

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PAKLİTAKSEL/USNİK ASİT KOMBİNASYONUNUN
MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Adnan Berk DİNÇSOY

**Fizyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2017

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PAKLİTAKSEL/USNİK ASİT KOMBİNASYONUNUN MEME
KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Adnan Berk DİNÇSOY

**Fizyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. İsmail KARABULUT**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN**

**ANKARA
2017**

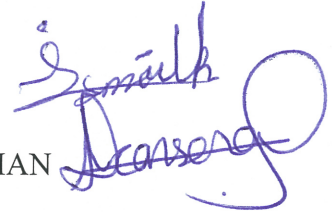
**Paklitaksel/Usnik Asit Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücre Hatları
Üzerine Etkisi
Adnan Berk DİNÇSOY**

Bu çalışma 04/01/2017 tarihinde, jürimiz tarafından "Fizyoloji Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Bilge PEHLİVANOĞLU
(H.Ü. Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD)



Tez danışmanı: Doç. Dr. İsmail KARABULUT
(H.Ü. Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD)



İkinci danışman: Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN
(A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü)

Üye: Doç. Dr. Meltem TUNCER
(H.Ü. Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD)



Üye: Doç. Dr. Esin İLERİ GÜREL
(H.Ü. Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD)

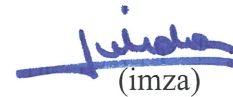


Üye: Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU
(A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü)



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.



(imza)

Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- o **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)
- **Tezimin/Raporumun 04/01/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)
- o **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- o **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

04/01/2017

Adnan Berk DİNÇSOY

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. İsmail KARABULUT danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Arş. Gör. Adnan Berk DİNÇSOY

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, beni her zaman anlayışla destekleyen danışmanım Doç. Dr. İsmail Karabulut'a ve tez çalışmalarım sırasında bilgisi ile yardımını esirgemeyen, her zaman yardımcı olmaya çalışan ikinci danışmanım Doç. Dr. Demet Cansaran Duman'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında laboratuvar olanaklarını sonuna kadar açan, deneyimi ve bilgisiyle yol gösteren, her konuşmamızda bilgisinden etkilendiğim ve her zaman fikirlerini saygıyla ve merakla dinleyeceğim Doç. Dr. Güneş Esendağlı hocama sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, her soru ve sorunumda yardımcı olan Diğdem Yöyen Ermiş başta olmak üzere diğer tüm H.Ü. Temel Onkoloji laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın başlamasında büyük desteği olan H.Ü. Eczacılık Fakültesi araştırma görevlisi Adem Şahin'e teşekkürü borç bilirim.

Desteklerinden dolayı Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Sıkıntılı her anımda yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim dostum Asım Niyaz'a sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olup beni her konuda destekleyen aileme sonsuz ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Dinçsoy, A.B., Paklitaksel/Usnik Asit Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizioloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2016. Dünya genelinde 2012 yılında meme kanseri sıklığı tüm kanser tipleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Hastalıkla mücadele sürecinde meme kanserinin tedavisinde tek bir ilaç yerine çoklu ilaç kombinasyonlarının kullanımının daha etkili olduğu yapılan bazı çalışmalarla belirlenmiştir. Paklitaksel meme ve uterus kanserlerinin tedavisinde kullanılan en etkin ilaçlardan biridir. Usnik asitin antiproliferatif ve apoptozu indükleyici etkisi yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın amacı öncelikle usnik asitin HCC38 insan meme kanseri ve 4T1 fare meme kanseri hücre hatları üzerine hücre canlılığını azaltıcı etki gösterip göstermediği *in vitro* olarak değerlendirmektir. Sonrasında usnik asitin rutin olarak klinikte kullanılan kemoteröpatik bir ilaç olan paklitaksel ile beraber kullanımının hücre canlılığı üzerine etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. HCC38 hücreleri üzerine usnik asitin 12,5 µM konsantrasyonunun 48 saat ve 72 saat uygulaması sonucunda sırasıyla hücre canlılığı %83 ve %62 seviyelerine inmiştir. HCC38 hücreleriyle yaptığımız MTT testi sonuçlarından elde ettiğimiz verilere göre paklitakselle usnik asitin birlikte uygulanması kümülatif bir etki göstererek hücre canlılığını ayrı ayrı uygulamalarına göre daha çok azaltmıştır. Akım sitometri analizi sonucunda ise hücredeki ölüm oranı paklitakselin usnik asitle birlikte uygulanması ile tek başına uygulanması arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. 4T1 hücreleri üzerine ise usnik asit uygulanması sonucunda hücre canlılığında azalma görülsede bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 4T1 hücreleriyle yaptığımız MTT testi sonucunda paklitakselin usnik asit ile birlikte uygulanması sonucunda hücre canlılığı ayrı ayrı uygulamaya göre daha çok azalmıştır. Çalışmadan elde edilen tüm sonuçlara göre paklitakselle birlikte usnik asitin uygulanması hücre canlılığını azaltıcı yönde kümülatif etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Paklitaksel, usnik asit, MTT, akım sitometri, meme kanseri.

Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) tarafından kısmen desteklenmiştir.

ABSTRACT

Dinçsoy, A.B., Effect of Paclitaxel/Usnic Acid Combination on Breast Cancer Cell Lines, Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Physiology Master's Thesis, Ankara, 2016. Breast Cancer was the second common cancer worldwide in 2012. Using combination of multiple drugs for treatment has been proven to be more affective by research. Paclitaxel is a chemotherapy medication used to treat a number of types of cancer including breast and uterus cancers. Usnic acid's antiproliferative and apoptosis inducing effects was shown on many research. In this study primarily the usnic acid on HCC38 human breast cancer and 4T1 mouse cancer cell line was assessed *in vitro* to show whether it had a cell viability reducing effect. Afterwards the effectiveness of the usage of the usnic acid and paclitaxel together on cell viability has been aimed to evaluate. On HCC38 cells as a result of application of 12.5 µM concentrations of usnic acid 48 hours and 72 hours, cell viability was in order decreased to 83% and 62%. The parameter's according to the result of the MTT test with HCC38 cells show that the application of paclitaxel with usnic acid has cumulative effect on reducing the cell viability than individual application. As a result of flow cytometry analysis no significant difference was found on the mortality rate on the cell between the application of the combined usage and individual application of paclitaxel. As a result of application of usnic acid on 4T1 cells, cell viability decreased but the decrease was not statistically significant. As a result of the MTT test with 4T1 cells the application of paclitaxel with usnic acid cell viability was decreased more than the individual application. According to the results of this study application of paclitaxel with usnic acid has a cumulative effect on reducing the cell viability.

Key words: Paclitaxel, usnic acid, MTT, flow cytometry, breast cancer.

This thesis was partly supported by Ogretim Uyesi Yetistirme Programı (OYP).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyolojisi	3
2.1.2. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	4
2.1.3. Meme Kanserinin Tedavisi	6
2.2. Paklitaksel	7
2.3. Usnik Asit	8
2.4. Kanser Tedavisinde Mikrotübüllerin Rolü	9
2.5. Hücre Ölüm Yolları	10
2.5.1. Apoptozis	10
2.5.2. Nekrozis	12
2.6. Kullanılan Hücrelerin Genel Özellikleri	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler	14
3.2. İlaç Formülasyonlarının Hazırlanması	14
3.3. Hazırlanan Çözeltiler ve Solüsyonlar	14
3.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Sayısının Belirlenmesi	14
3.5. Hücre Kültürü İdamesi	15
3.6. Hücre Sayımı	15
3.7. MTT Testi	16
3.8. Akım Sitometri	19
3.9. İstatistiksel Analiz	21

4. BULGULAR	22
4.1. MTT Testi Analizi	22
4.1.1. HCC38 Hücrelerinin MTT Analizi	23
4.1.2. 4T1 Hücrelerinin MTT Analizi	33
4.2. Akım Sitometri Analizi	45
4.2.1. HCC38 Hücreleri Akım Sitometri Analizi	46
4.2.2. 4T1 Hücreleri Akım Sitometri Analizi	51
5. TARTIŞMA	58
5.1. MTT Sonuçları	58
5.1.1. Paklitaksel Uygulaması Sonuçları	58
5.1.2. Usnik Asit Uygulaması Sonuçları	60
5.1.3. Usnik Asit ve Paklitaksel Kombinasyon Sonuçları	61
5.2. Akım Sitometri Sonuçları	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
7. KAYNAKLAR	68
8. ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER ve KISALTMALAR

A549	Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleri
AIDS	Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl	B hücre lenfoma
4T1	Fare meme kanseri hücre hattı
C2C12	Fare miyoblast hücre hattı
CCL21	Kemokin (C-C motif) ligand 21
cIAP	Hüresel apoptoz inhibitörü
CMF	Siklofosamid metotreksat fluororasil
CO₂	Karbon dioksit
CYLD	Silindromatozis
DISC	Ölümü indükleyen sinyal kompleksi
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ER	Östrojen reseptörü
ELISA	Enzim-bağlı immünosorbent testi
FADD	Fas-bağlı ölüm bölgesi
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Fötal Buzağı Serumumu
FSC	<i>Forward Scatter Cytometry</i>
FKB	Flavokavain B
GDP	Guanozin difosfat
GTP	Guanozin trifosfat
H1299	İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattı
HATs	Histon asetiltransferazlar
HCC38	İnsan meme kanseri hücre hattı
HCT-116	İnsan kolon kanseri hücre hattı
HDACs	Histon deasetilazlar
HDGF	Hepatoma kaynaklı büyüme faktörü
HeLa	İnsan rahim ağzı kanseri hücre hattı
HER-2	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
HL-60	İnsan promyelositik lösemi

HLA-DR	İnsan lökosit antijeni - antijen D ilişkili
HMGB1	High mobility group box 1
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IL-1β	İnterlökin 1 beta
LMP	Lizozomal membran permeabilizasyonu
MCF7	İnsan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231	İnsan meme kanseri hücre hattı
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NLRP3	NACHT, LRR ve PYD domainlerini içeren protein 3
PARP	Poli (ADP-Riboz) polimeraz
PBS	Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi
PI	Propidyum iyodür
PR	Progesteron reseptörü
PTX	Paklitaksel
Rac1	Ras-ilişkili C3 botulinum toksin substratı 1
RIP1	Reseptör ile etkileşen serin/treonin proteini
RhoA	Rhodopsin aile üyesi A
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RPMI	<i>(Roswell Park Memorial Institute)</i> hücre kültür besiyeri
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAC	Toplam antioksidan kapasitesi
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TNFR	Tümör nekrozis faktörü reseptörü
TRADD	Tümör nekroz faktörü alfa reseptör-1 ilişkili ölüm domain reseptörü
TRAF	TNF reseptör ilişkili faktör
UA	Usnik Asit
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
WST-1	Suda çözünen tetrazolyum tuzu 1
XTT	2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid
YO-PRO-1	Apoptotik hücre boyası

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kadınlarda görülen meme kanserin yaşa standardize insidans hızlarının 2008-2013 yılları arasındaki dağılımı (Dünya standart nüfusu,100.000 kişide).	4
2.2. Paklitaksel'in kimyasal yapısı.	7
2.3. Paklitaksel'in etki mekanizması.	8
2.4. Usnik asit'in kimyasal yapısı.	9
3.1. HCC38 hücrelerine usnik asit ve paklitaksel uygulmasının şematik gösterimi.	16
3.2. 4T1 hücrelerine usnik asit ve paklitaksel uygulmasının şematik gösterimi.	17
3.3. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitakselle usnik asit konsantrasyonlarının birlikte uygulanmasının şematik gösterimi.	18
3.4. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitakselle usnik asit konsantrasyonlarının birlikte uygulanmasının şematik gösterimi.	18
3.5. MTT testi için deney tasarımının şematik gösterimi.	19
3.6. HCC38 hücrelerinin akım sitometrik değerlendirilmesi için formülasyonların uygulanmasının şematik görünümü.	20
3.7. 4T1 hücrelerinin akım sitometrik değerlendirilmesi için formülasyonların uygulanmasının şematik görünümü.	20
3.8. Akım sitometri analizi için deney tasarımının şematik gösterimi.	21
4.1. HCC38 hücrelerinin zamana bağlı olarak değişimi ve DMSO'nun hücre canlılığı üzerine etkisi.	22
4.2. 4T1 hücrelerinin zamana bağlı olarak değişimi ve DMSO'nun hücre canlılığı üzerine etkisi.	22
4.3. HCC38 hücrelerine paklitakselin 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	23
4.4. HCC38 hücrelerine paklitakselin 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	24
4.5. HCC38 hücrelerine paklitakselin 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	25
4.6. HCC38 hücrelerine paklitakselin uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi.	26
4.7. HCC38 hücrelerine usnik asitin 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	27
4.8. HCC38 hücrelerine usnik asitin 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	27

Şekil	Sayfa
4.9. HCC38 hücrelerine usnik asitin 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	28
4.10. HCC38 hücrelerine usnik asit uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi.	29
4.11. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	30
4.12. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	31
4.13. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	32
4.14. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi.	33
4.15. 4T1 hücrelerine paklitakselin 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	34
4.16. 4T1 hücrelerine paklitakselin 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	35
4.17. 4T1 hücrelerine paklitakselin 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	36
4.18. 4T1 hücrelerine paklitakselin uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi.	37
4.19. 4T1 hücrelerine usnik asitin 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	38
4.20. 4T1 hücrelerine usnik asitin 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	39
4.21. 4T1 hücrelerine usnik asitin 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	40
4.22. 4T1 hücrelerine usnik asit uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi.	40
4.23. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	42
4.24. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	43

Şekil	Sayfa
4.25. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.	44
4.26. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi.	45
4.27. Hücreleri ayırmada kullanılan temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.	46
4.28. HCC38 hücreleri PI boyama sonucu kontrol grubu A) Otofloresans B) ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.	47
4.29. HCC38 hücreleri PI boyama sonucu usnik asit A) Otofloresans B) ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları	47
4.30. HCC38 hücreleri PI boyama sonucu paklitaksel grubu A) Otofloresans B) ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.	48
4.31. HCC38 hücreleri PI boyama sonucu 12,5 µM usnik asit ve 100 nM paklitaksel birlikte uygulama grubu A) Otofloresans B) ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.	48
4.32. HCC38 hücreleri 24 saat formülasyon uygulaması sonrasında hücre canlılığındaki değişimler.	49
4.33. HCC38 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu kontrol grubu temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.	50
4.34. HCC38 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 12,5 µM usnik asit uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.	50
4.35. HCC38 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 100 nM paklitaksel uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.	51
4.36. HCC38 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 12,5 µM usnik asit ve 100 nM paklitaksel birlikte uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.	51
4.37. 4T1 hücreleri PI boyama sonucu kontrol grubu A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.	52
4.38. 4T1 hücreleri PI boyama sonucu usnik asit A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.	53
4.39. 4T1 hücreleri PI boyama sonucu paklitaksel A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.	53
4.40. 4T1 hücreleri PI boyama sonucu 25 µM usnik asit ve 100 nM paklitaksel birlikte uygulama grubu A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.	54
4.41. 4T1 hücreleri 24 saat formülasyon uygulaması sonrasında hücre canlılığındaki değişimler.	55

Şekil		Sayfa
4.42.	4T1 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu kontrol grubu temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.	55
4.43.	4T1 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 12,5 µM usnik asit uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.	56
4.44.	4T1 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 100 nM paklitaksel uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.	56
4.45.	4T1 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 12,5 µM usnik asit ve 100 nM paklitaksel birlikte uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.	57

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre A) Kadınlar ve B) Erkekler arasında en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı.	4
2.2. Meme kanseri tiplerinin major moleküler alt tipleri.	5
4.1. HCC38 hücrelerine paklitakselin 24 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	23
4.2. HCC38 hücrelerine paklitakselin 48 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	24
4.3. HCC38 hücrelerine paklitakselin 72 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	25
4.4. HCC38 hücrelerine paklitakselin uygulamasının zamana bağlı MTT testi sonuçları.	26
4.5. HCC38 hücrelerine usnik asitin 24 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	26
4.6. HCC38 hücrelerine usnik asitin 48 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	27
4.7. HCC38 hücrelerine usnik asitin 72 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	28
4.8. HCC38 hücrelerine usnik asitin uygulamasının zamana bağlı MTT testi sonuçları.	29
4.9. HCC38 hücrelerine 24 saat 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.	29
4.10. HCC38 hücrelerine 48 saat 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.	30
4.11. HCC38 hücrelerine 72 saat 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.	31
4.12. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonucunda zamana ve konsantrasyonlara bağlı hücre canlılığının değişimi.	32
4.13. 4T1 hücrelerine paklitakselin 24 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	33
4.14. 4T1 hücrelerine paklitakselin 48 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	34
4.15. 4T1 hücrelerine paklitakselin 72 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	35

Tablo	Sayfa
4.16. 4T1 hücrelerine paklitakselin uygulamasının zamana bağlı MTT testi sonuçları.	36
4.17. 4T1 hücrelerine usnik asitin 24 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	37
4.18. 4T1 hücrelerine usnik asitin 48 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	38
4.19. 4T1 hücrelerine usnik asitin 72 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.	39
4.20. 4T1 hücrelerine usnik asitin uygulamasının zamana bağlı MTT testi sonuçları.	40
4.21. 4T1 hücrelerine 24 saat 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.	41
4.22. 4T1 hücrelerine 48 saat 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.	42
4.23. 4T1 hücrelerine 72 saat 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.	43
4.24. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonucunda zamana ve konsantrasyonlara bağlı hücre canlılığının değişimi.	44
4.25. HCC38 hücrelerine formülasyon uygulaması sonrasında zamana bağlı hücrelerin % ölüm oranları.	46
4.26. HCC38 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu hücre oranları.	49
4.27. 4T1 hücrelerine formülasyon uygulaması sonrasında zamana bağlı hücrelerin % ölüm oranları.	52
4.28. 4T1 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu hücre oranları.	54

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır (1). Kansere karşı etkin çözümler sunacak tedavi yöntemleri arayışı halen devam etmektedir ve birçok araştırma sonucu elde edilen veriler umut verici gelişme göstermiştir (2). Tedavi yöntemleri arasında özellikle son yıllarda ilaç adayı moleküllerin kanser tedavisinde kullanım etkinliğinin belirlenmesinde birçok çalışma üzerine odaklanılmıştır. Meme kanseriyle tedavide tek bir ilaç yerine ilaç kombinasyonlarının kullanımının daha etkili olduğu görülmüştür (3). Paklitaksel meme ve uterus kanserlerinin tedavisinde kullanılan en önemli ilaçlardan biridir (4). Taksanlar, tübülün yapısına bağlanarak stabil mikrotübüller oluşturmaktadır ve bunun sonucunda hücreler G2/M fazında durmakta, hücre siklusu bloke olmaktadır (5). Antineoplastik aktivitesini gösterirken mikrotübüller üzerinden etkili olmadığı bulunan usnik asitin ise antiproliferatif ve apoptozu indükleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (6-8).

1844 yılındaki ilk izolasyonundan beri en yaygın olarak çalışılan bir sekonder metabolit olan usnik asit farmakolojide ve klinikte büyük ilgiye sahip olan farklı biyolojik ve fizyolojik aktiviteler göstermektedir (9, 10). Usnik asit reaktif türlerin oluşmasında inhibisyona, lipid peroksidasyonunda azalmaya ve glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinde artışa neden olmaktadır (11, 12). Mayer M. ve ark. tarafından (7), usnik asit liken sekonder metabolitinin MCF7, MDA-MB-231 ve H1299 hücre hatları üzerine antiproliferatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise liken metabolitlerinin sitotoksik etkisi üç insan kanser hücre hattında değerlendirilmiş ve MCF-7 (meme adenokarsinoma), HeLa (serviks adenokarsinoma) ve HCT-116 (kolon karsinoma) insan kanser hücre hatları üzerine usnik asitin 25 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda diğer liken metabolitleri ile karşılaştırıldığında en yüksek sitotoksik aktiviteyi gösterdiği bulunmuştur (13). Usnik asit sekonder metabolitinin antibakteriyel, antiviral, antimitotik, antitüberküloz, antiproliferatif, antienflamatuar, antipiretik ve analjezik etkinliklerini incelemek için yapılan çalışmalar mevcuttur (14-23).

Yaptığımız bu çalışmada usnik asit liken sekonder metabolitinin HCC38 insan meme kanseri ve 4T1 fare meme kanseri hücre hatları üzerine hücre canlılığını

azaltıcı etki gösterip göstermediğinin ve klinikte kullanılan bir kemoterapi ilacı olan paklitaksel ile ilaç olmaya aday bir molekül olan usnik asitin meme kanseri hastalarında tedavi amacıyla birlikte kullanım etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda aşağıdaki hipotezler sınanmıştır;

Hipotez-1: Usnik asitin farklı meme kanseri hücre hatları üzerine hücre canlılığını azaltıcı etkisi vardır.

Hipotez-2: Usnik asit liken sekonder metabolitinin kemoterapötik bir ilaç olan paklitaksel ile birlikte kullanıldığında hücre canlılığını azaltıcı yönde kümülatif bir etkisi vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

2.1.1. Epidemiyolojisi

Dünya genelinde 2012 yılında 14,1 milyon yeni kanser vakası ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleştiği tahmin edilmektedir (24). Dünyada en yaygın kanser akciğer kanseridir ve 2012 yılında 1,8 milyon (tüm kanserin %12.9'u) yeni vaka görülmüş ve 1,6 milyon (tüm kanserlerin %19.4'ü) akciğer kanserine bağlı ölüm gerçekleşmiştir. Meme kanseri sıklığı tüm kanser tipleri arasında ikinci sıradadır. 2012 yılında 1,7 milyon (tüm kanserlerin %11.9'u) yeni meme kanseri vakası görülmüştür. Meme kanseri 522,000 (tüm kanserlerin %6.4'ü) ölüm ile kansere bağlı ölümler arasında beşinci sırada yer almaktadır. Akciğer ve meme kanseri görülme sıklığı sonrasında en fazla görülme oranı kolorektal kanser, prostat kanseri, mide kanseri ve karaciğer kanseri takip etmektedir (24). Dünya genelinde 2012 yılında erkekler arasında en yaygın görülen kanser akciğer kanseri iken çok gelişmiş ülkelerde ilk sırayı prostat kanseri almakta, akciğer kanseri ikinci sırada gelmektedir. Az gelişmiş ülkelerde ise en sık akciğer kanseri, sonrasında karaciğer kanseri ve mide kanseri görülmektedir. Kadınlar arasında ise az gelişmiş ülkelerde de (883,000 vaka), çok gelişmiş ülkelerde de (794,000 vaka) en yaygın görülen kanser tipi meme kanseridir. Az gelişmiş ülkelerde servikal kanser ikinci sırada yer alırken, çok gelişmiş ülkelerde on birinci sırada yer almaktadır. Çok gelişmiş ülkelerde kansere bağlı ölümden akciğer kanseri ilk sıradayken (210,000 ölüm) bunu meme kanseri takip etmektedir (198,000 ölüm) (24).

