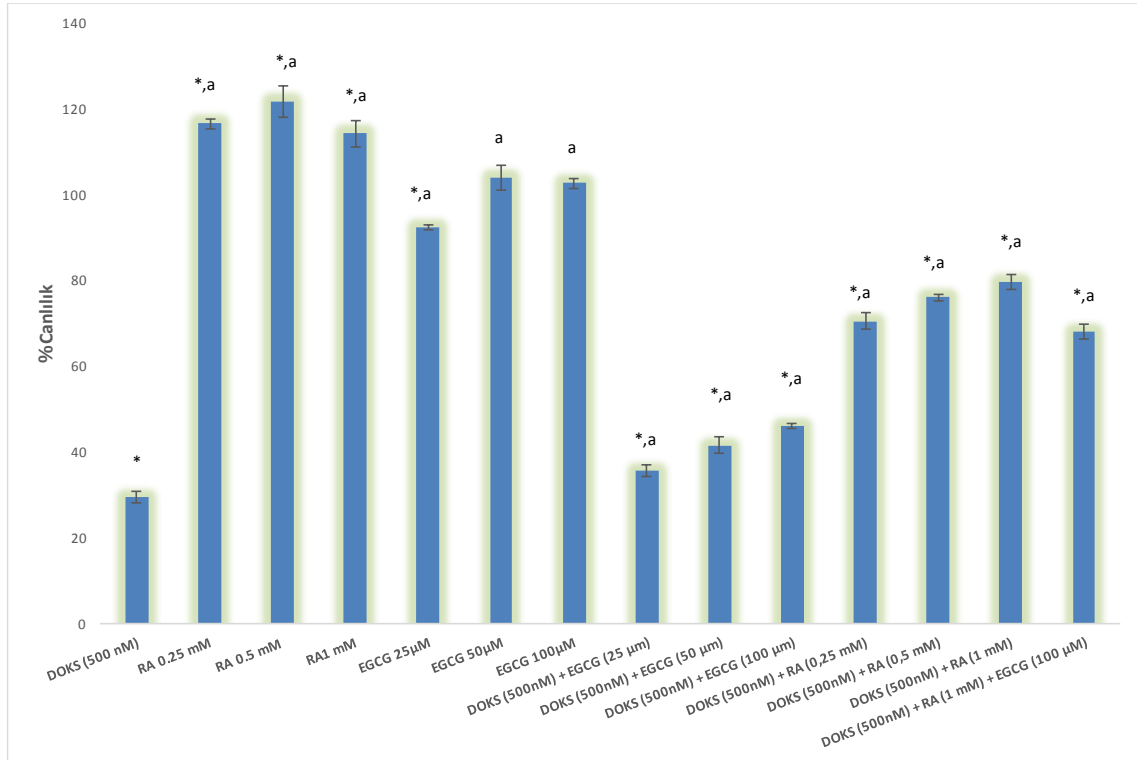
Şekil 10.3 24, 48 ve 72 saat RA maruziyeti sonucunda % canlılık değerleri

Tablo 10.3 24, 48 ve 72 saat 0.0625-1 mM konsantrasyon aralığında RA maruziyeti yapılan CHO hücrelerinde WST1 testi % canlılık ve standart sapma değerleri.

Maruziyet konsantrasyonu (mM)	% Canlılık $\pm$ SD		
	24 saat	48 saat	72 saat
0.0625	99,46 $\pm$ 7,82	110,51 $\pm$ 4,83	88,58 $\pm$ 9,81
0.125	98,65 $\pm$ 8,46	119,69 $\pm$ 7,96*	93,26 $\pm$ 10,15
0.25	115,38 $\pm$ 4,42	118,84 $\pm$ 7,21*	95,81 $\pm$ 6,84
0.5	113,49 $\pm$ 7,34	121,50 $\pm$ 7,81*	94,07 $\pm$ 5,75
1	114,30 $\pm$ 9,72	116,13 $\pm$ 0,83*	85,62 $\pm$ 9,77

*p<0,05 negatif kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Rosmarinik asit'e maruz bırakılmayan grup için hücre canlılığı %100 alınmıştır. Kontrol grubu olarak fosfat tamponlu tuz çözeltisi uygulanmıştır. 48 saat süre ile uygulanan grupta kontrol grubuna göre hücre canlılığında farklılıklar görülmüştür.

10.1.4 CHO hücrelerine DOKS, RA, EGCG ve kombinlerinin uygulanması



*p<0,05 negatif kontrol grubu ve ^a p<0,05 DOKS 500nM ile kıyaslanmıştır. Hücre canlılığı %100 alınmıştır, negatif kontrol olarak fosfat tamponlu tuz çözeltisi uygulanmıştır. 24 saat süre ile uygulanan grupta kontrol grubuna göre ve sadece doksorubisin 500nM uygulanan pozitif kontrol grubuna göre hücre canlılığında farklılıklar görülmüştür.

Şekil 10.4 24 saat maruziyet sonucunda DOKS,RA,EGCG ve kombinlerinin % canlılık değerleri

10.2 Western Blot Analizi ile mTOR Aktivasyonunun Değerlendirilmesi

CHO hücreleri belirtilen dozlarda DOKS, RA ve EGCG'ye 37°C' de, % 5 CO₂ içeren ortamda 24 saat inkübe edilmiş ve metot kısmında belirtildiği gibi Western Blot analizi için uygun hale getirilmiştir. Bu metotla mTOR ifadesi analiz edilmiştir. Ayrıca bir housekeeping gen olan B-aktin geninin ifadesi de bu yöntemde yüklenen protein miktarlarının denk olduğunu göstermek amacıyla kontrol proteini olarak kullanılmıştır. mTOR proteini 289 kDa ağırlığında ve B-aktin proteini 42 kDa ağırlığındadır. Western Blot analizi sonucunda veriler Image J programıyla değerlendirilmiştir.

mTOR için kullanılan antikorlar

Primer Antikor:

- mTOR Rabbit Ab (7C10) #2983 Cell sign.
- 1:1000 %5 Süt tozu in TBS-T
- +4 C, gece boyunca

İkincil Antikor:

- Anti rabbit sekonder HRP #7074 Cell sign.
- 1:500 %5 Süt tozu in TBS-T
- Oda sıcaklığı, 2 saat

Beta-aktin için kullanılan antikorlar

Primer Antikor:

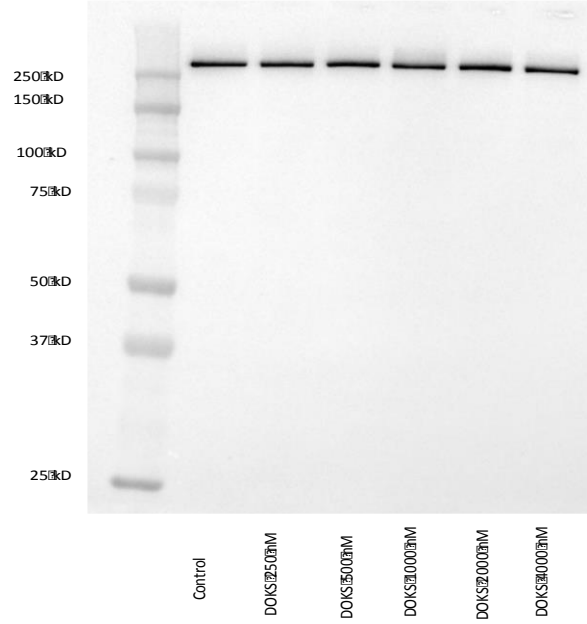
- Beta aktin (8H10D10) mAB (HRP Konjug) #12262S Cell sign
- 1:1000 %5 Süt tozu in TBS-T
- +4 C, gece boyunca

İkincil Antikor:

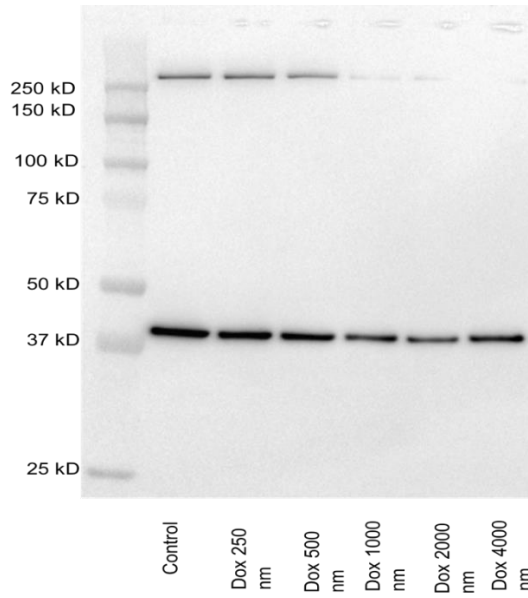
- Amersham ECL anti-Mouse IgG, HRP-linked whole Ab

- 1:500 %5 süt tozu in TBS-T
- Oda sıcaklığında, 2 saat

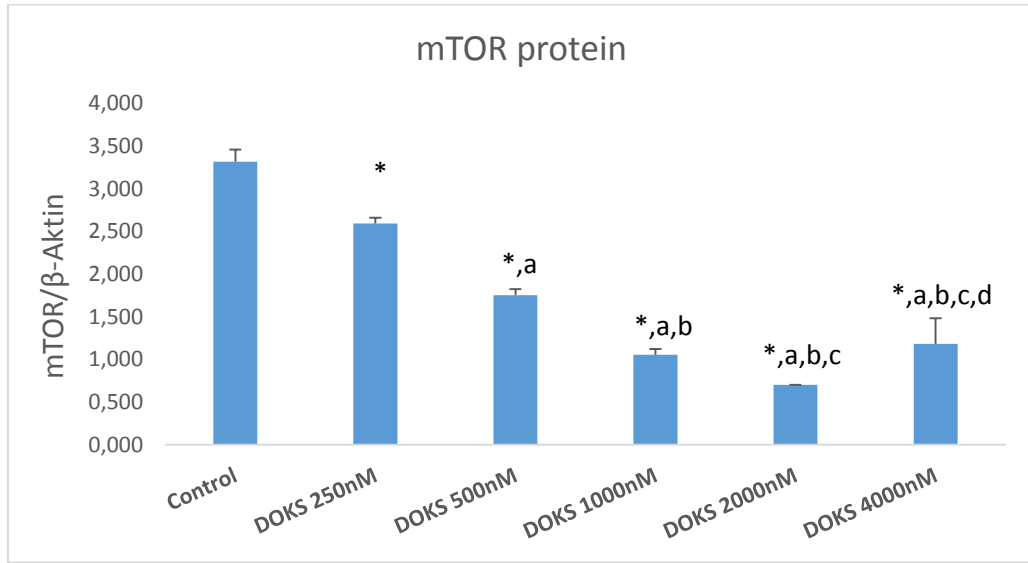
10.2.1 DOKS Doz-Cevap Sonuçları



Şekil 10.5 24 saat DOKS uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile mTOR ifade düzeyi



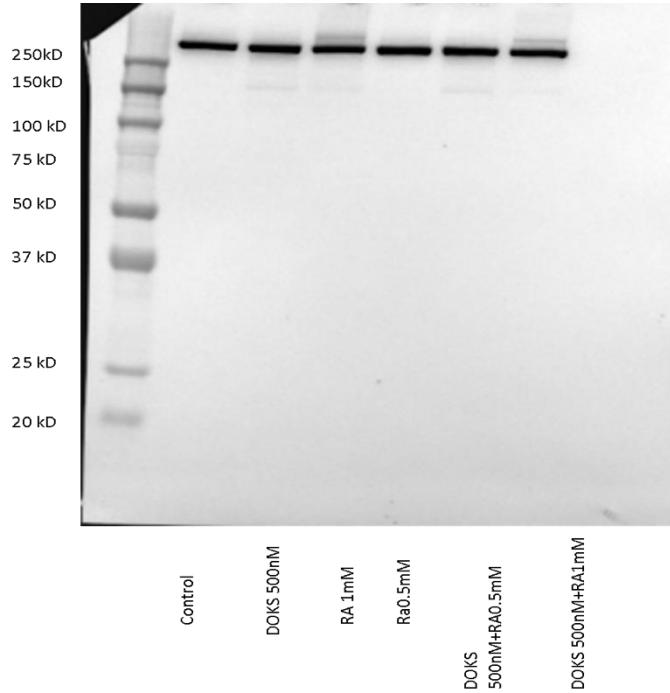
Şekil 10.6 24 saat DOKS uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile β -Aktin ifade düzeyi



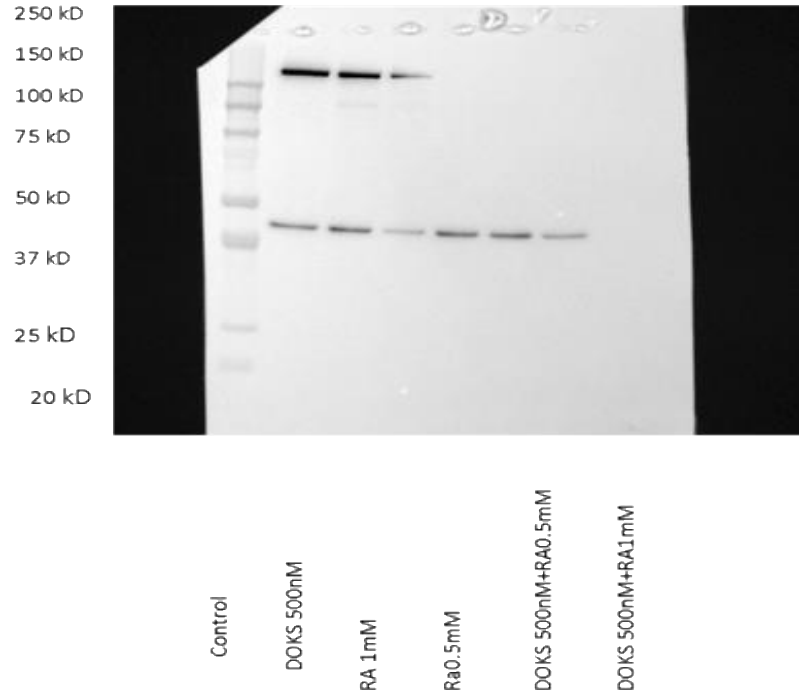
*p<0,05 negatif kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. ^ap<0,05 DOKS 250nM, ^bp<0,05 DOKS 500nM, ^cp<0,05 DOKS 1000nM ve ^dp<0,05 DOKS 2000nM ile kıyaslanmıştır.

Şekil 10.7 mTOR protein ifadesinin mTOR/β-Aktin olarak ifade edilmesi

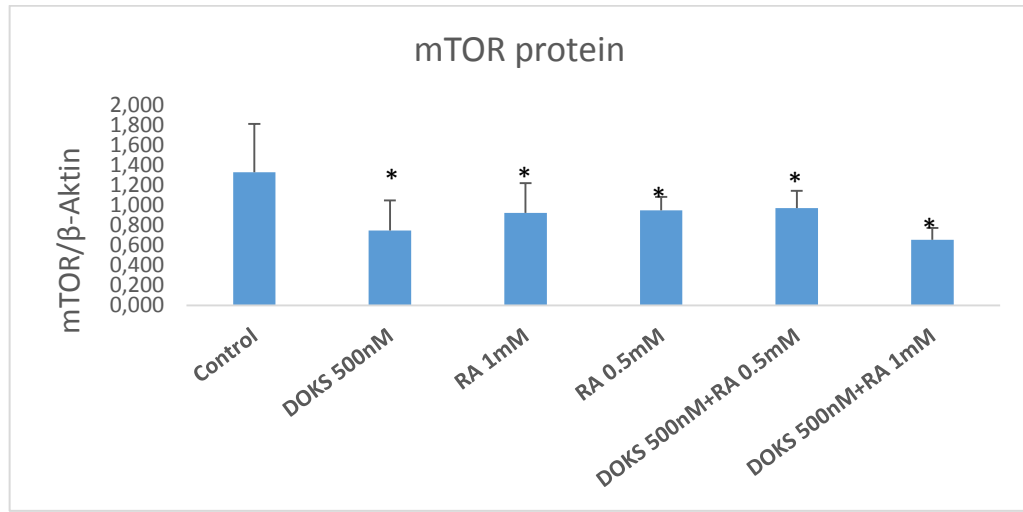
10.2.2 DOKS ve RA Doz-Cevap Sonuçları



Şekil 10.8 24 saat DOKS ve RA uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile mTOR ifade düzeyi