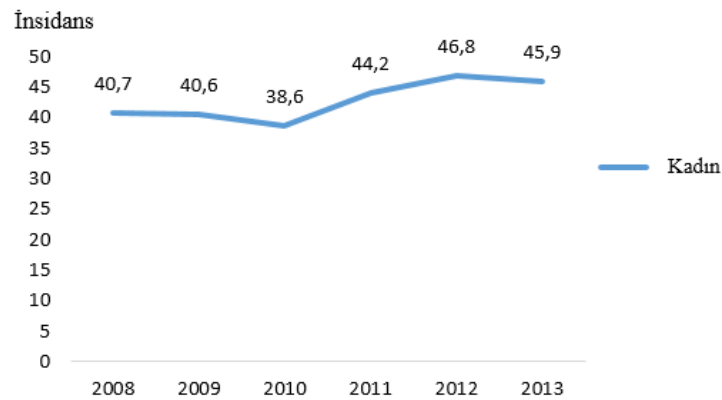
2013 yılında Türkiye'de kanser hızı erkeklerde yüzbinde 267,9 iken kadınlarda ise yüzbinde 186,5'dur. 2013 yılında görülen yeni kanser vakası ise 174,000'dir. Türkiye'deki kanser görülme sıklığı dünyadaki kanser görülme sıklığından fazladır (25). Türkiye'de en sık görülen 5 kanser türü, diğer gelişmiş ülkelerde görülen kanser türleri ile benzerlik göstermektedir (Tablo 2.1.). Ülkemizde erkekler arasında en sık görülen kanserler trakea, bronş ve akciğer kanseri iken kadınlar arasında en sık görülen kanser meme kanseridir (25).

Tablo 2.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre A) Kadınlar ve B) Erkekler arasında en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı (26)'dan modifiye edilmiştir.

A	Türkiye*	Dünya	B	Türkiye*	Dünya
1	Meme	Meme	1	Akciğer	Akciğer
2	Tiroid	Kolorektal	2	Prostat	Prostat
3	Kolorektal	Uterus serviksi	3	Kolorektal	Kolorektal
4	Akciğer	Akciğer	4	Mesane	Mide
5	Uterus korpusu	Uterus korpusu	5	Mide	Karaciğer

* Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013.

2013 yılında kanser tanısı konulan her dört kadından biri meme kanseridir (25). Şekil 2.1.'de 2008-2013 yılları arasında kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı görülmektedir.



Şekil 2.1. Kadınlarda görülen meme kanserinin yaşa standardize edilmiş insidans hızlarının 2008-2013 yılları arasındaki dağılımı (Dünya standart nüfusu,100.000 kişide) (25).

2.1.2. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme tübüloalveolar bir bez olup süt üreten lobülleri ve sütün aktarımında görevli kanal sistemleri vardır. Meme kanseri lobül ve kanalları çevreleyen epitel hücrelerinden köken alan bir adenokarsinomdur (27). Meme kanserinin gelişimde yaş, cinsiyet, genetik etmenler, endokrin faktörler, radyasyon, alkol gibi çok çeşitli risk faktörleri rol oynamaktadır (28). Meme kanserleri histopatolojik olarak lobül ve kanaldan köken almalarına bağlı olarak lobüler adenokarsinoma ve duktal adenokarsinoma olmak üzere ikiye ayrılır (29). Ayrıca meme kanserleri invaziv özelliklerine göre de invaziv ve invaziv olmayan şeklinde ikiye ayrılmaktadır (29).

Meme kanserinin oluşumu ve ilerleyişi ile kanser hücrelerinin östrojen (ER), progesteron (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü-2 reseptörleri (HER-2) arasında ilişki bulunmaktadır. Bu nedenle sınıflandırma reseptör durumuna göre de yapılabilmektedir (30). Meme kanserinin moleküler sınıflaması genel olarak dört alt grup altında toplanmaktadır (Tablo 2.2.)

Tablo 2.2. Meme kanseri tiplerinin major moleküler alt tipleri (31)'den modifiye edilmiştir.

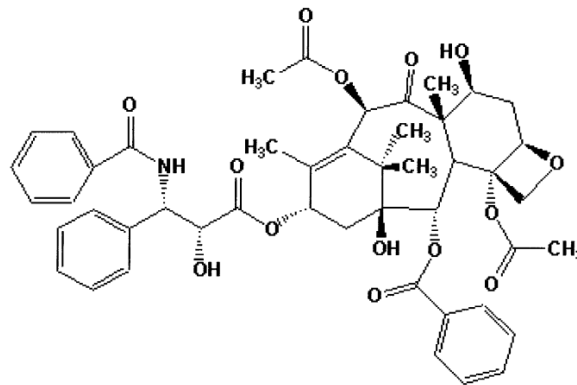
Moleküler Alt Tipleri				
	Lüminal A	Lüminal B	HER2/neu	Bazal benzeri
Gen Ekspresyon Paterni	Lüminal (düşük moleküler ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu, hormon reseptörleri ve ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu	Lüminal sitokeratinlerin ekspresyonu, hormon reseptörleri ve ilişkili genlerin orta-düşük ekspresyonu	HER2/neu yüksek ekspresyonu, ER ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu	Bazal epitelyal genlerin ve bazal sitokeratinlerin yüksek ekspresyonu, ER ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu, HER2/neu düşük ekspresyonu
Klinik ve Biyolojik Özellikler	İnvaziv meme kanserlerinin ~%50 si, ER/PR pozitif, HER2/neu negatif	İnvaziv meme kanserlerinin ~%20 si, ER/PR pozitif, HER2/neu ekspresyonu değişken	İnvaziv meme kanserlerinin ~%15'i, ER/PR negatif, HER2/neu pozitif	İnvaziv meme kanserlerinin~%15'i, çoğu ER/PR ve HER2/neu negatif (üçlü negatif)
Histolojik Korelasyon	Tübüler karsinom Kribriform karsinom Düşük dereceli invaziv duktal karsinom, Klasik lobüler karsinom	İnvaziv duktal karsinom, Mikropapiller karsinom	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinom	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinom, Metaplastik karsinom, Medüller karsinom
Tedaviye Cevap ve Seyir	Endokrin tedaviye cevap Kemoterapiye değişken cevap İyi prognoz	Endokrin tedaviye cevap (tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) Lüminal A kadar iyi olmayabilir Kemoterapiye cevap değişken Prognoz, lüminal A kadar iyi değil	Trastuzumaba (Herceptin) cevap Antrasiklin grubu kemoterapiye cevap Genellikle kötü prognoz	Platinum grubu kemoterapiye ve PARP (adenozin difosfat-riboz polimeraz) inhibitörlerine duyarlı Tümü değil ama genellikle kötü prognoz

2.1.3. Meme Kanserinin Tedavisi

Meme kanseri çok çeşitli alt tipi olan bir hastalıktır ve tedavisinde meme kanserinin hangi alt tipinin olduğunun çok iyi bilinmesi gerekmektedir (29). Cerrahi yöntem olarak mastektomi veya meme koruyucu cerrahi yöntemi olarak lumpektomi yapılmaktadır (32). Erken dönem meme kanseri tedavisinde radyoterapinin önemli bir yeri vardır. Meme kanserinde bölgesel kontrolü arttırmaktadır ve genel sağkalımı uzattığı bilinmektedir (33). Hormon tedavisi yöntemi ise hormon reseptörü bulunduran kanser çeşitlerinde hormonun etkisini engelleyerek kanser gelişimini durdurmaktadır. Bu amaç doğrultusunda dört yöntem kullanılır; Aromataz inhibitörleri kullanılarak östrojen sentezi inhibe edilebilir (34), östrojen reseptör restriktörleri kullanılarak östrojenin hücreye girmesi engellenebilir, seçici östrojen reseptör modülatörleri kullanılabilir. Meme kanseri tedavisinde kullanılan Tamoksifen bu modülatörlerdendir ve östrojen reseptörüne bağlanarak östrojeni bloke eder (35). Diğer bir hormon tedavisi yöntemi ise ovaryum fonksiyonlarının durdurulmasıdır. Böylece östrojen üretimi durdurulabilir (36, 37). Kemoterapide ise kanser hücrelerini öldüren ajanlar kullanılmaktadır. Kemoterapi tek başına ya da diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılabilir. Uygulama durumuna bağlı olarak kemoterapi yöntemi çeşitlilik göstermektedir (38). Adjuvan tedavi diğer tedavi yöntemlerinden sonra kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlemek için kullanılmaktadır. Taksanların (dosetaksel ve paklitaksel) diğer tedavilerle eş zamanlı uygulanması ile kanserin tekrarlama sıklığının azalmış olduğu belirlenmiştir (39). Taksanlar neoadjuvan tedavi yönteminde ise, hastanın operasyon öncesinde kanserli dokusunun büyüklüğünü azaltmada kullanılır. Metastatik tedavide amaç ise metastaz yapmış hücreleri öldürmektir. Metastaz yapmış meme kanseri tedavisinde dosetaksel, doksorubisin, paklitaksel, vinorelbin gibi ajanlar kullanılmaktadır (40). Meme kanseriyle tedavide tek bir ilaç yerine ilaç kombinasyonlarının kullanımının daha etkin olduğu görülmüştür. Erken meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaç kombinasyonları siklofosamid, 5-florourasil (CMF kombinasyonları), doksorubisin (Adriamisin), paklitaksel (PTX) (Taksol) ve dosetaksel (3). Sık kullanılan bir kemoterapötik ilaç olan paklitaksel hücrelerde mitozu inhibe ederek apoptozu uyarmaktadır (41, 5).

2.2. Paklitaksel

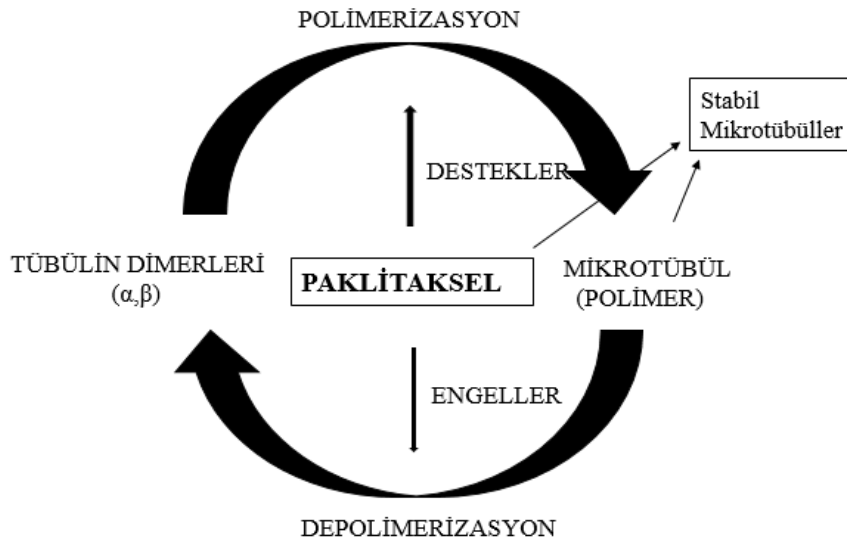
Paklitaksel, Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından binlerce değişik bitkinin kanser üzerine etkisinin araştırılması sırasında bulunmuştur. İlk olarak 1963 yılında *Taxus brevifolia* isimli Pasifik porsuk ağacı özütü keşfedilmiş ardından prelinik çalışmalarda çeşitli tümörlere karşı antitümöral etkisi bulunmuştur ve özütteki etken maddenin paklitaksel olduğu tanımlanmıştır (42). Paklitaksel'in kimyasal açık adı 5 β , 20-epoksi-1,2 α , 4, 7 β , 10 β , 13 α -hekzahidroksitaks-11-en-9 on 4, 10-diasetat 2-benzoat-13 ester (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilizoserin'dir (Şekil 2.2.). Molekülün formülü C₄₇H₅₁NO₁₄, moleküler ağırlığı ise 853,9 dalton'dur. Beyaz renkte ve kristal toz yapıdadır. Erime sıcaklığı 216-217°C'dir. Oldukça lipofilik özelliktedir (43). Sudaki çözünürlüğü 0,3 μ g/ml'dir ve çeşitli organik çözücülerdeki çözünürlüğü daha yüksektir (44).



Şekil 2.2. Paklitaksel'in kimyasal yapısı (42).

Paklitaksel meme ve uterus kanserlerinin tedavisinde kullanılan önemli ilaçlardan biridir (4). Mikrotübülü hedef alan taksanlar geri dönüşümlü olarak β -tübüline bağlanırlar, mikrotübül kompleksini stabilize ederler ve hücre döngüsünü durdurmaya ve apoptoza gidişe neden olacak mikrotübül polimerizasyonunu destekler (45). Paklitakselin hücre ölümünü apoptoz aracılığıyla yaptığı ve bunun da doz bağımlı olarak gerçekleştiği, düşük dozlarda paklitaksel uygulaması sonucunda hücrelerin G2/M interfaz aşamasında biriktiği ve bunun da apoptozla sonuçlandığı bulunmuştur (46, 47). Paklitaksel mikrotübülleri oluşturmak için gerekli olan faktörlerin (guanin trifosfat gibi) yokluğunda bile tübülün dimerlerinin polimerizasyonunu destekler ve daha sonra mikrotübül polimerlerinin

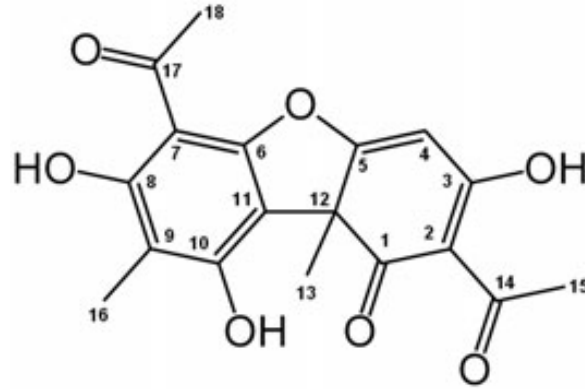
depolarizasyonunu engelleyerek mikrotübülleri stabilize eder (Şekil 2.3.). Böylece paklitakselin hücrelerde mikrotübüllerin toplanmasını artırarak ve depolimerizasyonunu engelleyerek antitümöral etki gösterir (48,49).



Şekil 2.3. Paklitaksel'in etki mekanizması (43)'den modifiye edilmiştir.

2.3. Usnik Asit

Yapılan çalışmalarda çok çeşitli kanser tiplerine karşı bitkisel ve fungus kaynaklı tedavi amaçlı aday moleküler araştırılmaktadır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda likenlerin kanser tedavisinde kullanılabileceği birçok araştırmacı tarafından belirlenmiştir (50-52). Likenler, fungus ile alg ya da siyanobakter gibi bir fotosentetik ortaktan oluşan simbiyotik birlikteliktir. Likenler tarafından polisakkaritler, proteinler ve sekonder metabolitler üretilmektedir ve bilinen 17.000'den fazla türü ve 800'ün üzerinde liken sekonder metaboliti tespit edilmiştir. (53-55). Liken sekonder metabolitleri antitümör, antiinflamatuvar, antiviral, antifungal, antibakteriyel, mutajen, antioksidan ve antinosiseptif gibi önemli etkilere sahiptir (56-58). İlk olarak 1844 yılında izole edilen usnik asit (UA) [2,6- diacetyl-7,9-dihydroxy-8,9b-dimethyl-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandione] en fazla çalışılan liken sekonder metabolitidir. Bu doğal bileşik farmakolojik ve klinik açıdan önemli ilişkiye sahip olabilecek farklı biyolojik ve fizyolojik aktivitelere sahiptir (9, 10). Usnik asit'in kimyasal yapısı Şekil 2.4.' de gösterilmektedir (6).



Şekil 2.4. Usnik asit'in kimyasal yapısı (6).

Usnik asit ile yapılan çalışmalar sonucunda usnik asit'in antiproliferatif (7) ve antiinflamatuvar (59) olduğu, hücre döngüsü (51, 60, 61) ve apoptotik hücre ölümü üzerine (51, 62) etkileri olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda usnik asitin *D. melanogaster* somatik hücreleri üzerine rekombinojenik, mutajenik ve karsinojenik etki gösterdiği (63), insan kan hücrelerinde total antioksidan kapasite (TAC) seviyesini arttırdığı ve bunun sonucunda doza bağlı olarak antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (64). Ayrıca usnik asitin CD44, Siklin D2 ve c-myc mRNA seviyelerini azalttığı, Rac1 ve RhoA aktivitelerini düşürdüğü ve böylece kanser hücresi metastazını inhibe etme yeteneğinin olduğu ve antikanser tedavilerinde kullanılabileceği gösterilmiştir (65). MCF7 ve H1299 hücreleri üzerine yapılan uygulamada usnik asit'in sekonder metabolitinin mikrotübüller üzerinde herhangi bir morfolojik değişikliğe neden olmadığı ve mitotik indekste bir artış meydana getirmediği, bunun sonucunda da usnik asitin antineoplastik aktivitesinin mikrotübül oluşumu veya stabilizasyon değişimi ile ilişkili olmadığı bulunmuştur (8).

2.4. Kanser Tedavisinde Mikrotübüllerin Rolü

Mikrotübüller çok çeşitli hücresel işlevlerde rol oynayan hücre iskeleti elemanlarıdır. Hücre içi taşımada, hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılmasında, hücre polaritesinin ve morfogenezin düzenlenmesinde görev alırlar. Ayrıca silia ve flagella oluşumunda da görev alırlar (66). Mikrotübüller α -tübülin ve β -tübülin heterodimerlerinin polimerizasyonu yoluyla oluşur. Bu polimerizasyon β -tübüline bağlı GTP'nin hidroliziyle düzenlenmektedir (66). Her bir α - ve β -tübülin heterodimerine GTP molekülü bağlanabilir. GTP'nin α -tübüline bağlanması dimerde

fiziksel olarak kısıtlanmış olduğu için geri dönüşümsüz iken β -tübüline bağlanması geri dönüşümlüdür, böylece polimerleşme sırasında ve polimerleşmeden hemen önce GTP, GDP'ye hidroliz olabilmektedir. Mikrotübüller hızla büyüyen artı uca ve yavaş büyüyen eksi uca sahip polar moleküllerdir. Bu polarite hareketin yönünün belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Mikrotübüllerin uzaması veya kısılması tübülün yapıya eklenme oranı ile ve buna karşılık GTP hidroliz oranı ile belirlenmektedir. GTP hidrolizinden daha hızlı bir şekilde GTP bağlı tübülün molekülleri eklenirse mikrotübülün artı ucunda GTP başlığı kalır ve mikrotübül uzamaya devam eder. Eğer polimerizasyon hızı yavaş ise bu durumda artı uçtaki GTP bağlı tübülün GDP'yi hidroliz eder ve tübülün ayrışır, hızlı depolimerizasyon ve kısıalma meydana gelir (67). Mikrotübüller mitozda oynadıkları etkin rol nedeniyle kanser tedavisi için önemli bir hedef durumundadır. Anafaz evresinde kromozomlara bağlı mikrotübüller kısıalır. Pek çok kemoterapötik ilaç hücrenin anafaza girmesini önleyerek hücre döngüsünü durdurmaya çalışır (68, 69). Vinblastin gibi Vinca alkaloidleri mikrotübül destabilizatörleri olarak sınıflandırılmaktadır ve yeterince yüksek konsantrasyonlarda verildiğinde mikrotübül polimerizasyonunu inhibe ederler (70). Paklitaksel ve dosetaksel gibi taksanlar ise mikrotübülleri stabilize ederler ve yüksek konsantrasyonlarda polimerizasyonu desteklerler (68, 71). Mikrotübüllerin mitoz sırasında interfazda olduğundan birkaç kat daha dinamik olduğu gösterilmiştir (72, 73). Mikrotübülü hedef alan ilaçlarla bu dinamikler bozulur, iğ-toplanma kontrol noktaları (spindle-assembly checkpoint) aktive edilir ve hücre döngüsü metafaz anafaz geçişinde durdurulur (74).

2.5. Hücre Ölüm Yolları

2.5.1. Apoptozis

Çok hücreli organizmalarda apoptotik yollar; homeostazın sağlanmasında, embriyogenezde ve patojenlere karşı savunmada kritik öneme sahiptir (75). Fizyolojik süreçte apoptozun rolü mitozun oynadığı rol kadar önemlidir. Yetişkin bir insan vücudunda homeostazın düzenlenmesi için apoptoz ile ölenlerin yerine her gün 10 milyar hücrenin yapıldığı tahmin edilmektedir (76). Bu sayı normal gelişimde, yaşlanmada veya hastalık boyunca apoptoz arttığı zaman artabilir. Hücre ölümünün düzenlenmesindeki anormallikler kanser, AIDS, iskemi, Parkinson ve Alzheimer gibi

hastalıkların oluşumunda önemli bir rol oynayabilir. Bazı durumlarda yetersiz apoptoz gerçekleşirken bazı durumlarda ise aşırı apoptoz görülebilmektedir. Kanserde hücre döngüsü düzenleme mekanizmaları bozulur ve hücrelerin aşırı artışı meydana gelirken ölümlerinde azalma olur (77). Karsinogenezde apoptozun durdurulmasının bazı kanserlerin gelişimde ve ilerlemesinde kilit rol oynadığı düşünülmektedir (78).