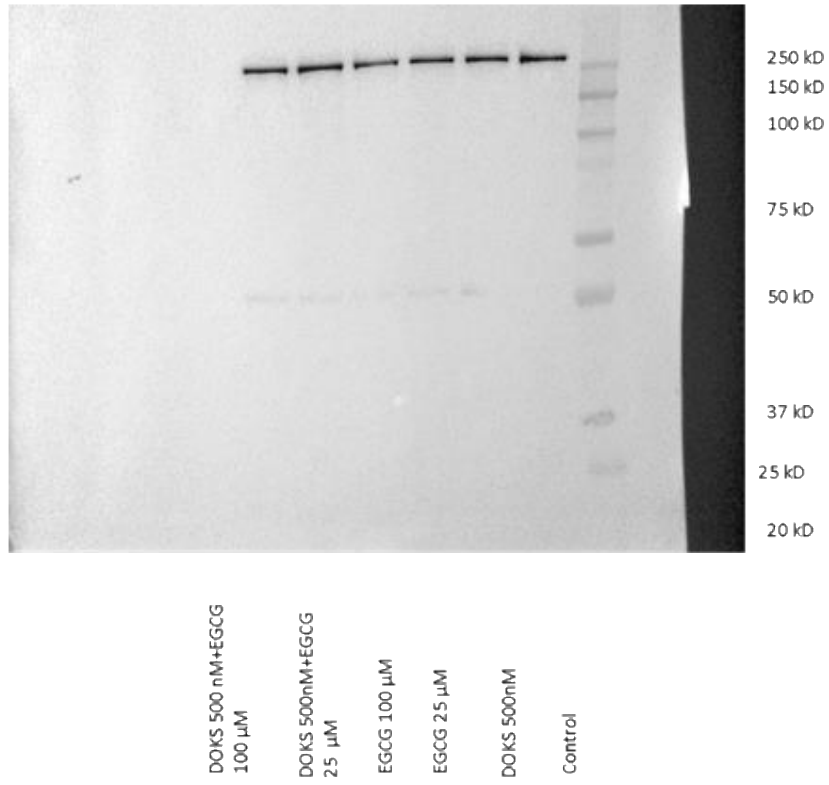
Şekil 10.9 24 saat DOKS ve RA uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile β -Aktin ifade düzeyi



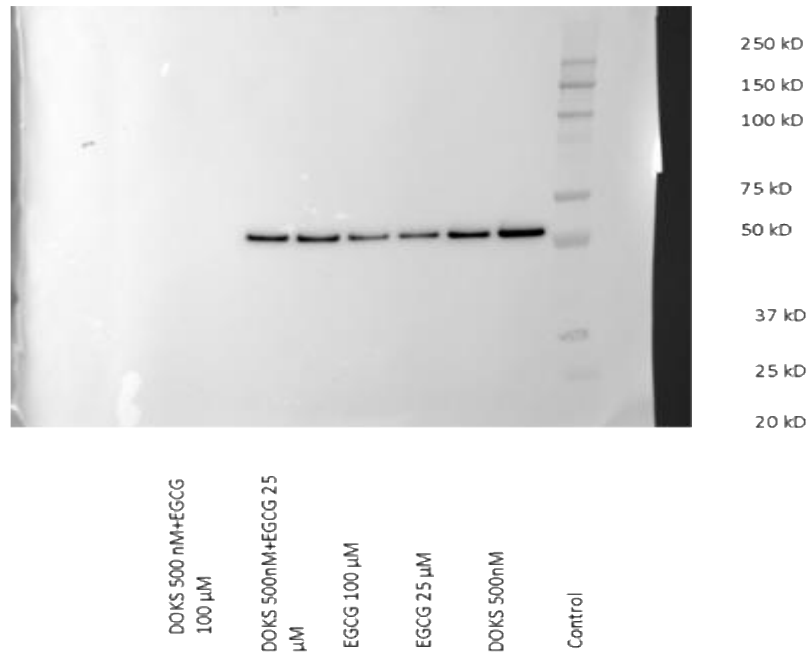
*p<0,05 negatif kontrol grubu ile kıyaslanmıştır.

Şekil 10.10 mTOR protein ifadesinin mTOR/ β -Aktin olarak ifade edilmesi

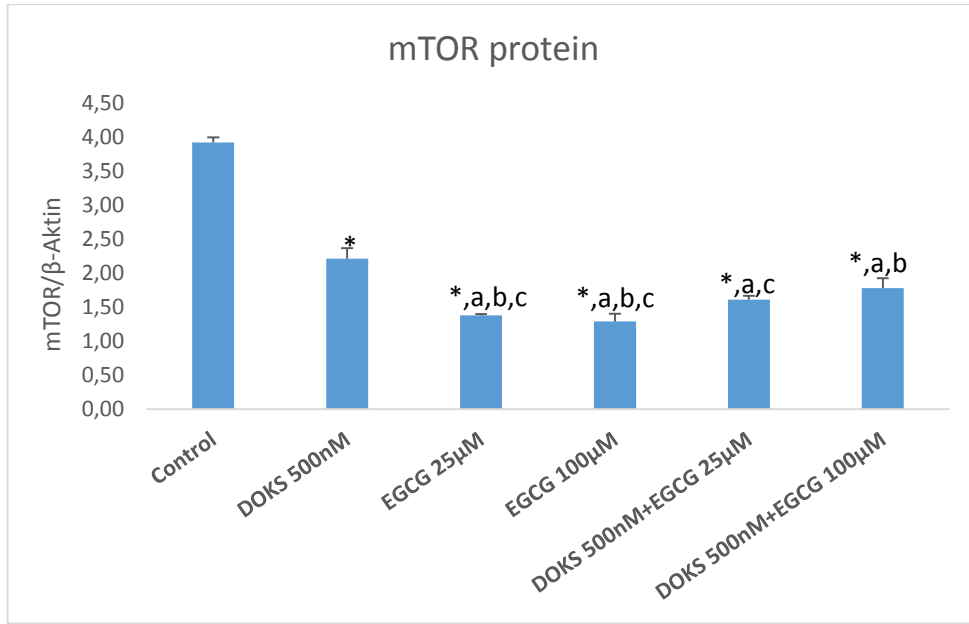
10.2.3 DOKS ve EGCG Doz-Cevap Sonuçları



Şekil 10.11 24 saat DOKS ve EGCG uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile mTOR ifade düzeyi



Şekil 10.12 24 saat DOKS ve EGCG uygulanan CHO hücrelerinde WB analizi ile β -Aktin ifade düzeyi



*p<0,05 negatif kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. *p<0,05 DOKS 500nM, ^bp<0,05 DOKS 500nM+EGCG25μM, ^cp<0,05 DOKS500nM+EGCG100μM ve ile kıyaslanmıştır.

Şekil 10.13 mTOR protein ifadesinin mTOR/β-Aktin olarak ifade edilmesi

Western blot sonuçları değerlendirildiği zaman kontrol grubuna kıyasla DOKS'un artan dozlarda uygulandığı zaman en yüksek doz dışında mTOR seviyesi doza bağlı olarak azalmıştır. mTOR seviyesinde gerçekleşen bu azalmayı DOKS'un oluşturduğu oksidatif stress ve serbest radikallerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Literatürde yer alan çalışmalar değerlendirildiği zaman oksidatif stresin mTORC1' i düzenlediği ve reaktif oksijen türlerinin mTOR sinyal yolağını inhibe ettiği belirtilmiştir [126]. Orta derecede stres yoğunluğunun, mTOR aktivitesini kısmen baskılanmasına neden olabileceği ve stres-adaptasyon genlerinin indüklenmesi ile stres tepkilerini başlatabileceği ayrıca, yüksek yoğunluklu stres mTOR'u baskılayabileceği belirtilmiştir [127]. Son deneysel kanıtlar, mTOR aktivasyonunun reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırdığını, mTOR inhibisyonunun da seviyesini düşürdüğünü göstermiştir [128]. mTOR'un oksidatif stress ile inhibe edildiği veya aktive edildiğine dair farklı raporlar bulunmaktadır. Bu farklılık hücre tipine veya oksidanın türüne bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir [129]. EGCG uygulanan gruplarda mTOR seviyesi düşmüştür. Bu düşüşün EGCG'nin pro-oksident özelliğinden kaynaklandığından düşünülmektedir [130].