Apoptoz, kaspazların aktive edilmesi ile mitokondriyel zar geçirgenliğinin artması, kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanmasına neden olan programlanmış bir hücre ölüm biçimidir (79). İçsel ve dışsal olmak üzere iki şekilde tetiklenebilmektedir. İçsel tetikleme, DNA hasarı, büyüme faktörü eksikliği ve oksidatif stres gibi hücre içi ölüm sinyalleri tarafından başlatılır (80). İçsel tetikleme mekanizması, mitokondriyel zar geçirgenliğini arttırarak sitokrom c gibi proteinlerin salınımını ayarlayan Bcl-2 (B hücre lenfoma) ailesi üyeleri aracılığıyla devam eder (81). Mitokondriyel zar geçirgenliği, Bcl-2 ailesinin üyeleri arasındaki dinamik etkileşim tarafından düzenlenir (82, 83). Pro-apoptotik üyeler (Bak, Bax ve Bok) zar geçirgenliğini arttırırken, anti-apoptotik üyeler (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1) zar geçirgenliğinin arttırılmasını engeller. BH-3 proteinleri ise (Bid, Bad, Bim, Bik, BNIP3, BMF, HRK, Noxa ve Puma) pro-apoptotik üyeleri aktive ederken, anti-apoptotik üyeleri engeller (84, 85). Dışsal tetikleme, TNFR (Tümör nekrozis faktör reseptörleri) ailesi üyelerinin (Fas, TRAIL ve TNFR1) ligandları tarafından aktive edilmesiyle başlatılır. Bu reseptörlerinin trimerize olması, kaspaz-8 öncüllerinin ortama toplanmasını sağlayan DISC (ölümü indükleyen sinyal kompleksi) ve bu öncüllerin bölünerek kaspaz-8'lerin aktif hale geçmesini sağlayan FADD (Fas-bağlı ölüm bölgesi) birlikteliğinin oluşmasına neden olur. Gerek içsel tetikleme sonucu oluşan sitokrom c'ler gerek dışsal tetikleme sonucu oluşan aktif kaspaz-8'ler diğer kaspazları (kaspaz-3, -6, -7) aktive ederek DNA parçalanmasını ve hücre ölümünü uyarır (86, 87).

Kanser tedavisinde kullanılan çoğu ajan tümör hücrelerini seçici olarak öldürmek üzerine tasarlanmıştır. Kanser tedavisinde kullanılan bu ajanlar apoptozu arttırmaktadır ve eğer apoptotik süreçte bir bozulma meydana gelirse tedavinin duyarlılığı azalacaktır (80).

2.5.2. Nekrozis

Nekroz, organellerin şişmesi, şişkin ve gergin durumdaki çekirdek, hücre zarının yırtılmasını takiben hücrenin lizise uğraması ile karakterize olan bir hücre ölüm biçimidir (88, 89). Kaspazların aktivasyonu ile ilgili olmayan nekroz, hücre hasarı veya patolojiye cevaben gelişir (90). Nekrotik hücreler HMGB1 (High mobility group box 1) ve HDGF (hepatoma kaynaklı büyüme faktörü) gibi faktörler salgılayarak NLRP3 (NACHT, LRR ve PYD domainlerini içeren protein 3)'ü uyarırlar (91). NLRP3'ün uyarılması inflamazomun aktive edilmesine ve sonuçta pro-inflamatuar sitokin olan IL-1 β (interlökin 1 beta)'nin salgılanmasına neden olur. İnflamazomun aktive edilmesi, hasar almış hücrenin mitokondrisinin ürettiği ATP aracılığıyla gerçekleşir (92).

Nekrozun programlanmış hücre ölümü biçimi olan nekroptoz son yıllarda ilgi çekmeye başlamıştır. Nekroptoz, apoptozun bazı özelliklerini gösterebildiği gibi nekrozun da morfolojik özelliklerini barındırmaktadır. Nekrozda olduğu gibi hücre organellerin şişmesi, hücre zarının bütünlüğünü kaybetmesi ve lizise uğraması görülürken, apoptozda olduğu gibi hücre ölümü ile sonuçlanan çoklu protein komplekslerinin oluşumu meydana gelmektedir. Nekroptozu tetikleyen biyokimyasal olaylar halen iyi anlaşılmamış olmakla birlikte, apoptozu tetikleyen ölüm reseptörleri nekroptoz ile de ilişkilidir (93, 94). TNFR1 aracılı nekroptozis, TRADD (Tümör nekroz faktörü alfa reseptör-1 ilişkili ölüm domain reseptörü), TRAF (TNF reseptör ilişkili faktör), cIAP (hücrel apoptoz inhibitörü) ve RIP1 (reseptör ile etkileşen serin/treonin proteini)'i bir araya getiren kompleks I'in oluşumunu uyarır (94, 95). RIP1'in cIAP tarafından ubiquitinleşmesi ardından CYLD (silindromatozis) tarafından deubikitinleşmesi RIP1, RIP3, TRADD, FADD ve kaspaz-8'i bir araya getiren kompleks II'nin oluşumuna neden olur (96-98). Bu noktada kaspaz-8'in engellenmesi veya cFLIP [hücrel FLICE (FADD-benzeri IL-1 β -dönüştürücü enzim)-inhibitör proteini] ile etkileşmesi durumunda apoptoz yolu engellenip nekroptoz yolu açılırken, etkileşimin engellenmesi durumunda ise apoptoz yolu ile hücre ölümü gerçekleştiği belirtilmektedir. Nekroptoz yolunu düzenlenmesi ROS (reaktif oksijen türleri), LMP (lizozomal membran permeabilizasyonu) ve PARP (Poli (ADP-riboz) polimeraz) aracılığıyla olmaktadır (94).

2.6. Meme Kanseri Hücre Hatlarının Genel Özellikleri

4T1 meme kanseri hücreleri ilk olarak Fred Miller ve arkadaşları tarafından izole edilmiş olup transplante edilebilen bir tümör hücre hattıdır (99, 100). 4T1 hücreleri invaziv olup metastatik özellik göstermektedir. İnokülasyondan sonraki iki hafta içerisinde akciğer, karaciğer, kemik ve beyine primer tümör metastazı yapması ile karakterize olup bu özelliği ile insan meme kanserinin dördüncü evresine yakından benzemektedir. (101, 102). Kültür ortamında her 2-3 günde bir 1:6, 1:8 arasındaki subkültür oranında pasajlanması önerilmektedir (103). HCC38 hücre hattı 50 yaşında yetişkin bir kadından elde edilen memenin primer duktal karsinomasıdır. Tutunucu karakterde ve epiteliyal morfolojiye sahiptir. HCC38 hücreleri östrojen, progesteron reseptörü negatif olan ve Her2/neu amplifikasyonu olmayan triple negatif insan meme kanseri hücre hattıdır. Kültür ortamındaki hücrenin 1:2, 1:4 subkültür oranı arasında 2-3 günde bir pasajlanması önerilmektedir (104).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

Çalışmamızda kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler aşağıda sıralanmıştır. Penisilin-Streptomisin, RPMI 1640 (Lonza, Belçika); Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (ICN Biomedicals, ABD); Usnik asit (Sigma, ABD); MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma, ABD); Fötal Buzağı Serum (FBS) (Biological Industries, İsrail); PI (Propidyum İyodür) (BD, ABD); YO-PRO-1 (ThermoFisher, ABD); FACS Flow, Cell Wash (BD, ABD); Tripan mavisi, (Sigma, ABD); Dimetil sülfoksit (DMSO) (OriGen Biomedical AB, İsveç).

3.2. İlaç Formülasyonlarının Hazırlanması

Tez kapsamında kullanılan usnik asit sekonder metaboliti Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nden, paklitaksel ise Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden temin edildi. Paklitaksel ve usnik asit solüsyonları DMSO içerisinde hazırlandı ve besiyeri ile seyreltik çözeltileri hazırlanarak deneylerde kullanıldı.

3.3. Hazırlanan Çözeltiler ve Solüsyonlar

Deneyler sırasında RPMI-1640 besiyeri ve MTT solüsyonu hazırlanarak kullanıldı. RPMI-1640 besiyerinin hazırlanması için L-Glutamin içeren RPMI-1640 içerisine %1 oranında penisilin-streptomisin ve %10 oranında FBS eklendi. 4°C'de saklandı. MTT solüsyonunun hazırlanması için ise karanlık ortamda 5 mg MTT, 1 ml PBS içerisinde çözüldü ve solüsyon 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Her bir deney aşaması kullanımı için taze hazırlandı.

3.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Sayısının Belirlenmesi

Deneyler için 96 kuyulu düz tabanlı plaklar kullanıldı. MTT testi için kuyu başına ne kadar hücre gerekli diye $5 \cdot 10^3$, $10 \cdot 10^3$, $15 \cdot 10^3$, $20 \cdot 10^3$, $25 \cdot 10^3$, $50 \cdot 10^3$, $60 \cdot 10^3$, $70 \cdot 10^3$, $80 \cdot 10^3$, $90 \cdot 10^3$ ve $10 \cdot 10^4$ sayıda HCC38 hücresi 50 µl RPMI-1640 besiyeri içinde ekim yapıldı ve plak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu. Her plaktaki hücrelerin çoğalması MTT testi ile değerlendirildi ve en uygun olan hücre

miktarı her bir kuyu için 60.10^3 hücre olarak belirlendi. 4T1 hücreleri için Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Laboratuvarları'nda önceden belirlenen hücre sayısı olan 20.10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ekim yapıldı.

3.5. Hücre Kültürü İdamesi

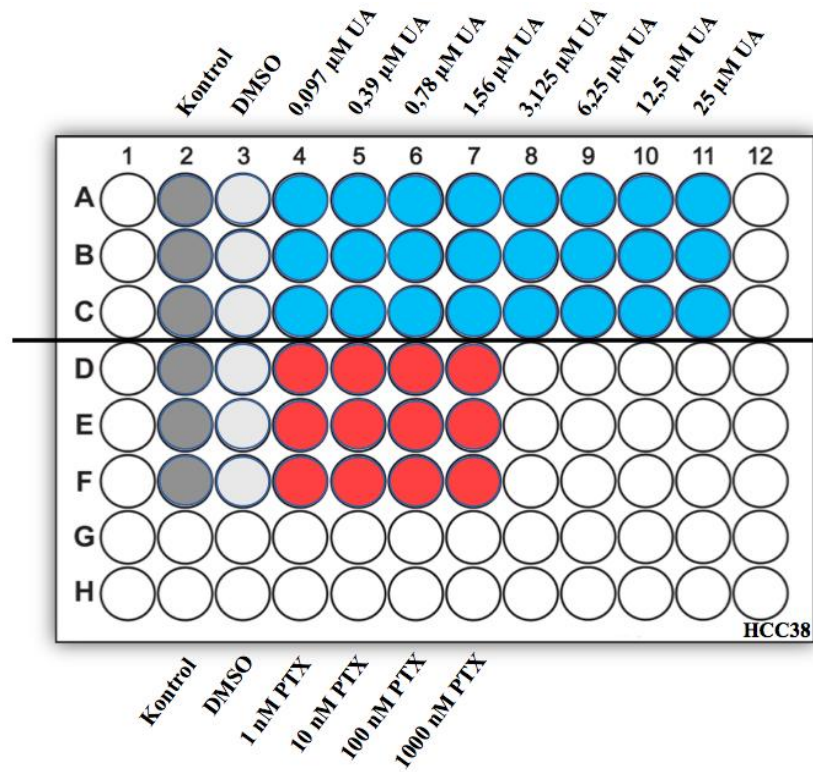
Deneylerde kullanılan 4T1 ve HCC38 hücreleri Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi. 15 ml'lik falkon tüp içerisine çözülen hücreler aktarıldı. Falkon 15.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atıldı ve falkona 3 ml besiyeri eklenerek pellet süspansiyon edildi. Süspansiyondan alınan hücreler thoma lamında sayıldı. Sayımdan sonra kapağı filtreli flasklara hücreler RPMI-1640 besiyeri içerisinde ekim yapıldı. Flask 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında flask inkübatörden alındı ve öncelikle mikroskop altında incelendi. 6 ml 1X steril PBS ilave edildi ve tüm flask yüzeyine yayıldı. Sonrasında çekilerek uzaklaştırıldı. 600 μl Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve flaskın her tarafına yayıldı. 37°C 'de 3-5 dakika inkübatörde bekletildi. Sürenin sonunda hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında kontrol edildi. 10 ml besiyeri eklendi ve iyice pipetaj yapıldı. 7 ml'si 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alındı ve geri kalan 3 ml ise flask içerisine koyuldu, üzerine 15 ml besiyeri ilave edilerek mikroskopta bakıldıktan sonra 37°C inkübatöre kaldırıldı. Geriye kalan 7 ml içerisinden istediğimiz miktarda hücre alabilmek için thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı.

3.6. Hücre Sayımı

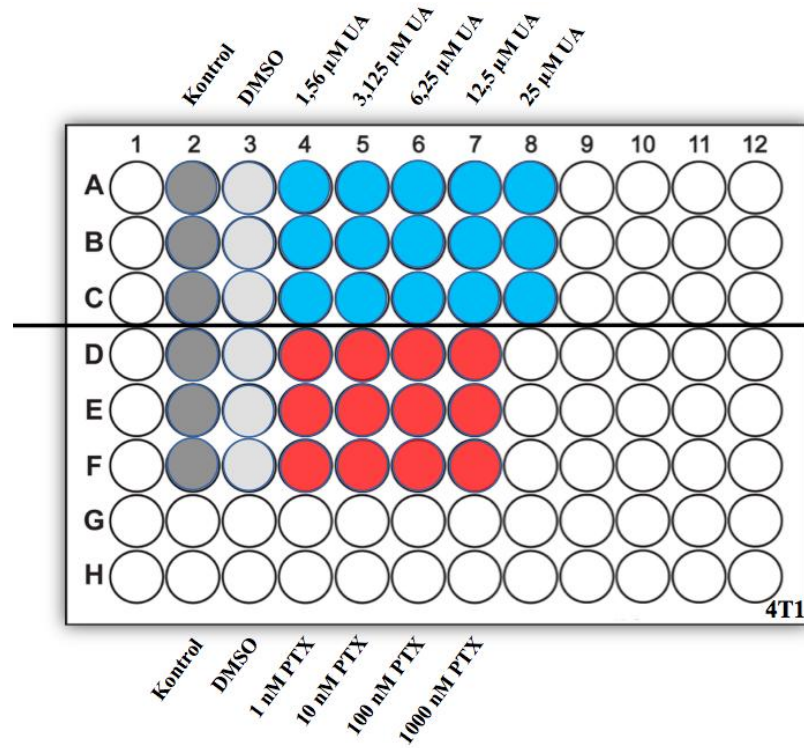
Kültür ortamındaki hücreler süspansiyon hale getirildikten sonra içerisinden 10 μl alınarak 90 μl besiyeri ile seyreltildi. Daha sonra bu seyreltilmiş halde bulunan hücre stoğundan 10 μl alınıp 10 μl tripan mavisi boyası ile karıştırılarak Fuchs-Rosenthal lamı üzerine yayılarak mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Tripan mavisi boyası canlı hücrelerin içerisine girmezken ölü hücrelerin içerisine girme özelliğindedir ve bu özelliklerinden dolayı sayım yaparken tripan mavisi boyasının içerisine girdiği koyu mavi gözüken hücreler ölü, açık renk görülen hücreler canlı olarak sayıldı.

3.7. MTT Testi

96 kuyulu düz tabanlı plaklara kuyu başına belirlenen hücre sayısı kadar hücre 50 µl hacim içerisinde ekildi ve hücreler flask yüzeyine yapışana kadar (~16 saat) 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. Daha sonra 4T1 hücreleri için 1,56, 3,125, 6,25, 12,5 ve 25 µM konsantrasyonlarda, HCC38 hücreleri için 0,097, 0,39, 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5 ve 25 µM konsantrasyonlarda uygulanacağı sırada 14 µM DMSO içerisinde çözülerek taze olarak hazırlanan usnik asit ve 1, 10, 100 ve 1000 nM konsantrasyonlarda DMSO içerisinde çözülerek hazırlanan paklitaksel çalışılan her iki hücre hattı üzerine önce ayrı ayrı olacak şekilde uygulandı (Şekil 3.1., Şekil 3.2.)

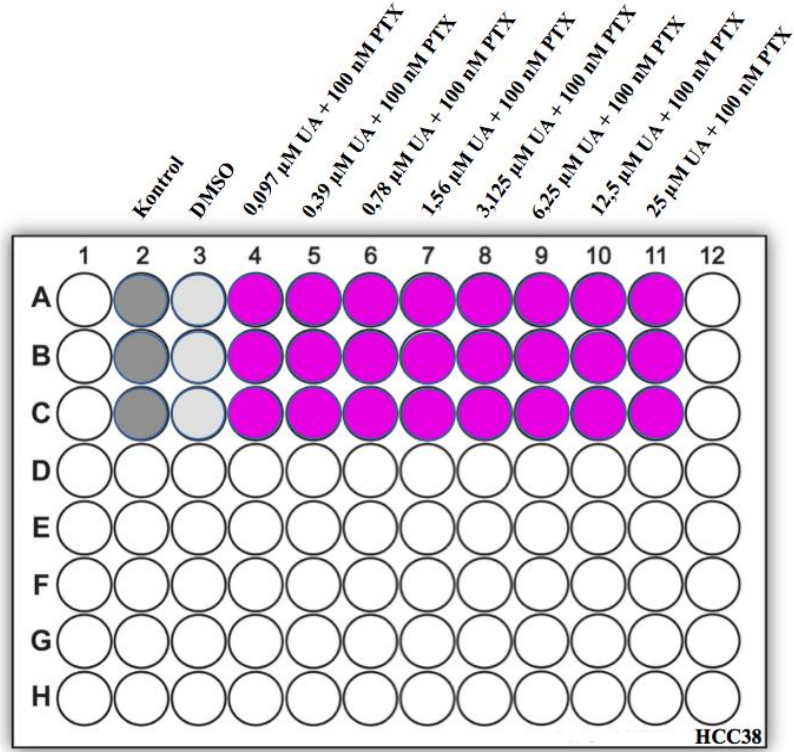


Şekil 3.1. HCC38 hücrelerine usnik asit ve paklitaksel uygulmasının şematik gösterimi.

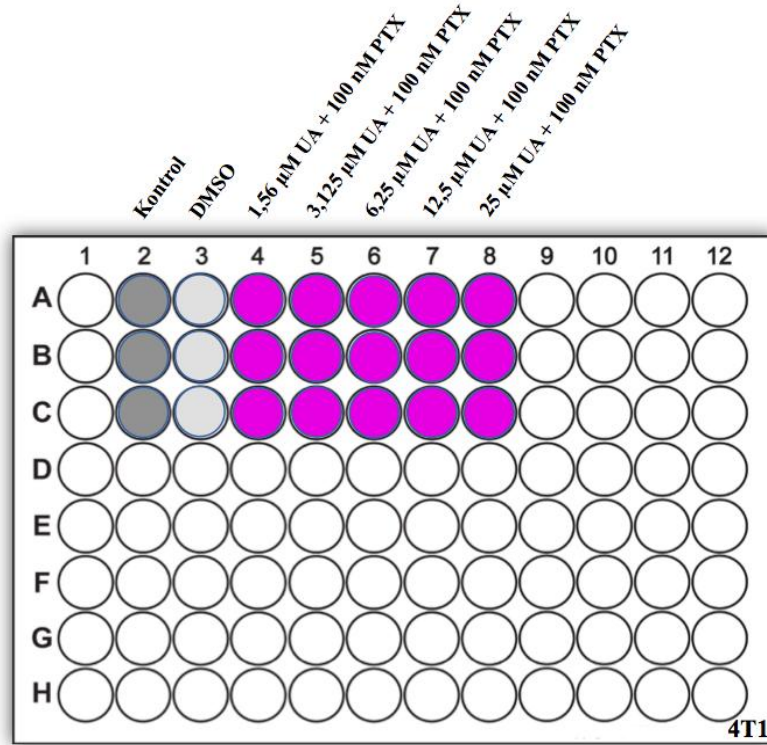


Şekil 3.2. 4T1 hücrelerine usnik asit ve paklitaksel uygulmasının şematik gösterimi.

MTT sonuçlarının elde edilmesinden sonra etkili dozun belirlenmesiyle paklitakselin 100 nM konsantrasyonu ile usnik asitin artan konsantrasyonları birlikte olacak şekilde çalışılan hücre hatları üzerine uygulama yapıldı. Sadece besiyeri ve hücrenin olduğu kontrol grubuna formülasyon uygulaması yapılmadı ayrıca çözücü olarak kullanılan DMSO'nunda canlılık üzerine etkisine bakmak için sadece DMSO uygulanan bir grupta da çalışıldı (Şekil 3.3., Şekil 3.4.).

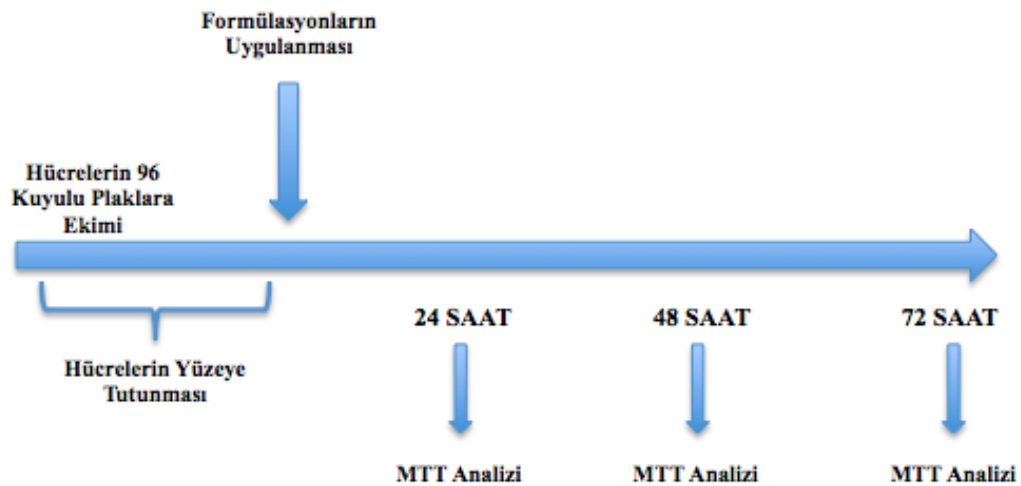


Şekil 3.3. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitakselle usnik asit konsantrasyonlarının birlikte uygulanmasının şematik gösterimi.



Şekil 3.4. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitakselle usnik asit konsantrasyonlarının birlikte uygulanmasının şematik gösterimi.