EGCG'nin mitokondriyal membran potansiyeli kaybına, bunun da mitokondriyal disfonksiyonun hücre içi reaktif oksijen türlerinde artışına neden olduğunu

gösteren çalışmalar bulunmaktadır [131]. Aynı zamanda RA uygulanan grupta mTOR seviyesi bu çalışmada düşmüştür. Bu düşüşün RA'nın prooksidatif etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Sitotoksikite çalışmalarında DOKS ve EGCG için IC50 değeri hesaplanırken RA için IC50 değeri hesaplanamıştır. Hücre canlılığı RA uygulanan gruplarda azalma göstermemiştir. Fakat benzer araştırmanın yer aldığı bir çalışmada RA için 24 saat maruz kalan CHO hücresinde IC50 değeri 150µM olarak bulunmuştur [11]. Başka çalışmada, EGCG, CHO hücre hattına 24 saat süreyle 1mM EGCG uygulandığında hücre canlılığı %42 olarak bulunmuştur [16]. Bizim çalışmamızda 24 saat uygulandığında IC50 304.980 µM olarak bulundu. DOKS'un 24 saat maruziyetten sonra IC50 değeri 696.817 nM, 48 saat maruz bırakılınca 467 nM ve 72 saat maruz bırakılınca 131.008 nM olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızdan farklı olarak bir diğer çalışmada DOKS 2 saat maruz bırakılan CHO hücrelerinde DOKS 3 µM hiçbir sitotoksik etki oluşturmadığı belirtilmiştir [132].

DOKS 500nM dozu RA ve EGCG'nin koruyucu etkilerini değerlendirmek için hemde western blot analizinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Bu doz 24 saat boyunca CHO hücrelerine uygulanmıştır. DOKS'un oluşturduğu sitotoksikiteye karşı RA'nın koruyucu etkisi EGCG'den daha fazla bulunmuştur. Western blot analizinde ise mTOR seviyesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Bunun nedeninin hücrelerde oluşan oksidatif stres kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. İleri çalışmalarda mTOR yolağında yer alan diğer parametrelere ve uygulanan maddelerin hücre üzerinde oluşturduğu oksidatif stres ölçülebilir. Ayrıca, fenolik bileşiklerin güvenli kullanımları için yararlı ve toksik etkilerini doğrulamak amacıyla ileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmalıdır. Yapılan bu çalışmada öncelikle RA, EGCG ve DOKS'un tek başına ve kombinasyonlarının 24,48,72 saat süreyle sitotoksikiteyi araştırılmıştır. Bu maddeler için daha önce yapılan araştırmalar değerlendirildiğinde, maksimum inhibisyon konsantrasyonları (IC50) farklı hücre hatlarında, farklı zamanlarda uygulanmış ve yer alan çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Bir çalışmada, RA'nın glioblastoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu (24 saat inkübasyondan sonra IC50 değeri 290.5 µM ve 48 saat sonra IC50 171.3 µM) olarak verilmiştir. 80-130 µM konsantrasyonundaki RA, hücre proliferasyonunu baskıladığı ve antioksidan etkiye sahip olduğunu ancak 200 µM ve

daha yüksek RA konsantrasyonlarının pro-oksidant etkiye sahip olduğu ve nekroz yoluyla hücre ölümünü başlattığı bildirilmiştir [6]. Bir diğerk çalışmada RA bileşigi, *P. vulgaris* L. ve *Prunella grandiflora* L. türlerinden etanol ekstraktlarından saflaştırılarak elde edilmiştir. *Prunella* L.' den saflaştırılan RA'nın farklı kanser hücreleri üzerinde WST-1 yöntemiyle sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır. Buna göre prostat (PC-3), pankreas (PANC-1), meme (MDA-MB 436) ve kolon (HT-29) kanser hücre hatları ile GBM (T98G) hücre hatları ve lenf dokularında 10-60 ng arasında 24 ve 48 saat süreleri ile sitotoksik doz belirleme çalışmaları yapılmıştır. 48 saat inkübasyon süresinden sonra PC3 hücre hattı için 50 ng ve diğerk kullanılan hücre hatlarında 60 ng RA uygulamasının antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiş ve sağlıklı hücre hatlarında RA'nın sitotoksik etkisi gözlenmemiştir [7]. Benzer bir çalışmada dört farklı insan kanser hücre hattında *in vitro* olarak RA'nın sitotoksisitesi değerlendirilmiştir. İnsan serviks adenokarsinomu HeLa hücreleri, insan melanomu FemX hücreleri, insan kronik miyeloid lösemi K562 hücreleri ve insan yumurtalık SKOV3 hücreleri kullanılmıştır. IC50 (µg/ml) değerleri HeLa hücreleri için 41.29±1.28, FemX hücre hattı için 53.24±3.24, K562 hücrelerinde 29.51±0.72 ve SKOV3 hücre hattında da 59.24±1.06 olarak bulunmuştur [8]. Türkiye'de yapılan araştırmada üç farklı bölgeden *Rosmarinus officinalis* toplanmıştır. Yapraklarından hem metanolik hem de süperkritik CO₂ ekstraksiyonu ile altı farklı ekstrakt ayrıca aktif bileşik olan karnosik asit ve RA çeşitli insan kanser hücre hatlarına uygulanmıştır. Ekstraktlar ve aktif bileşik RA, NCI-H82 (insan, küçük hücreli akciğerk karsinomu), DU-145 (insan, prostat karsinomu), Hep- 3B (insan, siyah, karaciğerk karsinomu, hepatosellüler), K-562 (insan kronik miyeloid lösemi), MCF-7 (insan meme adenokarsinomu), PC-3 (insan prostat adenokarsinomu) ve MDA-MB-231 (insan, meme adenokarsinomu) MTT deneyi ile sitotoksisite deneyi yapılmıştır. Hücre ölümü açısından sitotoksik etkiler PC-3,DU-145, Hep-3B,MCF-7, K-562 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 6,25 ila 100 µg/ml aralığında değışen dozlarda 48 saat süre uygulanmıştır.

RA, 50 µg/ml konsantrasyonunda % 98 ile 205 arasında değışen değerlerde hücre canlılığı göstermiş neredeyse hiç inhibitör etki göstermemiştir. RA, K-562 hücrelerinde en yüksek etkiye sahip olarak görölmüştür. En yüksek konsantrasyon olan 139µM (50 µg /ml)'de %205 hücre canlılığı sergilemiştir. Diğerk test edilen hemen hemen tüm hücre hatlarında sitotoksik aktivite yerine proliferatif etki

göstermiştir [9]. Benzer şekilde RA'nın, insan lösemi hücrelerinde hücre canlılığı üzerinde çok az etki gösterdiğini de başka araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [10].

RA'nın sitotoksitesi 0-400 μM doz aralığında 24 saat maruziyet ile sağlıklı hücre hattı Çin hamster overi hücreleri (CHO) ve tümör hücre hatlarında, İnsan meme kanseri hücreleri (BT-474) ve HeLa kullanılarak nötral kırmızı alım yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, RA'nın CHO hücre hattında, önemli sitotoksik etkileri olduğu görülmüştür. Ancak HeLa ve BT-474 kanser hücrelerinde, bu bileşiğin farklı özellik göstererek bu hücrelerde sitotoksik olmadıkları görülmüştür. RA için CHO hücresinde IC50 değeri 150 μM olarak, HeLa ve BT-474 hücre hatlarında IC50 değeri bulunamamıştır [11].

EGCG'nin sitotoksitesini değerlendirmek için literatürde yer alan çalışmalardan birinde kullanılan hücre hatları, ilk olarak çay alımına maruz kalan insan ağız boşluğu dokuları olduğu düşünülerek bu dokuları oluşturan hücreler kullanılmıştır. Bunun için, dil karsinomu hücresi CAL27, damak karsinomu hücresi HSC-2, S-G diş eti epitel hücresi, HSG1, tükürük bezi karsinom hücresi, HGF-1 normal jinjival fibroblastı, GN56, normal jinjival fibroblastı olmak üzere 6 farklı hücre hattı kullanılmıştır. 72 saat EGCG (0-300 μM konsantrasyon) maruziyetinden sonra LC50 değerleri bulunmuştur. CAL27'de $45 \pm 0.8 \mu\text{M}$, HSC-2'de $78 \pm 5.6 \mu\text{M}$, S-G için $80 \pm 4.9 \mu\text{M}$, HSG1 için $109 \pm 5.7 \mu\text{M}$, HGF-1'de $246 \pm 17.9 \mu\text{M}$ ve GN56 için $171 \pm 15.6 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. 24 saat maruziyette CAL27 $0.18 \pm 0.02 \text{ mM}$, HSG1 $0.42 \pm 0.03 \text{ mM}$, GN56 $0.44 \pm 0.05 \text{ mM}$ olmak üzere LC50 bulunmuştur [12]. Başka bir çalışmada, insan kolorektal karsinoma (HT-29) hücreleri, EGCG'nin anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkilerini incelemek için EGCG uygulanmıştır. 36 saatlik maruziyetten sonra EGCG'nin LC50 konsantrasyonu 100 μM olarak bulunmuştur [13].