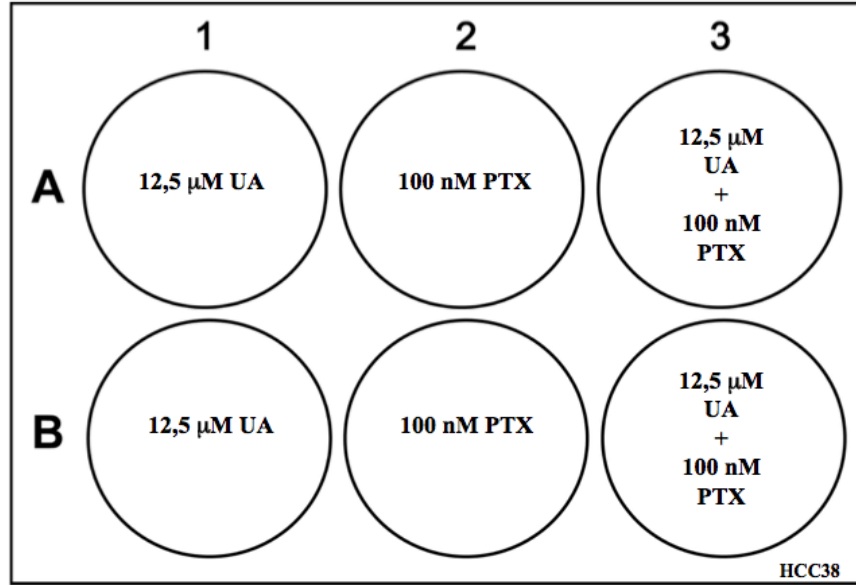
37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 24, 48 ve 72 saat bekletildikten sonra hücreler mikroskopla incelendikten sonra hücrelerin üzerine 50 µl MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat 37°C’de %5 CO₂’li inkübatöre kaldırıldı. 4. saatin sonunda her bir kuyuya 80 µl MTT Lizis Buffer eklendi ve 16 saat boyunca 37°C’de %5 CO₂’ li inkübatöre kaldırıldı. Sürenin sonunda spektrofotometrik olarak 570 nm’de hücrelerin absorbans değerleri okundu (Şekil 3.5.).



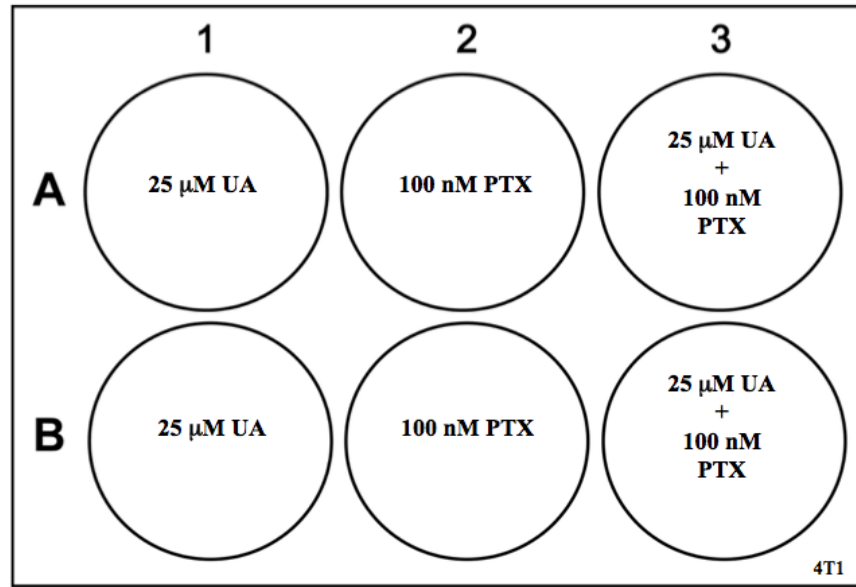
Şekil 3.5. MTT testi için deney tasarımının şematik gösterimi.

3.8. Akım Sitometri

Hücrelerin apoptoza gidişi YO-PRO-1 apoptoz kiti ile nekrotik hücrelerin değerlendirilmesi PI boyama ile akım sitometri cihazında yapıldı. Yeşil floresan prob olan YO-PRO-1 hücre zarı belirli bir geçirgenliğe ulaştığında hücrenin içerisine girebilir (105, 106). Hücre zarı apoptoz sürecinde bir miktar geçirgen hale gelir ve YO-PRO-1 probu hücrenin içerisine bu sırada kolay bir şekilde geçerek nükleik asitlere bağlanır. PI ise nekrozun belirlenmesinde kullanılır, bu prob yalnızca nekrotik hücrelerin zarından geçebilir, apoptotik hücre zarından geçemez. YO-PRO-1 ve PI problemlerinin ikisine de canlı hücre zarı geçirgen değildir (107). 6 kuyulu plaklara ekilen HCC38 hücreleri için 12,5 µM UA, 100 nM PTX ve 12,5 µM UA + 100 nM PTX uygulaması yapılırken, 4T1 hücreleri için 25 µM UA, 100 nM PTX ve 25 µM UA + 100 nM PTX uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). Kontrol grubu olarak iki hücre hattında da formülasyon uygulanmayan hücre grubu kullanılmıştır (şekillerde gösterilmemiştir.).



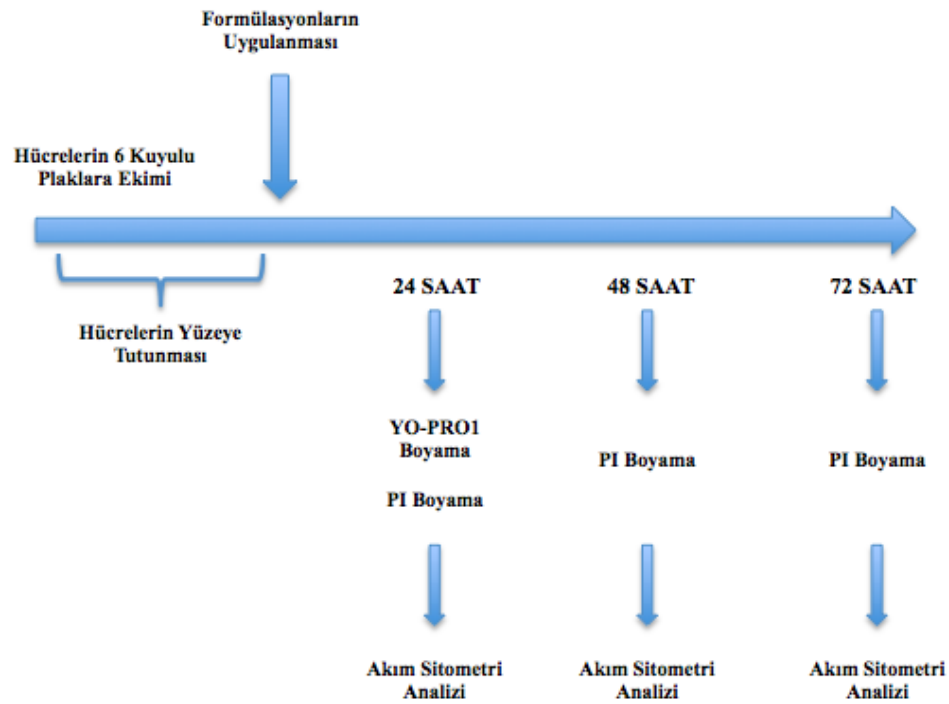
Şekil 3.6. HCC38 hücrelerinin akım sitometrik değerlendirilmesi için formülasyonların uygulanmasının şematik görünümü.



Şekil 3.7. 4T1 hücrelerinin akım sitometrik değerlendirilmesi için formülasyonların uygulanmasının şematik görünümü.

Formülasyon uygulamasından sonra 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Apoptozun değerlendirilmesi her iki hücre hattında da YO-PRO-1 kiti sadece 24 saat hücrelerinde yapıldı. PI ile hücre ölüm oranlarının değerlendirilmesi her 3 saat için de yapıldı. YO-PRO-1 kiti ile hücrelerin değerlendirilmesi için öncelikle kültür ortamındaki üst sıvı 6 kuyulu plak içerisinden çekildi ve 15 ml'lik falkon içerisine aktarıldı. Plak serum fizyolojik ile yıkandı. Plak

yüzeyine yapışan hücreleri süspansiyon haline getirmek için Tripsin-EDTA kullanıldı. Hücrelerin plak yüzeyinden kalktığı mikroskop ile takip edildikten sonra hücrelerin üzerine serum içeren besiyeri ilave edildi. Hücreler 15 ml'lik falkon içerisine aktarıldı. 15 ml'lik falkon, 1800 rpm +4°C'de 5 dakika santrifüj edildi ve sonrasında supernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra 1 ml soğuk PBS ile yeniden süspansiyon haline getirildi. Filtreden geçirildikten sonra 1 µl YO-PRO-1, 1 µl PI ilave edildi. 30 dakika buzda inkübasyona bırakıldıktan sonra akım sitometri cihazında okuma yapıldı. PI boyama ile değerlendirme yapmak için hücrelere YO-PRO-1 kit protokolü uygulandı. YO-PRO1 protokolünden farklı olarak işlemler oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirildi ve en son aşamadaki 30 dakika inkübasyon süresi yerine 5 dakika inkübasyon gerçekleştirilip akım sitometri cihazında okuma yapıldı (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Akım sitometri analizi için deney tasarımının şematik gösterimi.

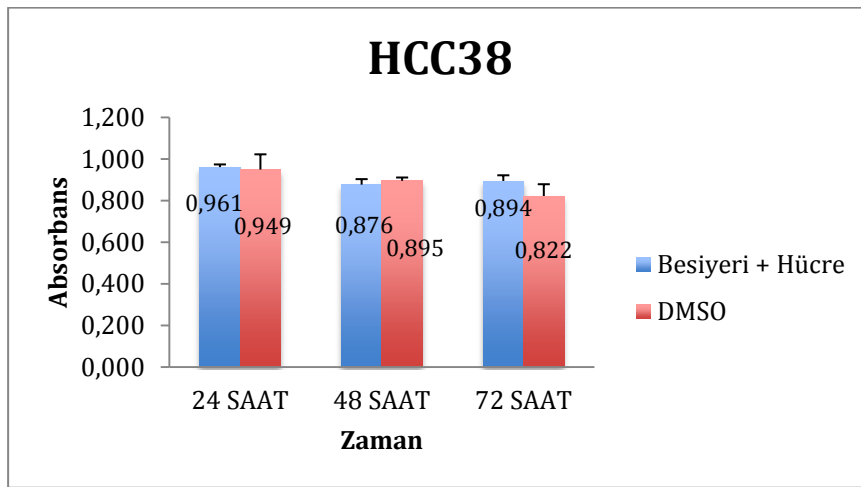
3.9. İstatistiksel Analiz

Veriler en az 2 teknik tekrar ve en az 3 biyolojik tekrar olacak şekilde elde edildi. SPSS 20 programı aracılığıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Student's t-testi kullanılarak analizler yapıldı. Post-hoc test olarak Dunnett testi kullanıldı. Analiz sonucunda $P < 0,05$ olarak hesaplanan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

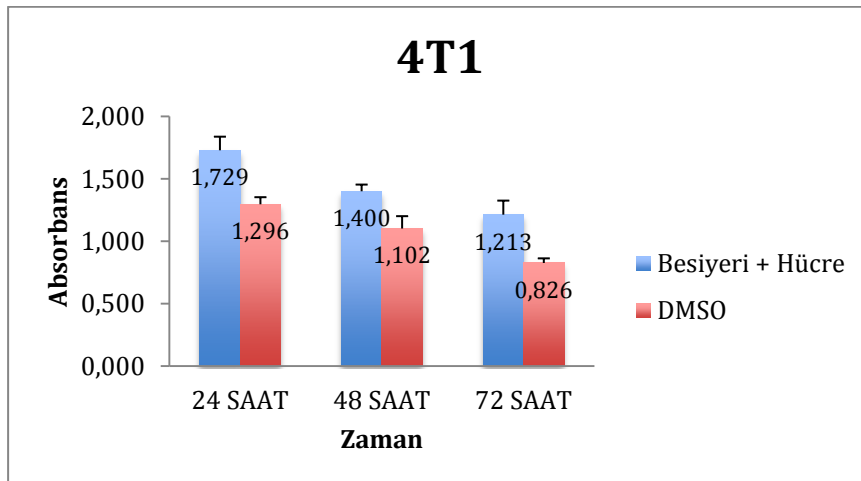
4. BULGULAR

4.1. MTT Testi Analizi

Paklitaxelin ve usnik asitin hazırlanmasında kullanılan DMSO'nun hücre canlılığı üzerine etkisi HCC38 ve 4T1 hücrelerinde değerlendirildi ve içerisine formülasyonun uygulanmadığı besiyeri ve hücrenin bulunduğu grupta arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0,05$) (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). Bu nedenle her iki hücre hattı için de kontrol grubu olarak formülasyonun uygulanmadığı grup kontrol grubu olarak kullanıldı.



Şekil 4.1. HCC38 hücrelerinin zamana bağlı olarak değişimi ve DMSO'nun hücre canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.2. 4T1 hücrelerinin zamana bağlı olarak değişimi ve DMSO'nun hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.1.1. HCC38 Hücrelerinin MTT Analizi

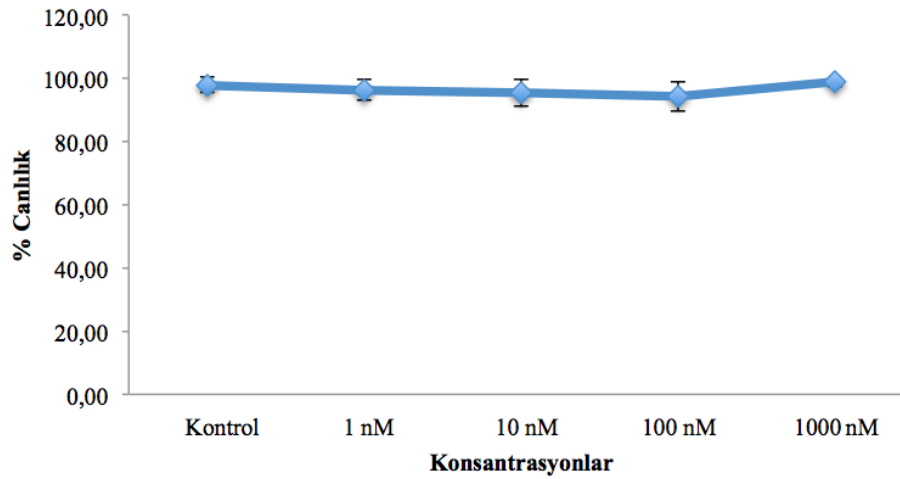
HCC38 Hücrelerine Paklitaksel Uygulamasının MTT Analizi

HCC38 hücrelerine paklitakselin 24 saat boyunca artan konsantrasyonlarda uygulanması hücre canlılığı üzerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($P>0,05$) (Tablo 4.1. ve Şekil 4.3.).

Tablo 4.1. HCC38 hücrelerine paklitakselin 24 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
	100,00	95,79	101,03	99,69	98,67
	97,54	97,95	92,51	96,51	99,18
	98,05	99,59	98,15	98,15	100,72
	94,23	94,78	93,96	87,64	96,98
	100,00	90,66	89,01	91,48	97,25
		99,45	98,08	92,03	100,00
Ortalama	97,96	96,37	95,46	94,25	98,80
Standart Sapma	2,37	3,40	4,42	4,61	1,48

HCC38 (PAKLİTAKSEL - 24 SAAT)



Şekil 4.3. HCC38 hücrelerine paklitakselin 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.

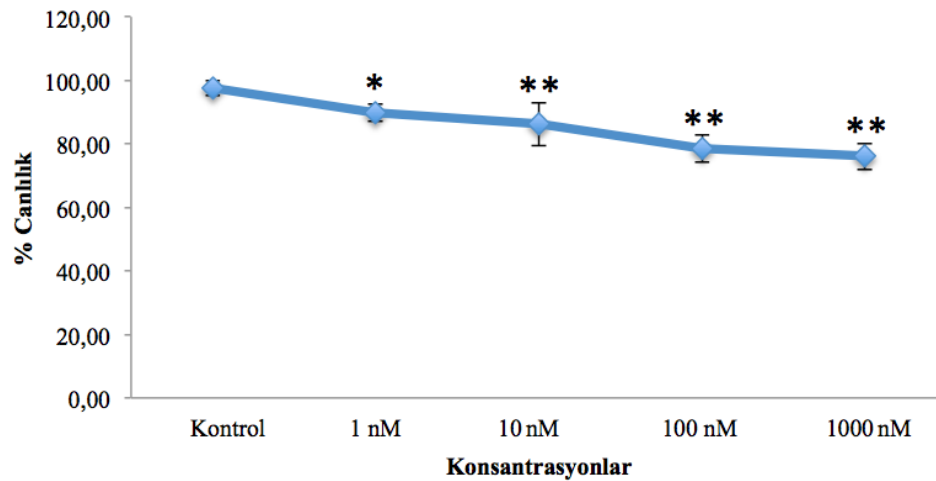
48 saat boyunca paklitaksele maruz kalan hücrelerin canlılığı artan konsantrasyona bağlı olarak azalmıştır. Bu azalma 1 nM ve üzerindeki uygulamaları da kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır. 100 nM paklitakselin 48 saat boyunca uygulanması

HCC38 hücrelerinde hücre canlılığını %78'lere düşürmüştür (Tablo 4.2. ve Şekil 4.4.).

Tablo 4.2. HCC38 hücrelerine paklitakselin 48 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

Kontrol	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
94,25	91,16	81,22	74,70	78,01
96,24	90,17	82,21	77,13	70,50
100,00	85,08	77,90	75,14	73,15
96,66	91,54	95,32	80,40	77,95
100,00	91,76	89,98	84,86	80,62
98,00		90,42		
Ortalama	97,53	89,94	86,17	78,44
Standart Sapma				
2,26	2,79	6,71	4,23	4,11

HCC38 (PAKLİTAKSEL - 48 SAAT)

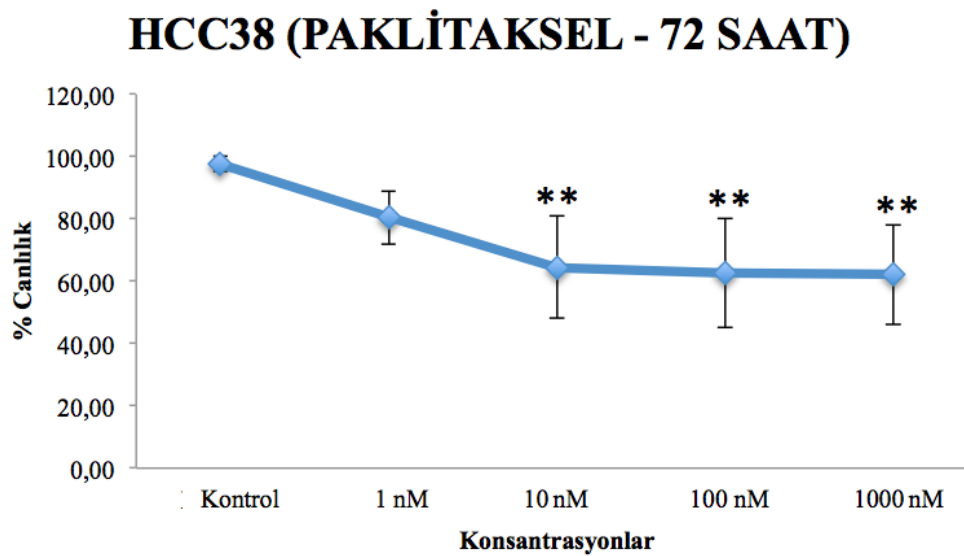


Şekil 4.4. HCC38 hücrelerine paklitakselin 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

HCC38 hücreleri üzerine paklitakselin 72 saat boyunca 10 nM konsantrasyonda uygulanması hücre canlılığını %33 civarında azaltmıştır. Bu ve daha yüksek konsantrasyonlarındaki azalmalar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır (Tablo 4.3. ve Şekil 4.5.).

Tablo 4.3. HCC38 hücrelerine paklitakselin 72 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

Kontrol	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
94,52	72,81	50,33	47,59	46,93
99,45	70,83	49,01	44,19	50,11
100,00	75,88	50,11	49,01	46,60
96,34	87,10	75,27	75,91	72,26
95,91	92,04	78,71	76,34	74,41
100,00	83,87	83,66	83,01	81,94
Ortalama	97,70	80,42	64,51	62,68
Standart Sapma	2,40	8,51	16,33	17,50

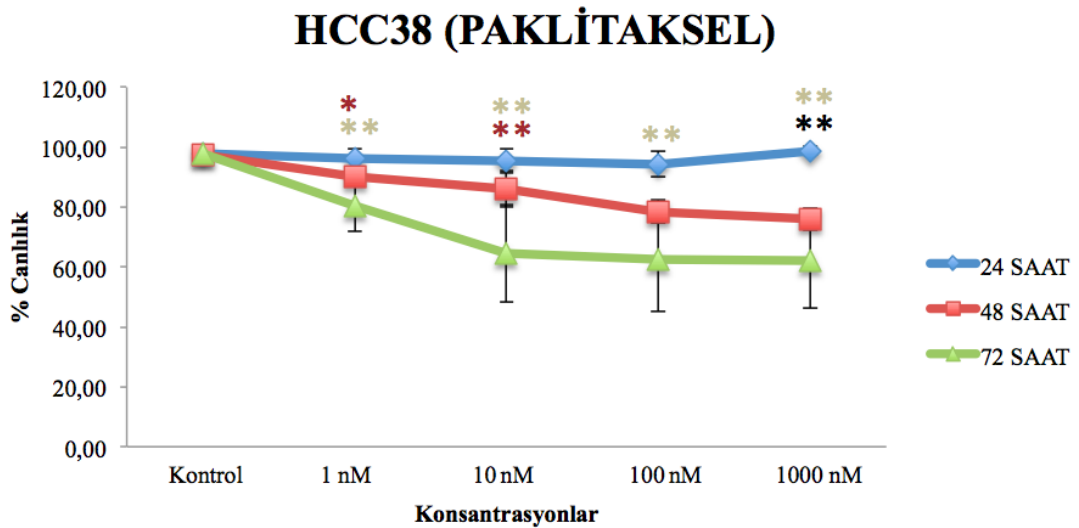


Şekil 4.5. HCC38 hücrelerine paklitakselin 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (** $P < 0,01$).