EGCG'nin HCT116 kolorektal ve HepG2 hepatoselüler karsinoma hücrelerinin büyümesini önleme kabiliyeti MTT deneyi ile değerlendirilmiştir. MTT deneyinde, EGCG'nin HCT116 hücre hattında LC50 değeri 24 saat sonra 71.3, 72 saatlik maruziyetten sonra LC50 değeri 46.7 μM olarak bulunmuştur. HepG2 hücresinde IC50 değeri 24 saat sonra 196.4, 72 saatlik maruziyetten sonra IC50 değeri 141.6 μM olarak bulunmuştur [14]. EGCG tarafından konsantrasyona bağlı büyüme

inhibisyonu MTT analizi ile değerlendirilmiştir. İnsan kolon adenokarsinomu (HT-29) ve insan meme adenokarsinomu (MCF-7) hücre hatları kullanılmıştır. 48 saat maruziyetten sonra LC50 değerleri, MCF-7 hücreleri için $11.2 \pm 1.4 \mu\text{M}$, HT-29 hücreleri için $136.3 \pm 2.1 \mu\text{M}$ bulunmuştur. MTT sonuçları, EGCG'nin, MC-7 hücrelerinde HT-29 hücrelerine kıyasla anlamlı derecede daha yüksek sitotoksositeye neden olduğunu göstermiştir [15]. EGCG, sağlıklı CHO hücre hattına 24 saat süreyle 1mM EGCG uygulandığında hücre canlılığı %42, 0.5mM EGCG uygulandığında hücre canlılığı %72 olarak bulunmuştur [16].

DOKS sitotoksik etkisi olan bir antikanser ilaçtır. Bu yüzden yapılan çalışmalar kanser hücre hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücre hattında gerçekleştirilen bir çalışmada DOKS'un sitotoksik etkisinin saptanması amaçlanmıştır. 72 saat uygulanan dozlar arasında $1.84\mu\text{M}$ dozunda hücre canlılığı %50'nin altına düşmüştür [17]. Diğer bir çalışmada DOKS'un sitotoksitesi pankreas kanser hücrelerinde 48, 72, 96, ve 120 saat maruz bırakılarak araştırılmıştır. IC50 değeri sırasıyla 2.2, 0.4, 0.28, and $0.22\mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Hücreler DOKS ile inkübasyon süresi arttıkça hücrelerde oluşan hasar artmıştır [18]. DOKS'a duyarlı insan promyelotic HL60 ve HL60 / MX2 hücrelerinde yapıldı. Topoizomeraz II aktivitesi hücrelerde değiştirilmiştir. HL60 ve dayanıklı HL60 / MX2 hücrelerinde MTT testi ile 72 saat DOKS uygulandıktan sonra IC50 değerleri hesaplanmıştır. HL60 hücre hattında IC50 değeri 9.4nM, HL60 / MX2 hücrelerinde 1823nM olarak bulunmuştur [19].

Kanserde önemli olduğu saptanan sinyal iletim yolları arasında PI3K/AKT kinaz (Fosfatidilinositol 3-kinaz/Akt) yolu, protein kinaz C ailesi (PKC) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesi sinyalizasyon zincirleri yer almaktadır. PI3K/AKT sinyal yolağı insan kanser türlerinin gelişiminde aktive olmaktadır.

PI3K yolağı bir çok büyüme faktörü ile tetiklenmektedir özellikle epidermal büyüme faktörü bunlardan birini oluşturmaktadır. Ayrıca, çok sayıda önemli sinyal yolağı bileşenlerinin aktif hale gelmesini sağlamaktadır. Bu bileşenlerden Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR), PI3K ile ilişkili protein kinaz ailesine ait bir serin/treonin kinazdır. mTOR hücre büyümesi, proliferasyonu ve metabolizması olmak üzere bir dizi hücresel fonksiyonun düzenlenmesinde ve homeostazın sağlanmasında rolü oldukça büyüktür. PI3K/AKT/mTOR yolağı, hücre

canlılığı ve tümör hücrelerinde proliferasyonun desteklenmesinde önemli bir rol oynar ve yüksek PI3K seviyesi, kanser açısından belirleyicidir. mTOR proteininin mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki tipi vardır. Bunlardan mTORC1, hücre büyümesinde PI3K/AKT sinyalleri veya diğer yolaklardan gelen sinyaller ile aktive edilebilen önemli bir yolaktır. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı hücre transformasyonunda, DNA tamirinde, apoptozun önlenmesinde, hücre proliferasyonunda ve çoklu ilaç direncinde yer alan proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Moleküler mekanizmalarda rolü olması nedeniyle sadece kanser gelişimiyle değil aynı zamanda tedavisinde de önemli bir rol oynamaktadır. EGCG'nin birçok kanser hücre hattı üzerinde ilaç direncini azalttığı ve mTOR ve PI3K'yı inhibe edici özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir [20]. Yapılan bir araştırmada, EGCG'nin, hem PI3K hem de mTOR yolağının inhibitörü olduğunu bildirilmiştir [21]. EGCG'nin kolon kanseri hücrelerinde antineoplastik etki gösterdiği ve bu etkinin, mTOR ve Akt'nin baskılanmasına paralel olarak AMPK'nin aktivasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. AMPK aracılığıyla gerçekleşen mTOR inhibisyonu EGCG'nin antikanser aktivitesinde önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır [22]. İnsan kolorektal hücre hattında yapılan araştırmada, RA, MAPK/ERK yolağıyla apoptozu indüklediği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [23]. MAPK/ERK yolağı dolaylı olarak mTOR'u etkilemektedir. Biberiye ekstresinde gerçekleştirilen araştırmada, ekstrenin akciğer kanseri hücrelerinde Akt/mTOR seviyelerini önemli ölçüde azaltarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu arttırarak akciğer kanserinde belirgin antitümör özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [24].

Yapılan bir araştırmada, HepG2 karaciğer kanser hücre hattında PI3K/Akt sinyalinin DOKS tarafından aktivasyonunun ve bunun EGCG tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir [25]. Bu çalışmada yer alan mekanizmaların tam olarak aydınlatılması için kanser hücre hatları kullanılarak ve çeşitli *in vitro* ve *in vivo* deneylerin yapılması planlanmaktadır.

-
- [1] Phytochemicals, Rosmarinic acid, <https://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rosmarinic-acid.php>, 10 Kasım 2019.
- [2] Bulgakov, V.P., Inyushkina, Y.V. ve Fedoreyev, S.A.,(2012). "Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications", Critical Reviews in Biotechnology,32(3):203-217.
- [3] Gonzalez-Alfonso, J.L., Peñalver, P., Ballesteros, A.O., Morales, J.C. ve Plou, F.J.,(2019). "Effect of α -Glucosylation on the Stability, Antioxidant Properties, Toxicity, and Neuroprotective Activity of (-)-Epigallocatechin Gallate", Frontiers in Nutrition, 6,30.
- [4] Hanna, A.D., Lam, A., Tham, S., Dulhunty, A.F., Beard, N.A., (2014). "Adverse effects of doxorubicin and its metabolic product on cardiac RyR2 and SERCA2A", Molecular Pharmacology, 86(4):438-449.
- [5] Helvacioğlu, S., Charehsaz, M. ve Aydın, A.,(2018). "A Review on Doxorubicin Related Genotoxicity and Protective Effects of Phytochemicals", Journal of Literature Pharmacy Sciences, 7(3):237-250.
- [6] Ramanauskiene, K., Raudonis, R. ve Majiene, D.,(2016). "Rosmarinic Acid and Melissa officinalis Extracts Differently Affect Glioblastoma Cells", Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Article ID 1564257.
- [7] Şahin, S., Tezcan, G., Demir, C., Tunca, B., Çeçener, G. ve Egeli, Ünal.,(2017). "Cytotoxic activity of rosmarinic acid isolated from prunella vulgaris l. and prunella grandiflora l. in different tumor cells", Trakya University Journal of Natural Sciences, 18(1): 9-13.
- [8] Zarlah, A., Kourkoumelis, N., Stanojkovic, T.P. ve Koval-Demertzi, D., (2014), "Cytotoxic activity of essential oil and extracts of ocimum basilicum against human carcinoma cells. Molecular docking study of isoeugenol as a potent cox and lox inhibitor", Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures,9(3): 907 – 917.
- [9] Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E. ve Vardar-Sukan, F., (2010), "Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines", Plant Foods for Human Nutrition, 65(2):158-163.
- [10] Moon, D.O., Kim, M.O., Lee, J.D., Choi, Y.H. ve Kim, G.Y., (2010), "Rosmarinic acid cell death through suppression of TNF- α induced NF- κ -B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells", Cancer Letters, 288,183–191.
- [11] Bacanlı, M., Göktas, H.G., Sarıgöl, Z., Aydın, S., Başaran, A.A ve Başaran, N.,(2014), "Antioxidant capacities and cytotoxic properties of some natural phenolic compounds in different cell lines", Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy,34(1):60-72.

- [12] Weisburg, J.H., Weissman, D.B., Sedaghat, T. ve Babich, H.,(2004), "In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity", *Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology*, 95(4):191-200.
- [13] Chen, C., Shen, G., Hebbar ,V., Hu, R., Owuor, E.D. ve Kong, A.N.,(2003), "Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells", *Carcinogenesis*, 24(8):1369-1378.
- [14] Uesato, S., Kitagawa, Y., Kamishimoto, M., Kumagai, A., Hori ,H. ve Nagasawa, H.,(2001). "Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells", *Cancer Letters*,170(1):41-44.
- [15] Kasım -Terzi, Y., Özer- Kaya, Ö., Darcansoy -İşeri,Ö., Çelik, Zerrin. ve Şahin, F.İ., (2015)."Epigallocatechin 3-gallate applications on HT-29 and MCF-7 cell lines and evaluation of tumor suppressor gene methylation", *Turkish Journal of Biology*, 39: 698-704.
- [16] Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. ve Halliwell, B.,(2007). "Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*,634, 1-2, 177-183.
- [17] Bildiren, Ö., Cevatemre, B., Ay, E.N., Özen, G., Hepokur, C., Erkisa, M., Küçükhüseyin, Ö., Ulukaya, E., Kuruca, S. ve Yaylım, İ.,(2018). "An Investigation of Anticancer Effects of Doxorubicin and Calcitriol Combination on MCF-7 Cells", *Experimed*,8(2): 41-46.
- [18] Al-Ghamdi, S.S., (2008). "Time and dose dependent study of doxorubicin induced DU-145 cytotoxicity", *Drug Metabolism Letters*,2(1):47-50.
- [19] Kik, K., Wasowska-Lukawska, M., Oszczapowicz, I. ve Szmigiero, L.,(2009). "Cytotoxicity and cellular uptake of doxorubicin and its formamidine derivatives in HL60 sensitive and HL60/MX2 resistant cells", *Anticancer Research*, 29(4):1429-1433.
- [20] Xiao, J., Ho, C.T., Liong, E., Nanji, A.A., Leung, T.M., Lau, T.Y., Fung, M.L. ve Tipoe, G.L., (2014)."Epigallocatechin gallate attenuates fibrosis, oxidative stress, and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rat model through TGF/SMAD, PI3 K/Akt/FoxO1, and NF-kappa B pathways", *European Journal of Nutrition*, 53: 187-199.
- [21] Van -Aller,G.S., Carson, J.D., Tang, W., Peng, H., Zhao, L., Copeland, R.A., Tummino, P.J. ve Luo, L.,(2011)."Epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea, is a dual phosphoinositide-3-kinase/mTOR inhibitör", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(2):194-199.
- [22] Park, S. Y., Lee, Y.K., Kim, Y.M., Park, O.J. ve Shin, J.I.,(2013)." Control of AMP-activated Protein Kinase, Akt, and mTOR in EGCG-treated HT-29 Colon Cancer Cells", *Food Science and Biotechnology*, 22(1):147-151.
- [23] Xavier, C.P., Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M. ve Pereira-Wilson, C.,(2009)." Salvia fruticosa, Salvia officinalis, and rosmarinic acid induce

apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway”, Nutrition and Cancer, 61,564–71.

- [24] Moore, J., Megaly, M., MacNeil, A.J., Klentrou, P. ve Tsiani, E.,(2016).” Rosemary extract reduces Akt/mTOR/p70S6K activation and inhibits proliferation and survival of A549 human lung cancer cells”, Biomedicine & Pharmacotherapy, 83, 725-732.
- [25] Satonaka, H., Ishida, K., Takai, M., Koide, R., Shigemasa, R., Ueyama, J., Ishikawa, T., Hayashi, K., Goto, H. ve Wakusawa, S.,(2017).” (-)-Epigallocatechin-3-gallate Down-regulates Doxorubicin-induced Overexpression of P-glycoprotein Through the Coordinate Inhibition of PI3K/Akt and MEK/ERK Signaling Pathways”, Anticancer Research, 37(11):6071-6077.
- [26] Zheng, Q., Nan, K.J. ve Zheng, H.L.,(2010). “Hippocrates’ viewpoint on cancer”, Zhonghua Yi Shi Za Zhi, 40(4):234-236.
- [27] Neglia, J.P., Friedman, D.L., Yasui, Y., Mertens, A.C., Hammond, S., Stovall, M., Donaldson, S.S., Meadows, A.T. ve Robison, L.L., (2001). “Second malignant neoplasms in five-year survivors of childhood cancer: childhood cancer survivor study”, Journal of the National Cancer Institute, 93(8):618-629.
- [28] Dünya Sağlık Örgütü, Kanser Kontrolü: 2015 Yılında Küresel Bir izlenim, https://www.who.int/cancer/Cancer_Control_Snapshot_in_2015.pdf?ua=1, 06 Eylül 2019.
- [29] Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Kanser İstatistikleri, <https://www.saglik.gov.tr/Eklenti/8635,kanser-istatistikleridocx.docx?0>, 06 Eylül 2019.
- [30] Baykara, O., (2016).” Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar”, Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(3): 154-165.
- [31] Gryniewicz, G. ve Szeja, W., (2008). Anthracycline Chemistry and Biology, Springer, Berlin.
- [32] Gewirtz, D.A., (1999). "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin", Biochemical Pharmacology, 57 (7): 727–741.
- [33] Brockmann, H., (1963).” Anthracyclinones and anthracyclines. (rhodomycinone, pyrromycinone and their glycosides)” Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, 21:121-182.
- [34] Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. ve Spalla, C., (1969).” Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *Caesius*”, Biotechnology and Bioengineering, 11(6):1101-1110.
- [35] Seitz, D.E., Ezcurra, J.E. ve Guttman-Carlisle, D.L., (1995). “Synthesis and chemical properties of a series of doxorubicin enaminomalonyl- β -alanine derivatives”, Tetrahedron Letters, 36(9):1413-1416.
- [36] Waterhouse, D.N., Tardi, P.G., Mayer, L.D. ve Bally, M.D., (2001). “A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug

administered in free form: changing toxicity profiles”, *Drug Safety*, 24 (12): 903-920.