HCC38 hücreleri üzerine paklitakselin artan konsantrasyonlarda uygulanmasını zamana bağlı olarak karşılaştırdığımızda 48 ve 72 saatte istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülürken 24 saatte kontrol grubuna göre bir fark görülemediği ($P > 0,05$). Paklitakselin 10 nM'a kadarki düşük konsantrasyonlarda 72 saat boyunca uygulanması ile canlılıkta önemli ölçüde bir azalma görülürken daha yüksek konsantrasyonlarında bu azalmanın sabit kaldığı görülmektedir. 24 saat süreyle paklitakselin 100 nM konsantrasyonunun uygulanması kontrole göre anlamlı değil ($P > 0,05$) iken 72 saat uygulamasında anlamlı olan bu azalma %35 civarında olmuştur. (Tablo 4.4. ve Şekil 4.6.).

Tablo 4.4. HCC38 hücrelerine paklitakselin uygulamasının zamana bağlı MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
24 SAAT	97,96	96,37	95,46	94,25	98,80
48 SAAT	97,53	89,94	86,17	78,44	76,05
72 SAAT	97,70	80,42	64,51	62,68	62,04



Şekil 4.6. HCC38 hücrelerine paklitakselin uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi (24-48 Saat $**P < 0,01$; 24-72 Saat $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; 48-72 Saat $**P < 0,01$).

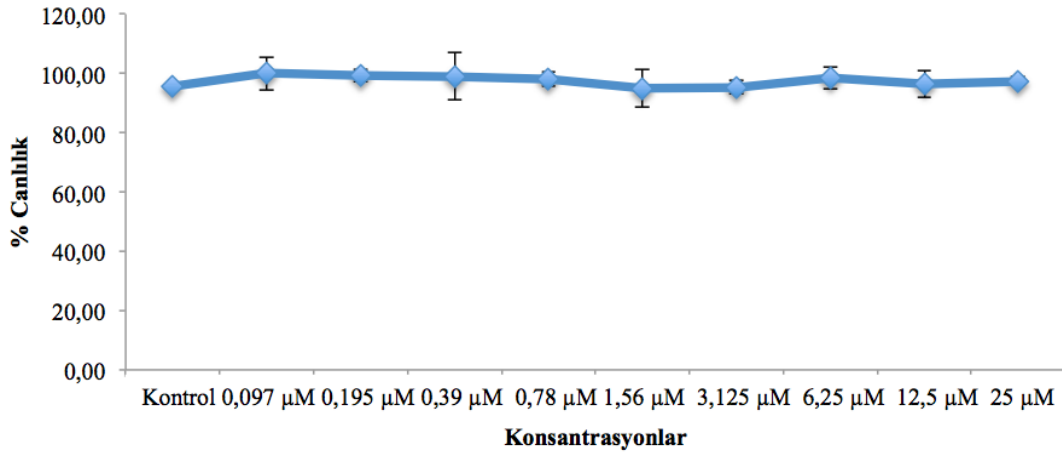
HCC38 Hücrelerine Usnik Asit Uygulamasının MTT Analizi

HCC38 hücre hattı üzerine 24 saat boyunca tek başına usnik asitin artan konsantrasyonlarının uygulanmasının hücre canlılığı üzerine kontrol grubuna kıyasla istatistiksel bir fark oluşturmamıştır ($P > 0,05$) (Tablo 4.5. ve Şekil 4.7.).

Tablo 4.5. HCC38 hücrelerine usnik asitin 24 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

	Kontrol	0,097 μ M	0,195 μ M	0,39 μ M	0,78 μ M	1,56 μ M	3,125 μ M	6,25 μ M	12,5 μ M	25 μ M
	96,17		96,88	96,02	96,31	91,06	93,44	97,54	93,06	96,53
	94,78	103,84	100,71	92,90	97,16	91,48	94,78	95,15	94,37	98,90
	95,93	96,02	100,43	107,95	100,71	102,41	97,87	102,70	101,56	96,66
Ortalama	95,63	99,93	99,34	98,96	98,06	94,99	95,36	98,46	96,33	97,36
Standart Sapma	0,74	5,52	2,14	7,95	2,34	6,44	2,27	3,86	4,58	1,33

HCC38 (USNİK ASİT - 24 SAAT)



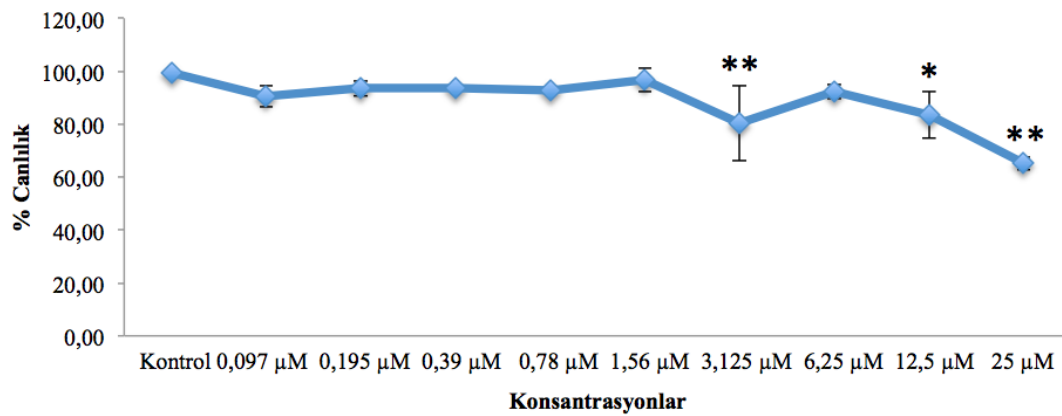
Şekil 4.7. HCC38 hücrelerine usnik asitin 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.

Usnik asitin 48 saat 3,125 µM, 12,5 µM ve 25 µM uygulamalarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel bir azalma meydana gelmiştir. Bu azalma sırasıyla %19, %16 ve %34 civarındadır (Tablo 4.6. ve Şekil 4.8.).

Tablo 4.6. HCC38 hücrelerine usnik asitin 48 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

	Kontrol	0,097 µM	0,195 µM	0,39 µM	0,78 µM	1,56 µM	3,125 µM	6,25 µM	12,5 µM	25 µM
	98,70	89,36	90,29	93,80	92,51	100,28	63,92	89,08	78,35	62,72
	99,54	87,23	94,63	94,08	92,78	98,43	87,70	94,26	78,54	67,67
	100,00	94,82	95,65	92,51	92,97	91,67	89,64	93,43	93,71	65,36
Ortalama	99,41	90,47	93,52	93,46	92,75	96,79	80,42	92,26	83,53	65,25
Standart Sapma	0,66	3,91	2,85	0,84	0,23	4,53	14,32	2,78	8,81	2,48

HCC38 (USNİK ASİT - 48 SAAT)

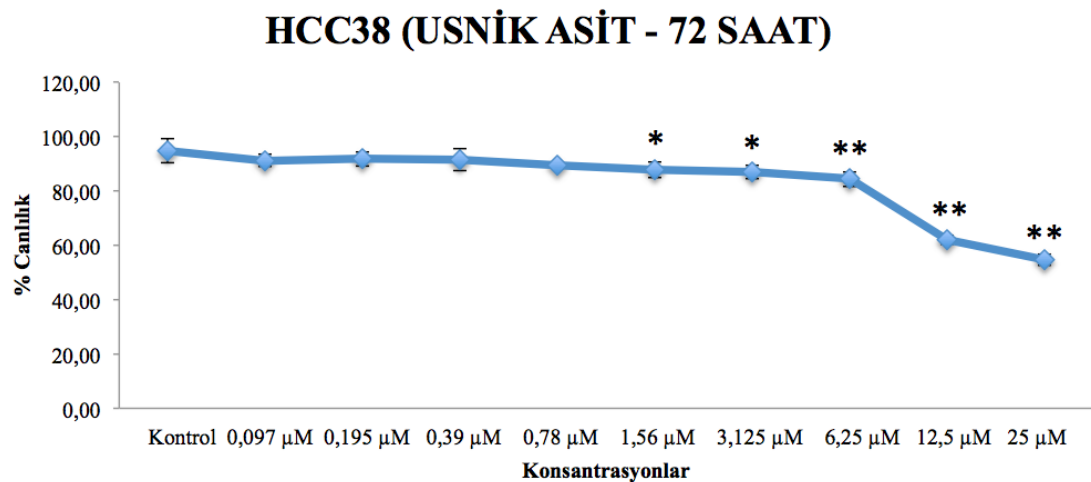


Şekil 4.8. HCC38 hücrelerine usnik asitin 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

HCC38 hücreleri üzerine 72 saat boyunca usnik asitin 1,56 μM konsantrasyonlarına kadar ki uygulamalarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmezken ($P>0,05$) daha yüksek konsantrasyonlarında ise anlamlı bir azalma meydana gelmektedir. Bu azalma 6,125 μM konsantrasyonda %10, 12,5 μM konsantrasyonda %32 iken 25 μM konsantrasyonda %50 civarında olduğu bulunmuştur (Tablo 4.7. ve Şekil 4.9.).

Tablo 4.7. HCC38 hücrelerine usnik asitin 72 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

	Kontrol	0,097 μM	0,195 μM	0,39 μM	0,78 μM	1,56 μM	3,125 μM	6,25 μM	12,5 μM	25 μM
	93,43	91,85	89,19	87,78	88,86	87,53	89,86	81,30	60,35	55,15
	91,35	93,18	91,85	91,19	89,53	85,04	84,79	85,29	62,01	52,45
	100,00	88,78	94,43	96,01	90,11	90,94	86,37	86,70	63,67	56,53
Ortalama	94,93	91,27	91,83	91,66	89,50	87,84	87,00	84,43	62,01	54,71
Standart Sapma	4,51	2,26	2,62	4,13	0,62	2,96	2,59	2,80	1,66	2,07

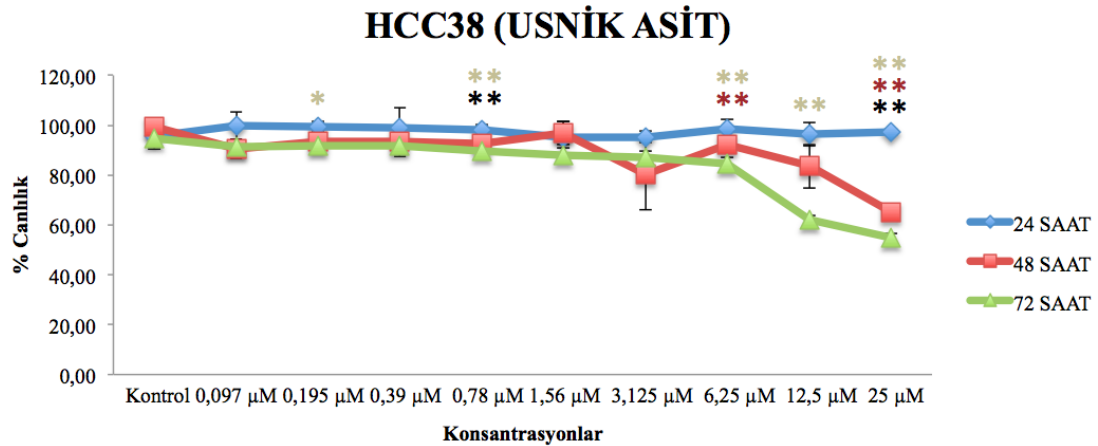


Şekil 4.9. HCC38 hücrelerine usnik asitin 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (* $P<0,05$; ** $P<0,01$).

HCC38 hücreleri üzerine usnik asitin 48 saat boyunca 3,125 μM konsantrasyonda uygulanmasından sonra ve 72 saat 1,56 μM ve sonraki konsantrasyonlarda uygulanması kontrole göre anlamlı bir azalma meydana geldiği ve bu azalmanın 12,5 μM konsantrasyonu için 48 ve 72 saatlerinde sırasıyla %16 ve %32 civarında olduğu bulunmuştur (Tablo 4.8. ve Şekil 4.10.).

Tablo 4.8. HCC38 hücrelerine usnik asitin uygulamasının zamana bağlı MTT testi sonuçları.

	Kontrol	0,097 μ M	0,195 μ M	0,39 μ M	0,78 μ M	1,56 μ M	3,125 μ M	6,25 μ M	12,5 μ M	25 μ M
24 SAAT	95,63	99,93	99,34	98,96	98,06	94,99	95,36	98,46	96,33	97,36
48 SAAT	99,41	90,47	93,52	93,46	92,75	96,79	80,42	92,26	83,53	65,25
72 SAAT	94,93	91,27	91,83	91,66	89,50	87,84	87,00	84,43	62,01	54,71



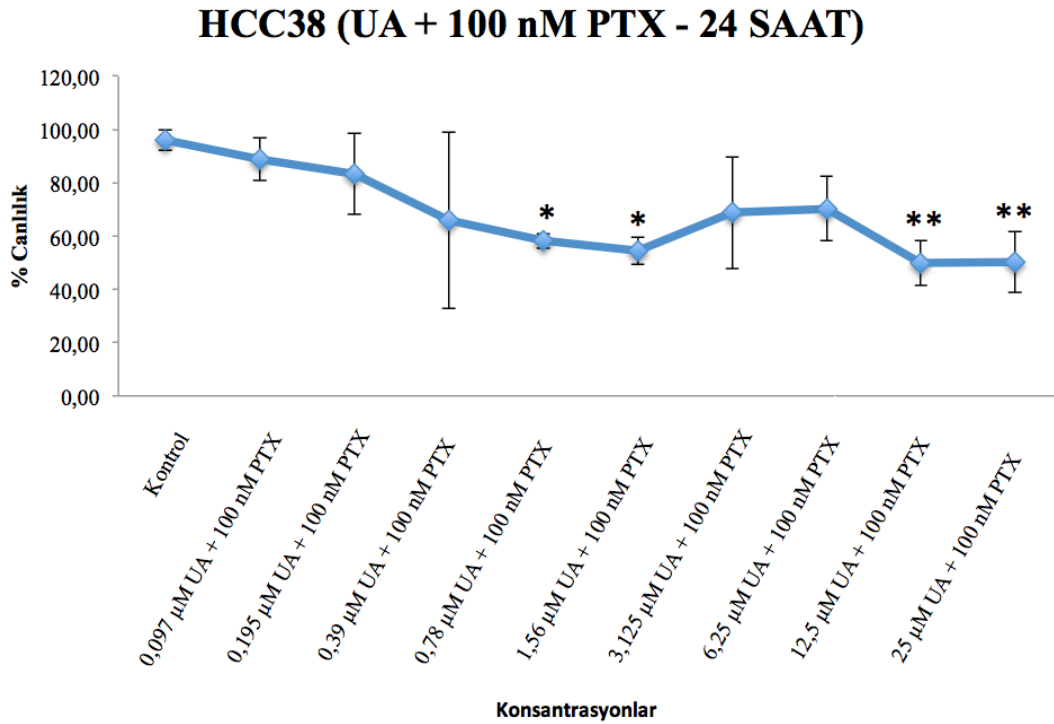
Şekil 4.10. HCC38 hücrelerine usnik asit uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi (24-48 Saat $**P < 0,01$; 24-72 Saat $**P < 0,01$; 48-72 Saat $*P < 0,05$; $**P < 0,01$).

HCC38 Hücrelerine Paklitaksel ve Usnik Asit Kombinasyon Uygulamasının MTT Analizi

100 nM paklitakselle birlikte usnik asitin artan konsantrasyonlarındaki 24 saat uygulamasında 0,78 μ M ve 1,56 μ M konsantrasyonlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulunmuştur. Ayrıca 12,5 μ M ve 25 μ M konsantrasyonlarında 100 nM paklitakselle birlikte uygulanmalarında da kontrole göre istatistiksel bir azalma vardır ve bu azalmalar iki konsantrasyonda da yaklaşık olarak %45 oranındadır (Tablo 4.9. ve Şekil 4.11.).

Tablo 4.9. HCC38 hücrelerine 24 saat 100 nM paklitaskelle birlikte farklı usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda elde edilen MTT testi sonuçları.

	Kontrol	0,097 μ M + 100 nM PTX	0,195 μ M + 100 nM PTX	0,39 μ M + 100 nM PTX	0,78 μ M + 100 nM PTX	1,56 μ M + 100 nM PTX	3,125 μ M + 100 nM PTX	6,25 μ M + 100 nM PTX	12,5 μ M + 100 nM PTX	25 μ M + 100 nM PTX
	95,17	80,68	66,19	44,89	55,26	50,71	54,12	58,10	55,11	62,78
	92,61	89,20	88,78	48,72	60,51	52,13	59,38	70,60	54,40	48,01
	100,00	96,59	94,89	103,98	58,52	60,23	92,76	82,24	40,20	40,20
Ortalama	95,93	88,83	83,29	65,86	58,10	54,36	68,75	70,31	49,91	50,33
Standart Sapma	3,75	7,96	15,11	33,06	2,65	5,13	20,95	12,08	8,41	11,47

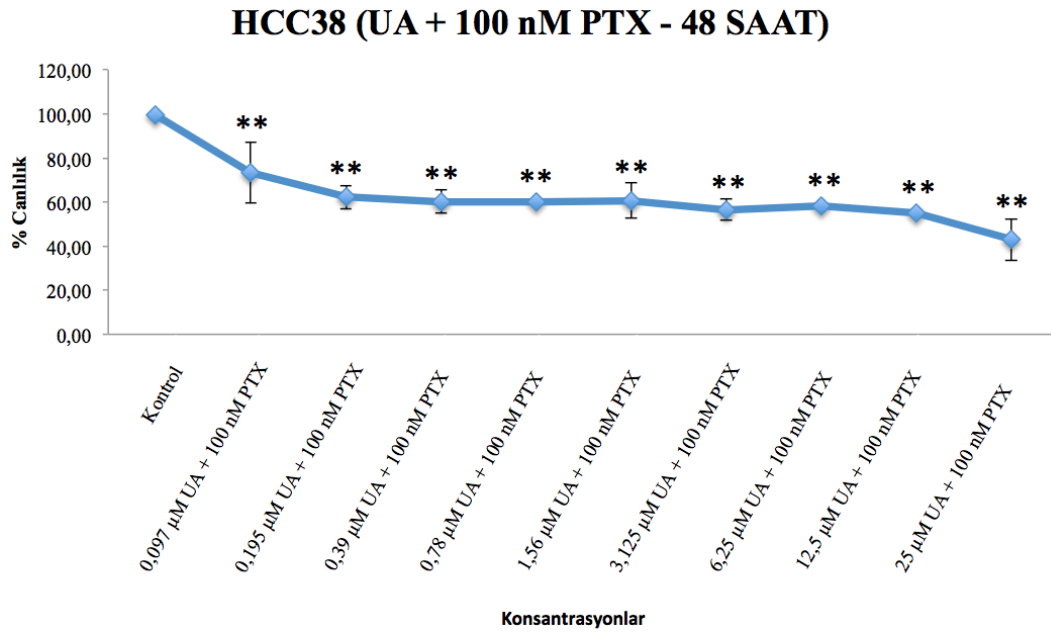


Şekil 4.11. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

HCC38 hücreleri üzerine 48 saat boyunca 100 nM paklitaksel ile birlikte uygulanan usnik asitin tüm konsantrasyonlarında kontrole kıyasla önemli oranda istatistiksel bir fark bulunmuştur. Denenen en düşük usnik asit konsantrasyonuyla birlikte 100 nM paklitaksel uygulaması hücre canlılığını %70'lere indirmiştir (Tablo 4.10. ve Şekil 4.12).

Tablo 4.10. HCC38 hücrelerine 48 saat 100 nM paklitaksel ile birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.

Kontrol	0,097 µM + 100 nM PTX	0,195 µM + 100 nM PTX	0,39 µM + 100 nM PTX	0,78 µM + 100 nM PTX	1,56 µM + 100 nM PTX	3,125 µM + 100 nM PTX	6,25 µM + 100 nM PTX	12,5 µM + 100 nM PTX	25 µM + 100 nM PTX
98,70	60,22	58,28	54,02	59,39	55,04	60,96	57,63	55,41	46,53
99,54	71,88	60,22	62,90	59,85	57,26	57,54	57,72	54,95	50,05
100,00	87,97	68,36	63,92	61,05	69,75	51,34	59,39	54,86	32,28
Ortalama	99,41	73,36	62,29	60,28	60,10	60,68	56,61	58,25	42,95
Standart Sapma	0,66	13,94	5,35	5,44	0,86	7,93	4,88	0,99	9,41

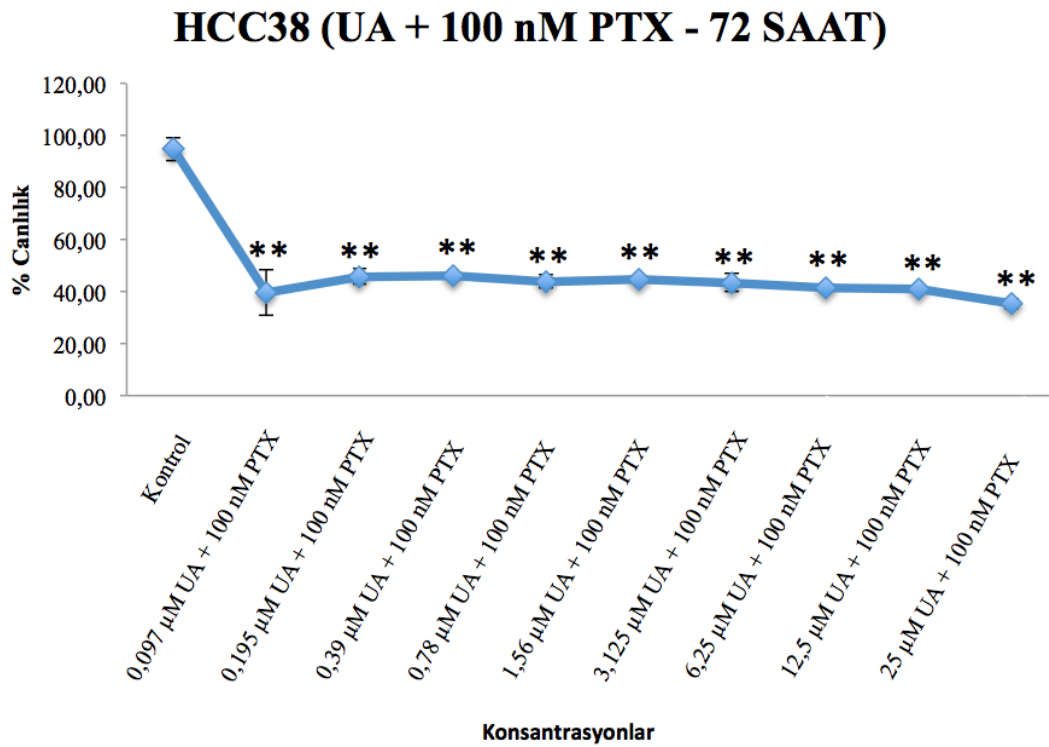


Şekil 4.12. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (** $P < 0,01$).

72 saat boyunca 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarına maruz kalan HCC38 hücrelerinin hücre canlılığı 0,097 µM usnik asitle birlikte paklitaksel uygulanması ile %54 civarında azalmıştır ve daha sonra bu azalma yaklaşık olarak benzer oranda devam etmiştir (Tablo 4.11. ve Şekil 4.13.).

Tablo 4.11. HCC38 hücrelerine 72 saat 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.

	Kontrol	0,097 µM + 100 nM PTX	0,195 µM + 100 nM PTX	0,39 µM + 100 nM PTX	0,78 µM + 100 nM PTX	1,56 µM + 100 nM PTX	3,125 µM + 100 nM PTX	6,25 µM + 100 nM PTX	12,5 µM + 100 nM PTX	25 µM + 100 nM PTX
	93,43	29,59	48,96	46,63	45,14	43,97	43,81	41,31	41,06	36,41
	91,35	44,14	43,06	46,05	45,55	44,14	46,80	39,98	41,06	36,33
	100,00	45,55	45,64	45,89	40,98	45,39	39,98	42,48	40,98	33,08
Ortalama	94,93	39,76	45,89	46,19	43,89	44,50	43,53	41,26	41,04	35,27
Standart Sapma	4,51	8,83	2,96	0,39	2,53	0,77	3,42	1,25	0,05	1,90

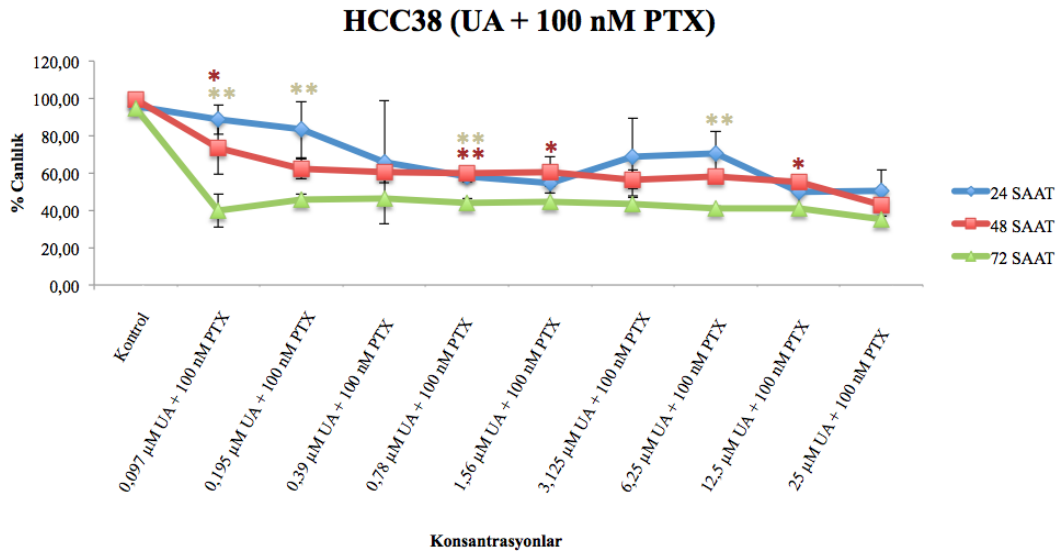


Şekil 4.13. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (** $P < 0,01$).

HCC38 hücreleri üzerine 100 nM paklitakselle birlikte düşük konsantrasyonlarda usnik asit uygulamasının hücre canlılığını düşürdüğü ve daha sonra bu düşüşün usnik asit konsantrasyonu artsa bile her üç zamanda da sabit kaldığı görülmektedir. Hücre canlılığındaki en yüksek azalma 72 saat uygulamasında meydana gelmiştir (Tablo 4.12. ve Şekil 4. 14.).

Tablo 4.12. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonucunda zamana ve konsantrasyonlara bağlı hücre canlılığının değişimi.

	Kontrol	0,097 µM + 100 nM PTX	0,195 µM + 100 nM PTX	0,39 µM + 100 nM PTX	0,78 µM + 100 nM PTX	1,56 µM + 100 nM PTX	3,125 µM + 100 nM PTX	6,25 µM + 100 nM PTX	12,5 µM + 100 nM PTX	25 µM + 100 nM PTX
24 SAAT	95,93	88,83	83,29	65,86	58,10	54,36	68,75	70,31	49,91	50,33
48 SAAT	99,41	73,36	62,29	60,28	60,10	60,68	56,61	58,25	55,07	42,95
72 SAAT	94,93	39,76	45,89	46,19	43,89	44,50	43,53	41,26	41,04	35,27



Şekil 4.14. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi (24-72 Saat * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; 48-72 Saat ** $P < 0,01$).

4.1.2. 4T1 Hücrelerinin MTT Analizi

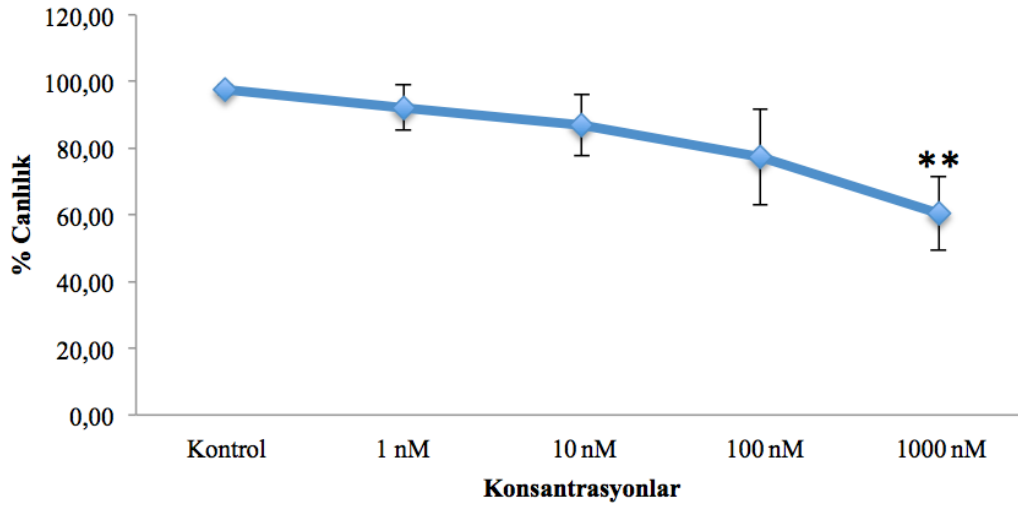
4T1 Hücrelerine Paklitaksel Uygulamasının MTT Analizi

4T1 hücrelerine paklitaksel uygulamasından 24 saat sonra paklitakselin konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığında azalma görülmüştür. Bu azalma 100 nM paklitaksel uygulamasında yaklaşık olarak %20'lerdedir. Kontrol grubuna göre 1000 nM paklitaksel uygulamasında ise yaklaşık olarak %37 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Tablo 4.13 ve Şekil 4.15.)

Tablo 4.13. 4T1 hücrelerine paklitakselin 24 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
	97,58	100,06	96,57	79,58	72,56
	99,12	87,83	78,58	61,93	57,14
	96,20	88,61	85,44	90,36	51,28
Ortalama	97,64	92,17	86,86	77,29	60,33
Standart Sapma	1,46	6,85	9,08	14,35	10,99

4T1 (PAKLİTAKSEL - 24 SAAT)



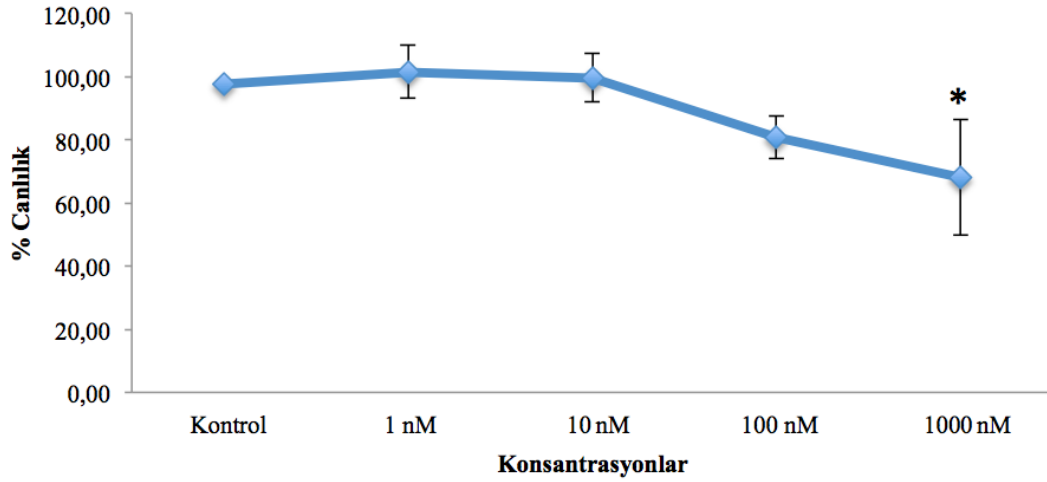
Şekil 4.15. 4T1 hücrelerine paklitakselin 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (** $P < 0,01$).

4T1 hücrelerine 1000 nM paklitaksel uygulamasından sonraki 48. saatte kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmüştür ve hücre canlılığı yaklaşık olarak %28 oranında azalmıştır (Tablo 4.14. ve Şekil 4.16.)

Tablo 4.14. 4T1 hücrelerine paklitakselin 48 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
	96,79	109,76	105,89	73,83	74,79
	98,35	101,88	102,02	87,26	81,92
	97,40	93,08	90,97	80,98	47,42
Ortalama	97,52	101,57	99,63	80,69	68,04
Standart Sapma	0,79	8,35	7,74	6,72	18,21

4T1 (PAKLİTAKSEL - 48 SAAT)



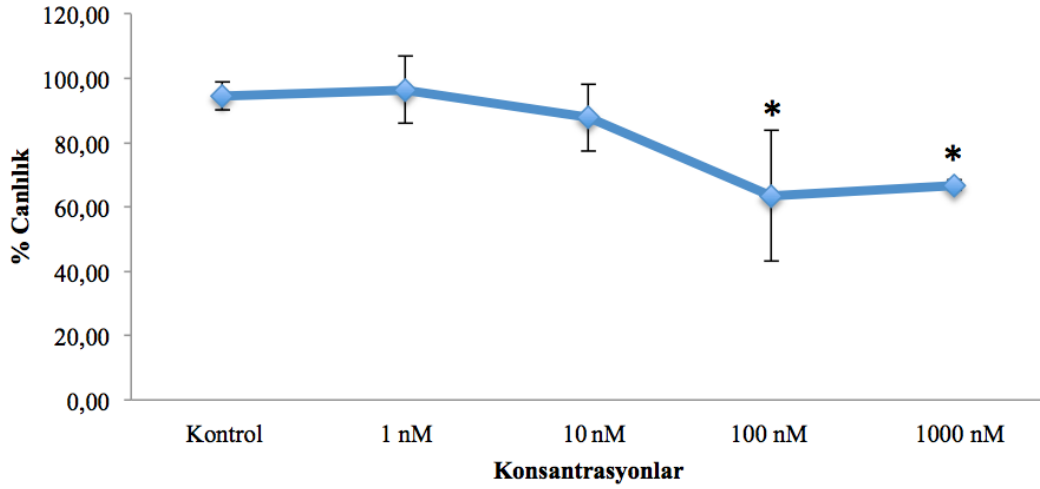
Şekil 4.16. 4T1 hücrelerine paklitakselin 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (* $P < 0,05$).

Paklitakselin 72 saatlik 100 nM uygulamasında ise 4T1 hücrelerindeki azalma kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır ve %36 civarındadır (Tablo 4.15. ve Şekil 4.17.)

Tablo 4.15. 4T1 hücrelerine paklitakselin 72 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
	98,83	108,44	99,58	59,89	65,50
	90,24	89,70	81,00	45,05	66,28
	94,36	90,96	82,52	85,38	68,64
Ortalama	94,48	96,37	87,70	63,44	66,81
Standart Sapma	4,30	10,48	10,32	20,40	1,64

4T1 (PAKLİTAKSEL - 72 SAAT)

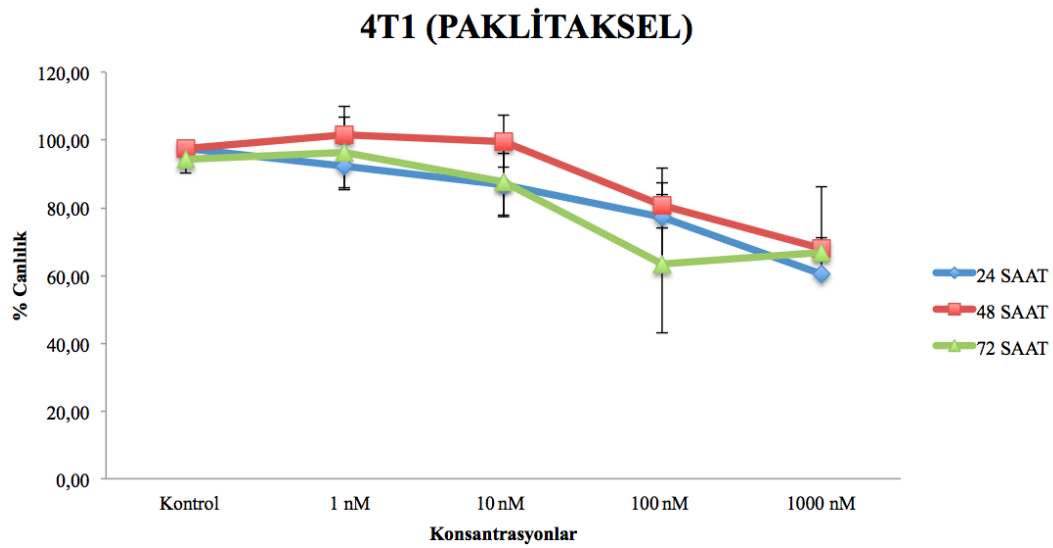


Şekil 4.17. 4T1 hücrelerine paklitakselin 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (* $P < 0,05$).

Paklitakselin 4T1 hücre hattı üzerindeki etkisinin zamana bağlı olarak bakıldığında her üç zaman dilimi içerisinde de 10 nM konsantrasyona kadar hücre canlılığı üzerinde net bir etkisi görülmezken, 100 nM ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur. Bu azalma her üç zaman dilimi içerisinde de benzer miktarlardadır (Tablo 4.16. ve Şekil 4.18.).

Tablo 4.16. 4T1 hücrelerine paklitakselin uygulamasının zamana bağlı MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
24 SAAT	97,64	92,17	86,86	77,29	60,33
48 SAAT	97,52	101,57	99,63	80,69	68,04
72 SAAT	94,48	96,37	87,70	63,44	66,81



Şekil 4.18. 4T1 hücrelerine paklitakselin uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi.

4T1 hücreleri üzerine paklitakselin tek başına uygulanması ile kontrol grubuna göre 100 ve 1000 nM konsantrasyonlarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Her üç saatte de hücre canlılığı %65 seviyelerine inmektedir. Konsantrasyona bağlı olarak paklitakselin artan konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görülürken zamana bağlı olarak paklitakselin farklı konsantrasyonları arasında bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

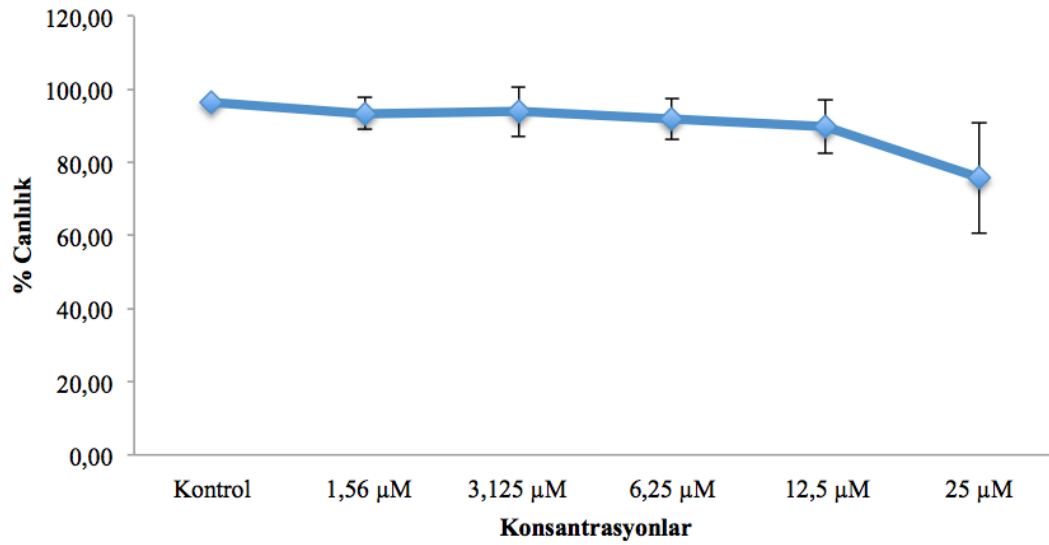
4T1 Hücrelerine Usnik Asit Uygulamasının MTT Analizi

4T1 hücrelerine usnik asitin artan konsantrasyonlarda uygulamasında hücre canlılığı %75'lere kadar azalsa da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ($P>0,05$) (Tablo 4.17 ve Şekil 4.19.).

Tablo 4.17. 4T1 hücrelerine usnik asitin 24 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1,56 μ M	3,125 μ M	6,25 μ M	12,5 μ M	25 μ M
	96,99	98,38	101,62	98,45	98,30	93,26
	96,48	90,71	89,24	88,38	85,05	67,96
	96,20	91,08	90,72	88,77	86,19	66,17
Ortalama	96,56	93,39	93,86	91,87	89,85	75,80
Standart Sapma	0,40	4,33	6,76	5,70	7,34	15,15

4T1 (USNİK ASİT - 24 SAAT)



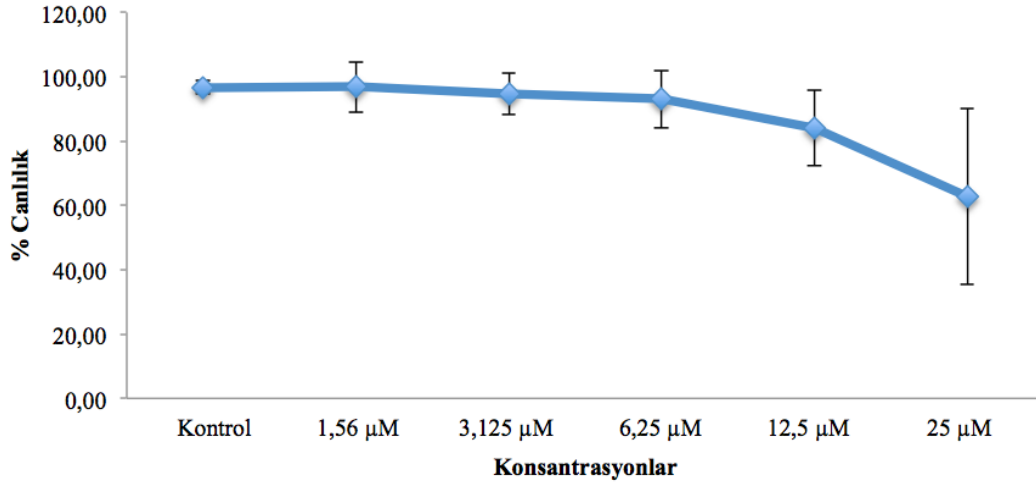
Şekil 4.19. 4T1 hücrelerine usnik asitin 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.

Usnik asitin 48 saat 25 µM uygulamasında hücre canlılığı yaklaşık olarak %37 azalsa da kontrole göre istatistiksel bir fark görülmemiştir ($P>0,05$) (Tablo 4.18. ve Şekil.4.20.)

Tablo 4.18. 4T1 hücrelerine usnik asitin 48 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1,56 µM	3,125 µM	6,25 µM	12,5 µM	25 µM
	94,50	100,20	98,16	97,62	95,17	93,52
	98,35	102,34	98,93	98,61	85,18	53,47
	97,40	87,82	87,29	82,76	71,86	41,32
Ortalama	96,75	96,79	94,79	93,00	84,07	62,77
Standart Sapma	2,01	7,84	6,51	8,88	11,69	27,31

4T1 (USNİK ASİT - 48 SAAT)



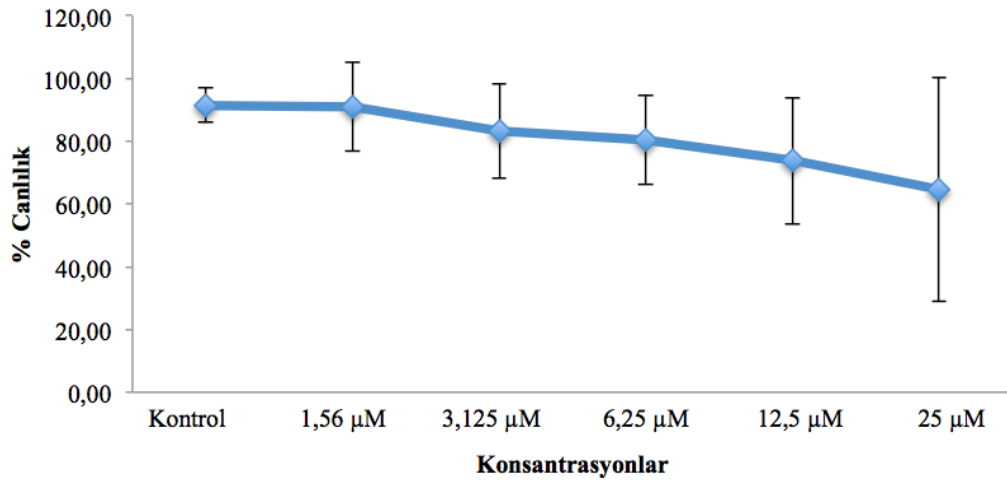
Şekil 4.20. 4T1 hücrelerine usnik asitin 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.