- [37] Robert, J. ve Gianni, L., (1993). “Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines”, *Journal of Cancer Survivorship*, 17:219-252.
- [38] Kumar, A., Gautam, B., Dubey, C. ve Tripathi, P.K., (2014).” A review: Role of doxorubicin in treatment of cancer”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(10): 4117-4128.
- [39] Fornari, F.A., Randolph, J.K., Yalowich, J.C., Ritke, M.K. ve Gewirtz, D.A., (1994).” Interference by Doxorubicin with DNA Unwinding in MCF-7 Breast Tumor Cells”, *Molecular Pharmacology*, 45, 649 – 656.
- [40] Pigram, W.J., Fuller, W. ve Hamilton, L.D., (1972). “Stereochemistry of intercalation Intercalation of daunomycin with DNA”, *Nature*, 235, 17-19.
- [41] Tewey, K.M., Rowe, T.C., Yang, L., Halligan, B.D. ve Liu, L.F., (1984).” Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II”, *Science*, 226, 466-468.
- [42] Cummings, J., Anderson, L., Willmott, N. ve Smyth, J.F., (1991).”The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo”, *The European Journal of Cancer*, 27(5):532–535.
- [43] Anderson, R.D. ve Berger, N.A., (1994). “International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents”, *Mutation Research*, 309(1):109-142.
- [44] Simůnek, T., Stérba, M., Popelová, O., Adamcová, M., Hrdina, R. ve Gersl, V., (2009). “Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron”, *Pharmacological Reports*, 61 (1):154-171.
- [45] Muggia, F.M. ve Green, M.D., (1991).” New anthracycline antitumor antibiotics”, *Crit Rev Oncol Hematol* 11(1):43-64.
- [46] Gottesman, M. M. ve Pastan, I., (1993).” Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter”, *Annual Review of Biochemistry*, 62; 385-427.
- [47] Scheffer, G.L., Schroeijers, A.B., Izquierdo, M.A., Wiemer, E.A. ve Scheper, R.J., (2000). “Lung resistancerelated protein/major vault protein and vaults in multidrug resistant cancer”, *Current Opinion in Oncology*, 12, 550-556.
- [48] Marie, J.P., (2001). “Drug resistance in hematologic malignancies”, *Current Opinion in Oncology*, 13(6):463-469.
- [49] Takano, M., Yumoto, R. ve Murakami, T., (2006). “Expression and Function of Efflux Drug Transporters in the Intestine”, *Pharmacology & Therapeutics*, 109, 137-161.
- [50] Gottesman, M.M., Fojo, T. ve Bates, S.E., (2002). “Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters”, *Nature Reviews Cancer*, 2 (1):48-58.

- [51] Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E. ve Altman, R.B., (2011). "Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects", *Pharmacogenetics and Genomics*, 21, 440–446,
- [52] Harbottle, A., Daly, A.K., Atherton, K. ve Campbell, F.C., (2001). "Role of glutathione S-transferase P1, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance", *International Journal of Cancer*, 92 (6):777-783.
- [53] Sau, A., Pellizzari-Tregno, F., Valentino, F., Federici, G. ve Caccuri, A.M., (2010). "Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500 (2):116-122.
- [54] Egawa, C., Motomura, K., Miyoshi, Y., Takamura, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Inaji, H., Koyama, H. ve Noguchi, S., (2003). "Increased expression of BRCA1 mRNA predicts favorable response to anthracycline-containing chemotherapy in breast cancers", *Breast Cancer Research and Treatment*, 78 (1): 45-50.
- [55] Tassone, P., Tagliaferri, P., Perricelli, A., Blotta, S., Quaresima, B., Martelli, M.L., Goel, A., Barbieri, V., Costanzo, F., Boland, C.R. ve Venuta, S., (2003). "BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells", *British Journal of Cancer*, 88 (8):1285-1291.
- [56] Carvalho, C., Santos, R.X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P.J., Santos, M.S. ve Moreira, P.I., (2009). "Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect", *Current Medicinal Chemistry*, 16(25):3267-3285.
- [57] Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N. ve Karliner, J.S., (2010). "Doxorubicin cardiomyopathy", *Cardiology*, 115, 155–162.
- [58] Sakata, Y., Dong, J.W., Vallejo, J.G., Huang, C.H., Baker, J.S., Tracey, K.J., Tacheuchi, O., Akira, S. ve Mann, D.L., (2007). "Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury", *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292: H503–H509.
- [59] Bigotte, L., Arvidson, B. ve Olsson, Y., (1982). "Cytofluorescence localization of adriamycin in the nervous system", *Acta Neuropathologica*, 58: 193–202.
- [60] Tacar, O., Sriamornsak, P. ve Dass, C.R., (2013). "Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2):157-170.
- [61] Scarpati, M.L. ve Oriente, G., (1958). "Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.)", *Rice Science*, 28, 2329–33.
- [62] Petersen, M. ve Simmonds, M.S., (2003). "Rosmarinic acid", *Phytochemistry*, 62,121–125.
- [63] Furtado, R.A., de Araújo, F.R., Resende, F.A., Cunha, W.R. ve Tavares, D.C., (2009). "Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays", *Journal of Applied Toxicology*, 30, 254–259.
- [64] Nakazawa, T. ve Ohsawa, K., (1998). "Metabolism of rosmarinic acid in rats", *Journal of Natural Products*, 61(8):993-996.

- [65] Nakazawa, T. ve Ohsawa, K., (2000). "Metabolites of orally administered *Perilla frutescens* extract in rats and humans", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23(1):122-127.
- [66] Al-Dhabi, NA., Arasu, MV., Park, CH. ve Park, S.U., (2014). "Recent studies on rosmarinic acid and its biological and pharmacological activities", *EXCLI Journal*, 13:1192-1195.
- [67] Domitrović, R., Potočnjak, I., Crnčević-Orlić, Z. ve Škoda, M., (2014). "Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice", *Food and Chemical Toxicology*, 66:321-328.
- [68] Chen, K.L., Li, H.X., Xu, X.L. ve Zhou, G.H., (2014). "The protective effect of rosmarinic acid on hyperthermia-induced C2C12 muscle cells damage", *Molecular Biology Reports*, 41: 5525-5531.
- [69] Venkatachalam, K., Gunasekaran, S., Jesudoss, V.A. ve Namasivayam, N., (2013). "The effect of rosmarinic acid on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis", *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65:409-418.
- [70] Karmokar, A., Marczylo, T.H., Cai, H., Steward, W.P., Gescher, A.J. ve Brown, K., (2012). "Dietary intake of rosmarinic acid by Apc(Min) mice, a model of colorectal carcinogenesis: levels of parent agent in the target tissue and effect on adenoma development", *Molecular Nutrition & Food Research*, 56:775-783.
- [71] Sharmila, R. ve Manoharan, S., (2012). "Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice", *Indian Journal of Experimental Biology*, 50:187-194.
- [72] Hollman, P.C., van Trijp, J.M., Buysman, M.N., van der Gaag, M.S., Mengelers, M.J., de Vries, J.H. ve Katan, M.B., (1997). "Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man", *FEBS Letters*, 24: 418(1-2), 152-156.
- [73] Şahin, S., Tezcan, G., Demir, C., Berrin-Tunca, B., Çeçener, G. ve Egeli, Ü., (2017). "Cytotoxic activity of rosmarinic acid isolated from *prunella vulgaris* l. and *prunella grandiflora* l. In different tumor cells", *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18(1): 9-13.
- [74] Furtado, M.A., Fernandes de Almeida, L.C., Furtado, R.A., Cunha, W.R. ve Tavares, D.C., (2008). "Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay", *Mutation Research*, 657,150-154.
- [75] Du, G.J., Zhang, Z., Wen, X.D., Yu, C., Calway, T., Yuan, C.S. ve Wang, C.Z., (2012). "Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea", *Nutrients*, 4(11):1679-1691.
- [76] Kim, H.S., Quon, M.J. ve Kim, J.A., (2014). "New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate", *Redox Biology*, 2: 187-195.
- [77] Serpen, A., Pelvan, E., Alasalvar, C., Ataç-Mogol, B., Yavuz, H.T., Gökmen, V., Özcan, N. ve Özcelik, B., (2012). "Nutritional and functional characteristics of

seven grades of black tea produced in Turkey", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7682-7689.

- [78] Yoshida, Y., Kiso, M. ve Goto, T., (1999). "Efficiency of the extraction of catechins from green tea", *Food Chemistry*, 67, 429-433.
- [79] Benzie, I.F.F. ve Szeto, Y.T., (1999). "Total Antioxidant Capacity of Teas By The Ferric Reducing/Antioksidant Power Assay", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64,633-636.
- [80] Rahman, I., Biswas, S.K. ve Kirkham, P.A., (2006). "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols", *Biochemical Pharmacology*, 72(11):1439-1452.
- [81] Higdon, J.V. ve Frei, B., (2003). "Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1):89- 143.
- [82] Khan, N. ve Mukhtar, H., (2007). "Tea polyphenols for health promotion", *Life Sciences*, 81(7):519-533.
- [83] National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/epigallocatechin-gallate>, 26 Eylül 2019.
- [84] Paschka, A.G., Butler, R. ve Young, C.Y., (1998). "Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate", *Cancer Letters*, 130(1-2):1-7.
- [85] Gupta, S., Hastak, K., Afaq, F., Ahmad, N. ve Mukhtar, H., (2004). "Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis", *Oncogene*, 23(14):2507-2522.
- [86] Mittal, A., Pate, M.S., Wylie, R.C., Tollefsbol, T.O. ve Katiyar, S.K., (2004). "EGCG down- regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis", *International Journal of Oncology*, 24(3):703-710.
- [87] Qanungo, S., Das, M., Haldar, S. ve Basu, A., (2005). "Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells", *Carcinogenesis*, 26(5):958-967.
- [88] Sutherland, B.A., Rahman, R.M. ve Appleton, I., (2006). "Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration", *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(5):291-306.
- [89] Dirks, P.B. ve Rutka, J.T., (1997). "Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle--a review", *Journal of Neurosurgery*, 40(5):1013-1015.
- [90] Kim, H.S., Quon, M.J. ve Kim, J.A., (2014). "New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate", *Redox Biology*, 2,187-195.
- [91] Saeed, N.M., El-Naga, R.N., El-Bakly, W.M., Abdel-Rahman, H.M.,Salah ElDin, R.A. ve El-Demerdash, E., (2015). "Epigallocatechin-3-gallate pretreatment

attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: A mechanistic study", *Biochemical Pharmacology*, 95, 145–155.