4T1 hücreleri üzerine usnik asitin 72 saatlik uygulamasında artan konsantrasyona bağlı olarak bir azalma görülse de bu azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P>0,05$) (Tablo 4.19. ve Şekil 4.21.).

Tablo 4.19. 4T1 hücrelerine usnik asitin 72 saat uygulamasının MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1,56 µM	3,125 µM	6,25 µM	12,5 µM	25 µM
	95,01	102,09	98,68	96,51	96,89	89,86
	85,23	95,90	82,28	75,35	59,56	
	94,36	75,06	68,67	69,50	64,64	39,43
Ortalama	91,53	91,02	83,21	80,45	73,69	64,64
Standart Sapma	5,47	14,16	15,03	14,21	20,25	35,66

4T1 (USNİK ASİT - 72 SAAT)



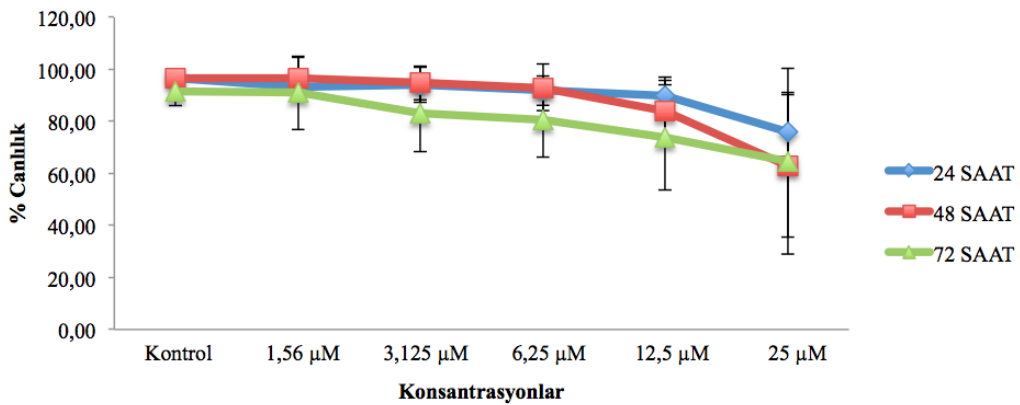
Şekil 4.21. 4T1 hücrelerine usnik asitin 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi.

Usnik asitin 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarında konsantrasyona bağlı olarak bir azalma görülmüştür fakat bu azalma kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan farklı değildir ($P>0,05$) (Tablo 4.20. ve Şekil 4.22.).

Tablo 4.20. 4T1 hücrelerine usnik asitin uygulamasının zamana bağlı MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1,56 µM	3,125 µM	6,25 µM	12,5 µM	25 µM
24 SAAT	96,56	93,39	93,86	91,87	89,85	75,80
48 SAAT	96,75	96,79	94,79	93,00	84,07	62,77
72 SAAT	91,53	91,02	83,21	80,45	73,69	64,64

4T1 (USNİK ASİT)



Şekil 4.22. 4T1 hücrelerine usnik asit uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi.

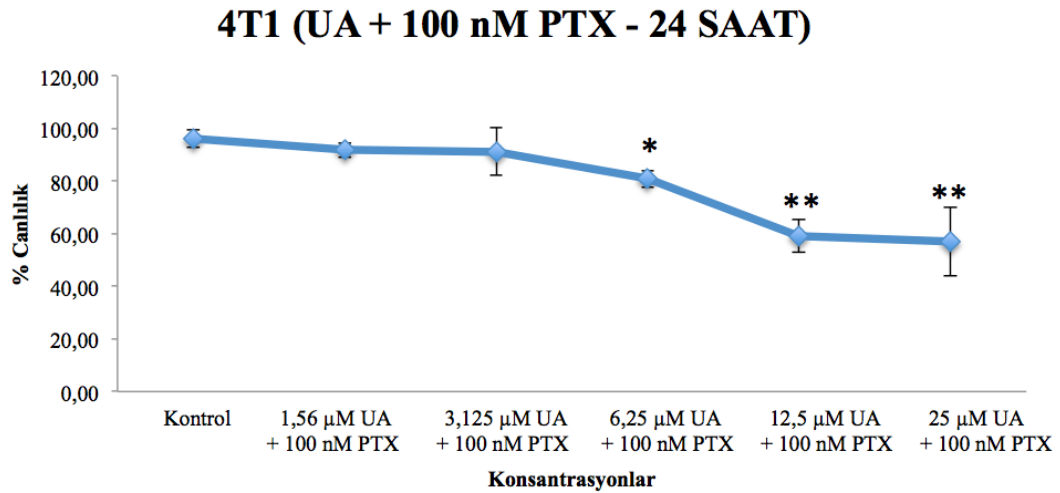
Usnik asitin 4T1 hücreleri üzerine uygulanması farklı konsantrasyonlarda ve farklı zaman dilimleriyle uygulanması sonucunda hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir. Bu azalmalar 24, 48 ve 72 saat uygulamalarında 25 μM için sırasıyla %21, %34 ve %27 seviyelerindeyken istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P>0,05$).

4T1 Hücrelerine Paklitaksel ve Usnik Asit Kombinasyon Uygulamasının MTT Analizi

Paklitakselin 100 nM konsantrasyonu ile usnik asitin farklı konsantrasyonları 24 saat boyunca 4T1 hücrelerine birlikte uygulandığı zaman usnik asitin artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığında önemli bir azalma meydana gelmiştir. 100 nM paklitakselle birlikte usnik asitin 6,25 μM konsantrasyonu ve üzerindeki uygulamaları istatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlıdır. 12,5 μM usnik asit ve 100 nM paklitaksel birlikte uygulandığında hücre canlılığı %36 civarında azalmıştır (Tablo 4.21. ve Şekil.4.23.).

Tablo 4.21. 4T1 hücrelerine 24 saat 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1,56 μM UA + 100 nM PTX	3,125 μM UA + 100 nM PTX	6,25 μM UA + 100 nM PTX	12,5 μM UA + 100 nM PTX	25 μM UA + 100 nM PTX
	100,00	93,67	95,89	84,50	62,60	50,54
	94,68	94,81	82,48	78,37	62,94	47,04
	93,94	91,04	81,00	77,63	65,03	46,77
		87,80	101,95	79,99	51,28	64,56
		91,78	94,54	84,03	53,84	76,42
Ortalama	96,20	91,82	91,17	80,90	59,14	57,06
Standart Sapma	3,31	2,70	9,07	3,19	6,14	13,04



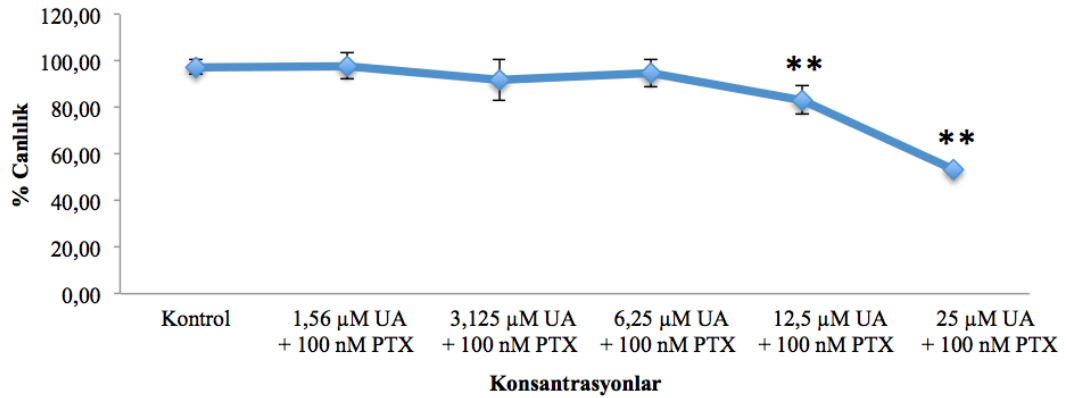
Şekil 4.23. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 24 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

100 nM paklitaksel ile usnik asitin 12,5 µM ve üzeri konsantrasyonları 48 saat boyunca uygulandığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. 25 µM usnik asit ve 100 nM paklitaksel uygulamasında 4T1 hücrelerinin hücre canlılığı %53'lere kadar azalmıştır (Tablo 4.22. ve Şekil.4.24.).

Tablo 4.22. 4T1 hücrelerine 48 saat 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.

	Kontrol	1,56 µM UA + 100 nM PTX	3,125 µM UA + 100 nM PTX	6,25 µM UA + 100 nM PTX	12,5 µM UA + 100 nM PTX	25 µM UA + 100 nM PTX
	100,00	91,79	83,94	86,47	91,24	53,14
	98,13	105,98	101,45	91,00	85,45	53,62
	94,08	101,15	100,85	95,77	85,75	53,68
		95,23	88,10	99,70	77,60	53,74
		95,05	84,42	100,36	76,63	52,78
Ortalama	97,40	97,84	91,75	94,66	83,33	53,39
Standart Sapma	3,02	5,67	8,73	5,91	6,14	0,42

4T1 (UA + 100 nM PTX - 48 SAAT)



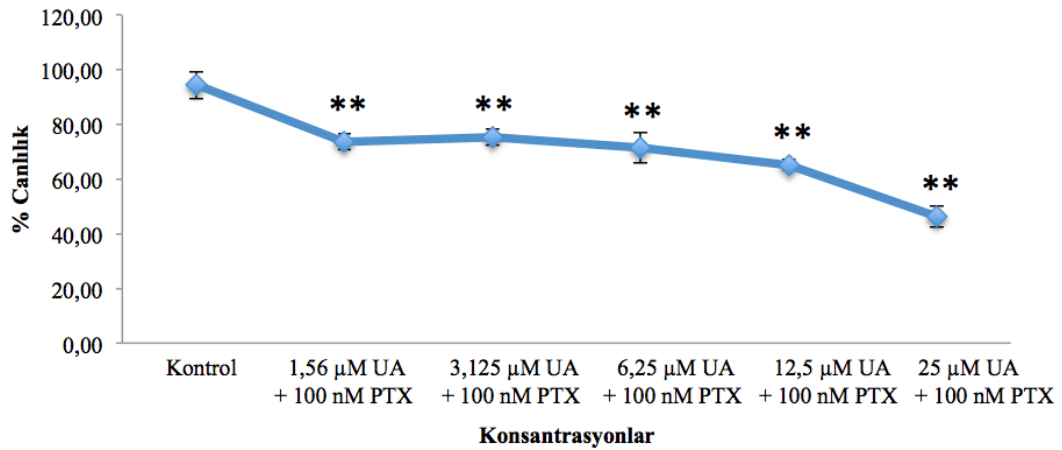
Şekil 4.24. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 48 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (** $P < 0,01$).

4T1 hücrelerine 72 saat boyunca 100 nM paklitaksel ve usnik asitin denenen tüm konsantrasyonları uygulandığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. 25 µM usnik asit ve 100 nM paklitaksel uygulamasında hücre canlılığı %50'nin altındadır (Tablo 4.23. ve Şekil 4.25.).

Tablo 4.23. 4T1 hücrelerine 72 saat 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonunda MTT testi sonuçları.

Kontrol	1,56 µM UA + 100 nM PTX	3,125 µM UA + 100 nM PTX	6,25 µM UA + 100 nM PTX	12,5 µM UA + 100 nM PTX	25 µM UA + 100 nM PTX
91,10	76,02	74,98	64,07	62,95	51,00
91,98	75,94	72,89	68,40	63,99	41,62
100,00	75,94	72,25	76,02	66,96	43,14
	71,13	78,35	78,03	65,44	46,91
	70,01	78,43	70,89	67,04	48,28
Ortalama	94,36	73,81	75,38	71,48	46,19
Standart Sapma	4,90	2,98	2,92	5,66	1,80
					3,81

4T1 (UA + 100 nM PTX - 72 SAAT)

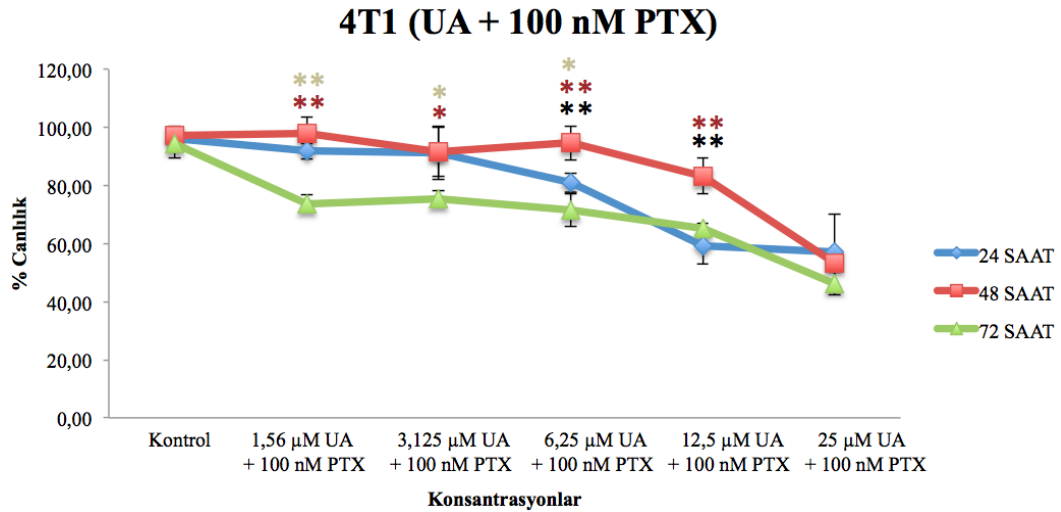


Şekil 4.25. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının 72 saat uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı değişimi (** $P < 0,01$).

100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisine baktığımızda usnik asit konsantrasyonuna bağlı olarak canlılığın azaldığı görülmektedir. 72 saatte 100 nM paklitakselle birlikte usnik asitin düşük konsantrasyonlarının uygulanmasıyla canlılığın diğer saatlere oranla daha çok azaldığı ve konsantrasyon arttıkça bu azalmanın diğer saatlerle benzer oranda ilerlediği görülmektedir (Tablo.4.24. ve Şekil.4.26.).

Tablo 4.24. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asit konsantrasyonları uygulaması sonucunda zamana ve konsantrasyonlara bağlı hücre canlılığının değişimi.

	Kontrol	1,56 µM UA + 100 nM PTX	3,125 µM UA + 100 nM PTX	6,25 µM UA + 100 nM PTX	12,5 µM UA + 100 nM PTX	25 µM UA + 100 nM PTX
24 SAAT	96,20	91,82	91,17	80,90	59,14	57,06
48 SAAT	97,40	97,84	91,75	94,66	83,33	53,39
72 SAAT	94,36	73,81	75,38	71,48	65,28	46,19

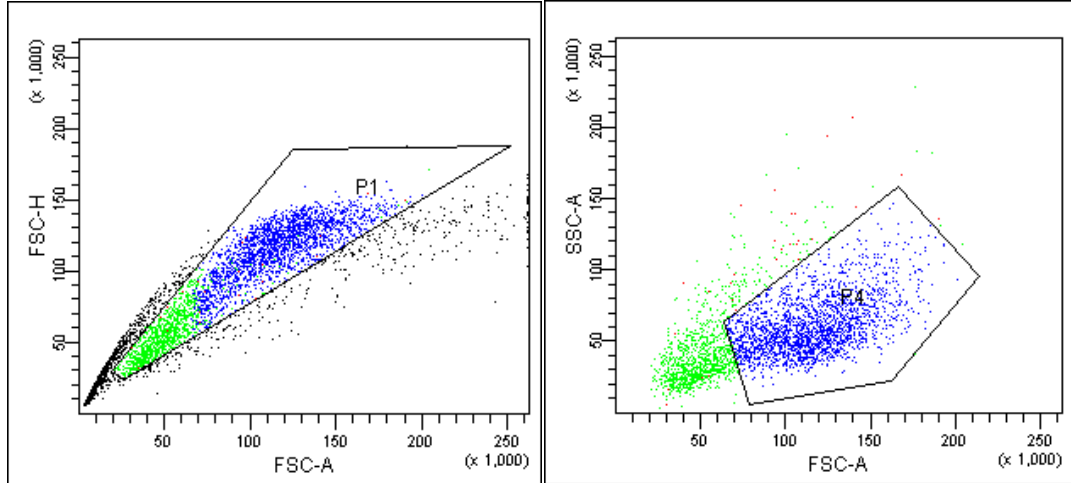


Şekil 4.26. 4T1 hücrelerine 100 nM paklitaksel ve usnik asitin çeşitli konsantrasyonlarının uygulaması sonucunda hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı değişimi (24-48 Saat $**P<0,01$; 24-72 Saat $*P<0,05$; $**P<0,01$; 48-72 Saat $*P<0,05$; $**P<0,01$).

Paklitakselin 100 nM konsantrasyonu ile birlikte usnik asitin artan konsantrasyonlarının uygulamasıyla zamana ve usnik asit konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. 100 nM paklitaskelle birlikte usnik asitin 25 µM konsantrasyonunun birlikte uygulanması kontrol grubuna göre 24, 48 ve 72 saatlerde sırasıyla %39, %44 ve %48 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Yalnız bu azalma zaman grupları arasında anlamlı değildir ($P>0,05$).

4.2. Akım Sitometri Analizi

Akım sitometri sonuçları değerlendirilirken P1 alanına düşen hücreler değerlendirildi. P4 alanı seçilerek değerlendirme yapılması tercih edilmedi. Bunun nedeni apoptotik ve nekrotik hücrelerin boyutlarında ve membranlarında meydana gelen farklılıklardan dolayı düzgün değerlendirilme yapılamayabilirdi (Şekil 4.27.).



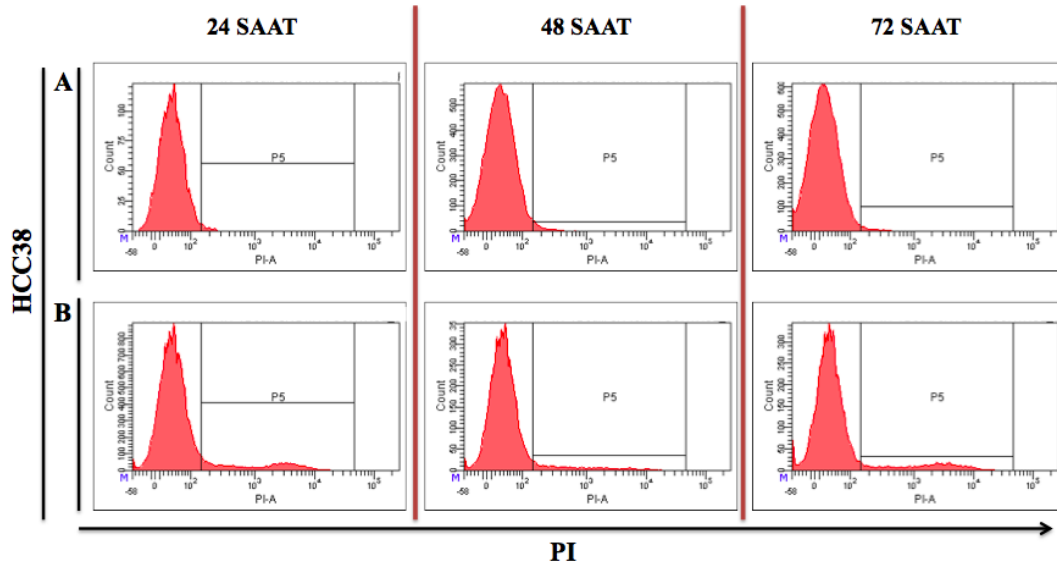
Şekil 4.27. Hücreleri ayırmada kullanılan temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.

4.2.1. HCC38 Hücreleri Akım Sitometri Analizi

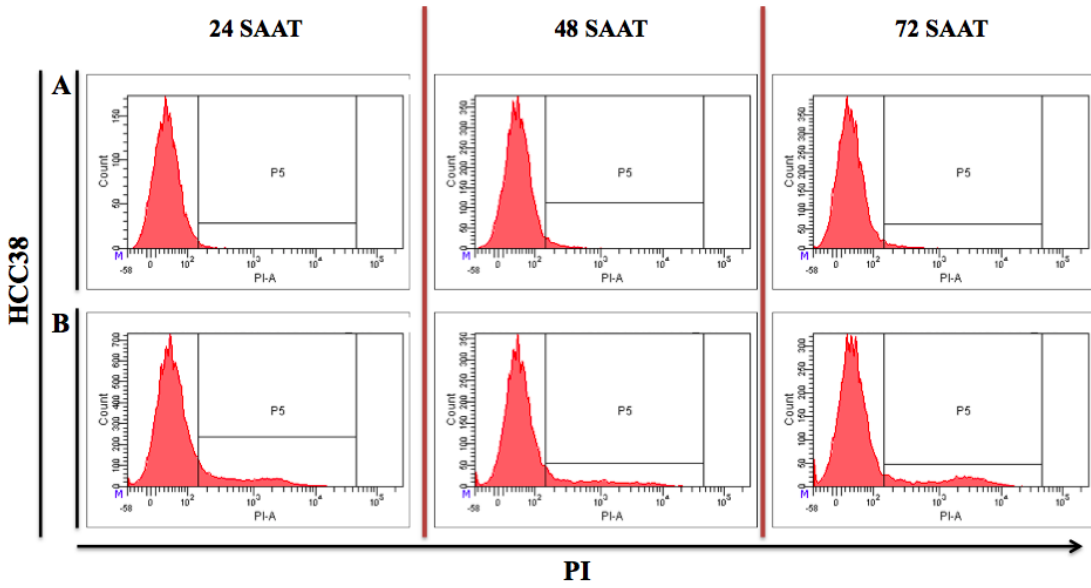
PI boyaması sonucunda elde edilen verilere göre HCC38 hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik paklitaksel ve usnik asitin birlikte uygulanması kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azaltmıştır. Usnik asitin tek başına 24 ve 48 saatlik uygulamaları kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azaltırken paklitakselin tek başına uygulanması sonucunda hücre canlılığındaki azalma 48 ve 72 saatlerde anlamlıdır (Tablo.4.25.). PI boyaması sonucunda HCC38 hücrelerinin temsili akım sitometri sonuçları Şekil 4.28. ile Şekil 4.31. arasında gösterilmiştir, P5 alanı % ölü hücreyi göstermektedir.