- [92] Wu, F., Sun, H., Kluz, T., Clancy, H.A., Kiok, K. ve Costa, M., (2012). "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity in vitro", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(2):166-175.
- [93] Murray, P.E., Garcia- Godoy, C., Garcia-Godoy, F., (2007). "How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated?" *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 12(3): E258-266.
- [94] Saygı, Ş., (2003). "Deneyisel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi" , *Gülhane Tıp Dergisi*, 45 (3) : 291-298.
- [95] Mossman, T., (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- [96] Altman, F.P., (1976). "Tetrazolium salts and formazans", *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 9(3): 3-6.
- [97] Barltrop, J.A., Owen, T.C., Cory, A.H. ve Cory, J.G., (1991). "5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators", *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 1 (11):611-614.
- [98] Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K. ve Watanabe, M., (1995). "Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produce formazan dye", *In Vitro Toxicology*, 8, 187-190.
- [99] Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K. ve Watanabe, M., (1999). "A water- soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay", *Analytical Communications*, 36, 47- 50.
- [100] Riss, T.L., Moravec, R.A., (2004). "Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays", *Assay And Drug Development Technologies*, 2(1): 51- 62.
- [101] Mosmann, T., (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55-63.
- [102] Sjögren, G., Sletten, G., Dahl, J.E., (2000). "Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay and MTT tests", *Journal of Prosthetic Dentistry*, 84: 229–236.
- [103] Dietrich, R., Fella, C., Strich, S., Märtilbauer ,E., (1999)."Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*", *Applied and Environmental Microbiology*, 65,4470–4474.

- [104] Uzun, İ.H. ve Bayındır, F., (2011). "Dental materyallerin biyouyumluluk test yöntemleri", Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 28(2):115-122.
- [105] Connolly, D.T., Knight, M.B., Harakas, N.K., Wittwer, A.J. ve Feder, J., (1986). "Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay", Analytical Biochemistry, 152, 136-140.
- [106] Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R. ve Bullock, P., (2004). "Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening", Toxicology in vitro, 18(5):703-710.
- [107] Uo, M., Sjögren, G., Sundh, A., Watari, F., Bergman, M. ve Lerner, U., (2003). "Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics", Dental Materials, 19(6):487-492.
- [108] Vichai, V. ve Kirtikara, K., (2006). "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening", Nature Protocols, 1: 1112–1116.
- [109] Decker, T. Ve Lohmann-Matthes, M.L., (1988). "A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity", Journal of Immunological Methods, 15, 61-69.
- [110] Korzeniewski, C. ve Callewaert, D.M., (1983). "An enzyme-release assay for natural cytotoxicity", Journal of Immunological Methods, 64, 313-320.
- [111] Lappalainen, K., Jääskeläinen, I., Syrjänen, K., Urtti, A. ve Syrjänen, S., (1994). "Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes", Pharmaceutical Research, 11(8): 1127-1131.
- [112] Buzadar, A.S., Marcus, T.L., Smith, T.L. ve Blumenschein, G.R., (1981). "Early and delayed clinical cardio toxicity of doxorubicin", Cancer, 55 (12): 2761-2765.
- [113] Hay, N. ve Sonenberg, N., (2004). "Upstream and downstream of mTOR", Genes & Development, 18:1926-1945.
- [114] Faivre, S., Kroemer, G. ve Raymond, E., (2006). "Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents", Nature Reviews Drug Discovery, 5(8):671-688.
- [115] Guertin, D.A. ve Sabatini, D.M., (2007). "Defining the Role of mTOR in Cancer", Cancer Cell, 12, 9-22.
- [116] Laplante, M. ve Sabatini, D.M., (2009). "mTOR signaling at a glance", Journal of Cell Science, 122, 3589-3594.
- [117] Ji, J. ve Zheng, P. S., (2010). "Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells", Gynecologic Oncology, 117(1): 103-108.
- [118] Xu, X., Ye, L., Arakive, K. ve Ahmed, R., (2012). "mTOR, linking metabolism and immunity", Seminars in Immunology, 24(6): 429-435.
- [119] Malik, A.R., Urbanska, M., Macias, M., Skalecka, A. ve Jaworski, J., (2013). "Beyond control of protein translation: what we have learned about the non-

canonical regulation and function of mammalian target of rapamycin (mTOR)", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834(7): 1434-1448.

- [120] Seghal, S.N., Baker, H. ve Vézina, C., (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization", *Journal of Antibiotics*, 28(10):727-732.
- [121] Shaw, R.J. ve Cantley, L.C., (2006). "Ras, PI(3)K, and mTOR signalling controls tumor cell growth", *Nature*, 441(7092): 424-430.
- [122] Doğan, A.L. ve Güç, D., (2004). "Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser", *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35,34-42.
- [123] Temizkan, G. ve Arda, N., (2008). *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul,2008.
- [124] Mahmood, T. ve Yang, P.C., (2012). "Western blot: technique, theory, and trouble shooting", *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9):429-434.
- [125] Wurm, F.M., (2004). "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells", *Nature Biotechnology*, 22 (11): 1393–1398.
- [126] Zhao, D., Yang,J. ve Yang, L.,(2017)." Insights for Oxidative Stress and mTOR Signaling in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury under Diabetes", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 6437467.
- [127] Aramburu, J., Ortells, M.C., Tejedor, S., Buxadé, M., López-Rodríguez, C.,(2014). "Transcriptional regulation of the stress response by mTOR", *Science Signaling*, 7(332):re2.
- [128] Kim, J.H., Chu, S.C., Gramlich, J.L., Pride, Y.B., Babendreier, E., Chauhan, D., Salgia, R., Podar, K., Griffin, J.D. ve Sattler, M.,(2005). "Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species", *Blood*,105(4):1717-1723.
- [129] Oka, S.I., Hirata, T., Suzuki, W., Naito, D., Chen, Y., Chin, A., Yaginuma, H., Saito, T., Nagarajan, N., Zhai, P., Bhat, S., Schesing, K., Shao, D., Hirabayashi, Y., Yodoi, J., Sciarretta, S.ve Sadoshima, J.,(2017). "Thioredoxin-1 maintains mechanistic target of rapamycin (mTOR) function during oxidative stress in cardiomyocytes", *Journal of Biological Chemistry*,292(46):18988-19000.
- [130] Azam, S., Hadi, N., Khan, N.U. ve Hadi, S.M.,(2004). "Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties", *Toxicology in Vitro*,18(5):555-561.
- [131] Tao, L., Forester, S.C. ve Lambert, J.D.,(2014). "The role of the mitochondrial oxidative stress in the cytotoxic effects of the green tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in oral cells", *Molecular Nutrition & Food Research*,58(4):665-76.
- [132] Aroui, S., Brahim, S., Waard, M.D. ve Kenani, A.,(2010)." Cytotoxicity, intracellular distribution and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides in different cell lines: a comparative study", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1):419-425.

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

İletişim Bilgisi: sinem_helvacioglu@hotmail.com

Konferans Bildirileri

1. Helvacioğlu, S., Vural – Korkut, Ş., Hamitoğlu, M.,(2019). "Comparison of cytotoxicity of Rosmarinic acid and Epigallocatechin gallate in CHO cell line", 10th International Congress of the Turkish Society of Toxicology, 141, Antalya – Türkiye.