Tablo 4.25. HCC38 hücrelerine formülasyon uygulaması sonrasında zamana bağlı hücrelerin % ölüm oranları.

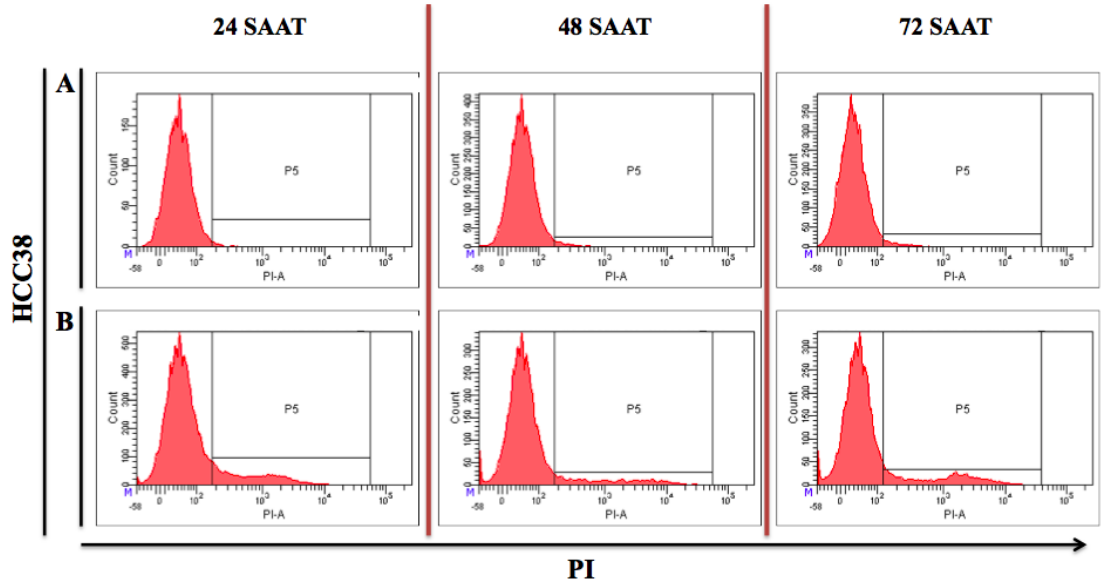
% ÖLÜM ORANI	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
Kontrol	12,55	7,85	12,5
UA	20,6	14,1	15,7
PTX	18,2	11,7	17,25
UA + PTX	22,6	12,8	17,05



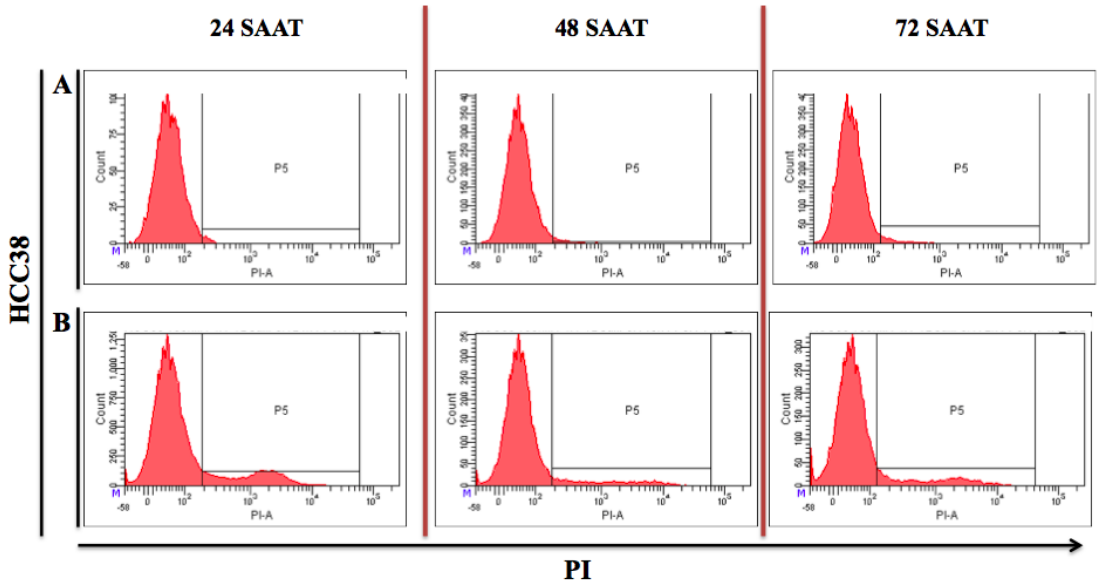
Şekil 4.28. HCC38 hücreleri PI boyama sonucu kontrol grubu A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.



Şekil 4.29. HCC38 hücreleri PI boyama sonucu usnik asit A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları



Şekil 4.30. HCC38 hücreleri PI boyama sonucu paklitaksel grubu A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.



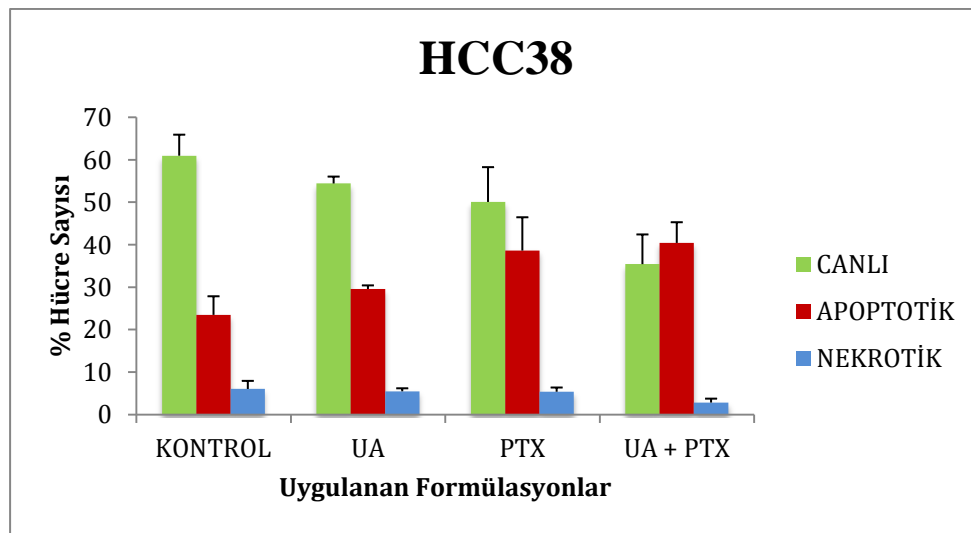
Şekil 4.31. HCC38 hücreleri PI boyama sonucu 12,5 µM usnik asit ve 100 nM paklitaksel birlikte uygulama grubu A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.

YO-PRO-1 kiti ile yapılan akım sitometri analizler sonucunda formülasyonların herbirinin uygulanması hücre canlılığını azaltmıştır. Usnik asitin ve paklitakselin 24 saat boyunca ayrı ayrı uygulamasıyla hücre canlılığı %61'den sırasıyla %54,45 ve %50,1'e inmiştir. Usnik asit ve paklitaksel kombinasyonunun uygulanması sonucunda ise kontrol grubuna göre canlı hücre oranı neredeyse yarı seviyelerine

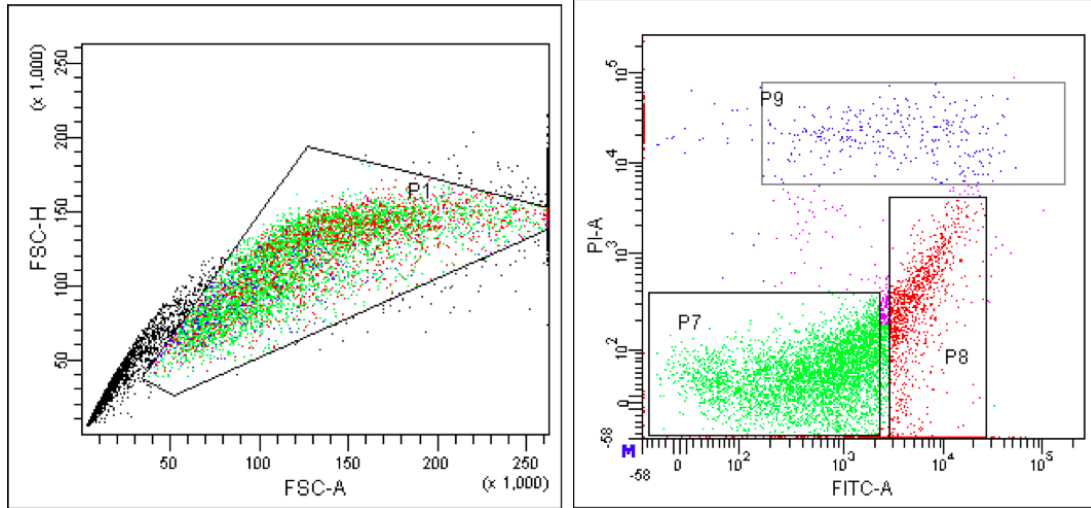
inmiştir. Usnik asit ve paklitakselin ayrı ayrı ve birlikte uygulanması nekrotik hücre oranında çok az bir azalma meydana getirirken apoptotik hücre oranında artış meydana gelmiştir (Tablo 4.26., Şekil 4.32.- Şekil 4.36.).

Tablo 4.26. HCC38 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu hücre oranları.

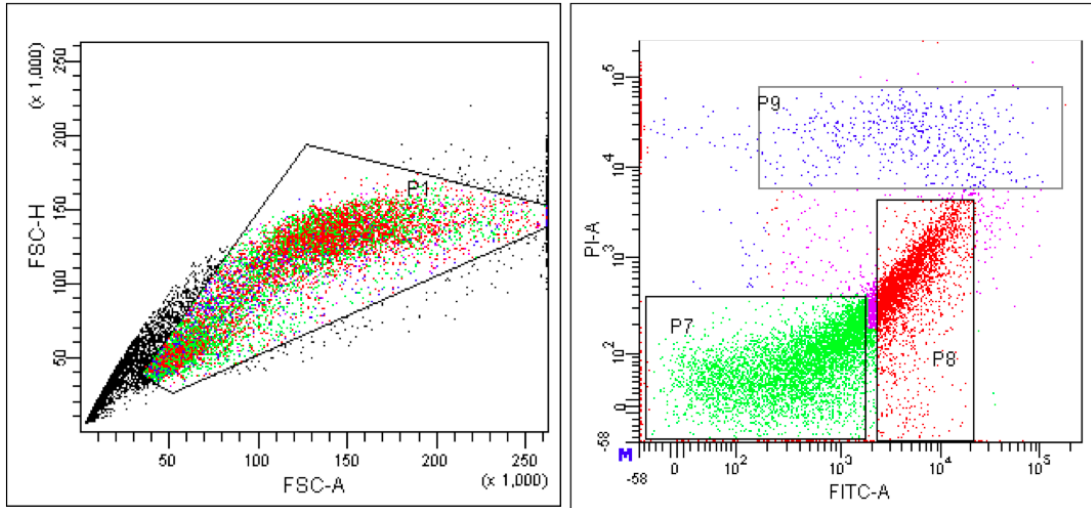
	CANLI	APOPTOTİK	NEKROTİK
Kontrol	61	23,5	6,05
UA	54,45	29,6	5,5
PTX	50,1	38,65	5,4
UA + PTX	35,45	40,45	2,85



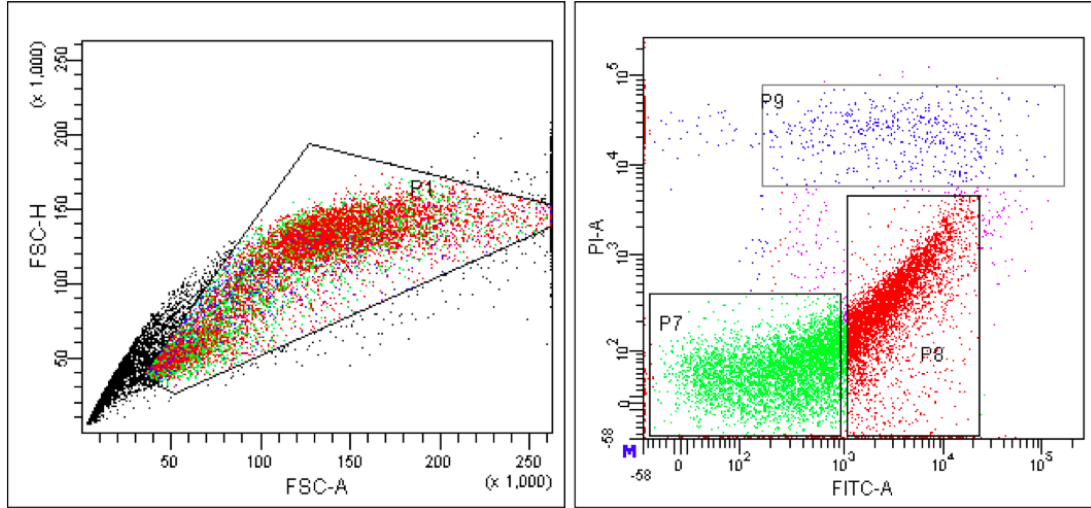
Şekil 4.32. HCC38 hücreleri 24 saat formülasyon uygulaması sonrasında hücre canlılığındaki değişimler.



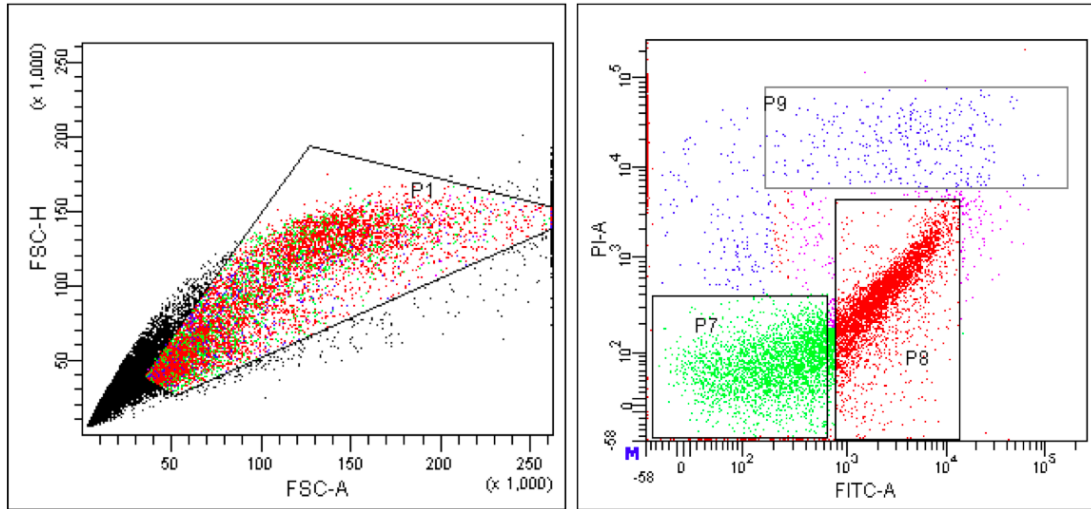
Şekil 4.33. HCC38 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu kontrol grubu temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri (P1 alanı çalışılan hücrelerin seçimini, P7 alanı canlı hücreleri, P8 alanı apoptotik hücreleri ve P9 alanı nekrotik hücreleri göstermektedir.).



Şekil 4.34. HCC38 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 12,5 µM usnik asit uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri (P1 alanı çalışılan hücrelerin seçimini, P7 alanı canlı hücreleri, P8 alanı apoptotik hücreleri ve P9 alanı nekrotik hücreleri göstermektedir.).



Şekil 4.35. HCC38 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 100 nM paklitaksel uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri (P1 alanı çalışılan hücrelerin seçimini, P7 alanı canlı hücreleri, P8 alanı apoptotik hücreleri ve P9 alanı nekrotik hücreleri göstermektedir.).



Şekil 4.36. HCC38 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 12,5 µM usnik asit ve 100 nM paklitaksel birlikte uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri (P1 alanı çalışılan hücrelerin seçimini, P7 alanı canlı hücreleri, P8 alanı apoptotik hücreleri ve P9 alanı nekrotik hücreleri göstermektedir.).

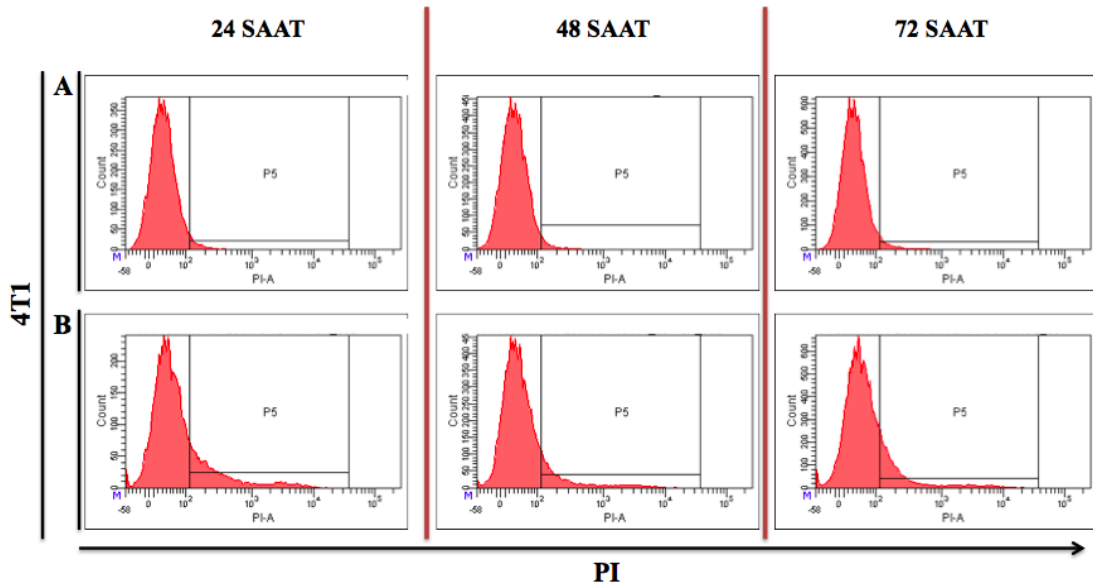
4.2.2. 4T1 Hücreleri Akım Sitometri Analizi

4T1 hücrelerinin PI boyaması sonucunda akım sitometri analizi sonuçlarına baktığımızda 24, 48 ve 72 saatlerinde paklitakselin tek başına ve usnik asitle birlikte uygulanması hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür. Zamana bağlı olarak gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık

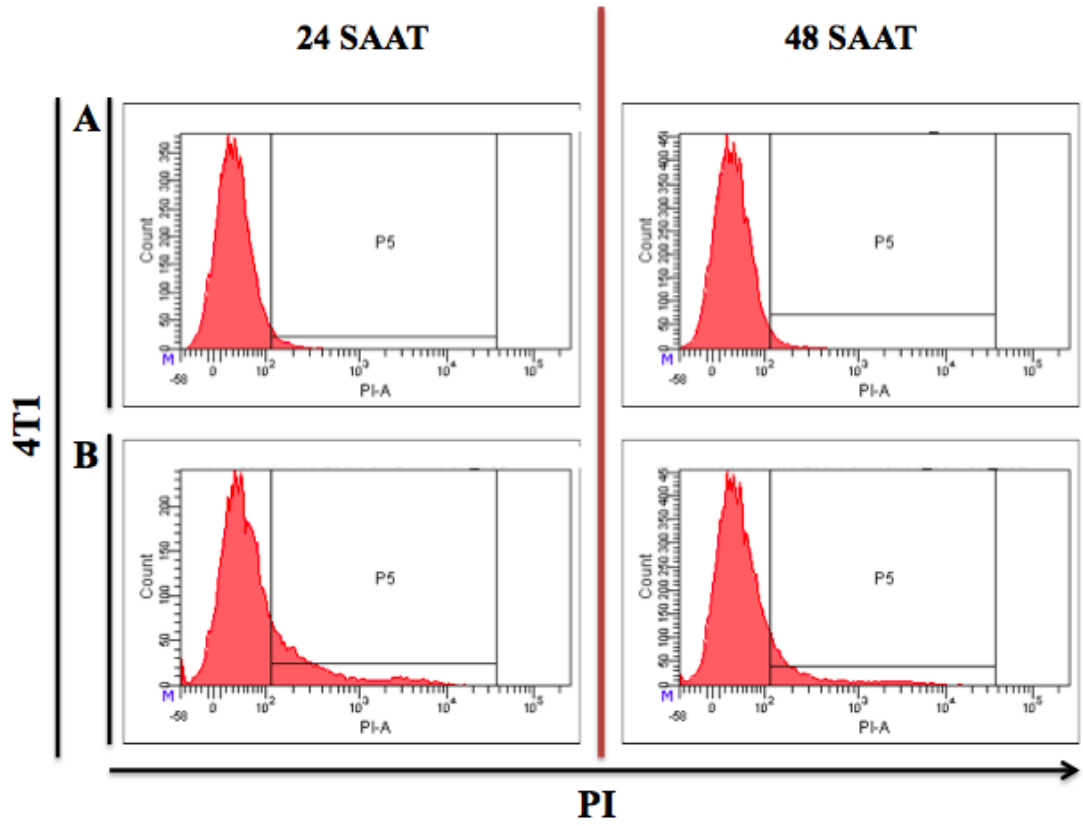
bulunamamıştır ($P>0,05$) (Tablo 4.27.). Usnik asitin 72 saat tek başına uygulanmasının verileri laboratuvarında yaşanan bir aksaklık nedeniyle değerlendirilememiştir. Hücreler üzerine uygulanan formülasyonların akım sitometri temsili görüntüleri Şekil 4.37.- Şekil 4.40.' te verilmiştir ve P5 alanı % ölü hücreyi göstermektedir.

Tablo 4.27. 4T1 hücrelerine formülasyon uygulaması sonrasında zamana bağlı hücrelerin % ölüm oranları.

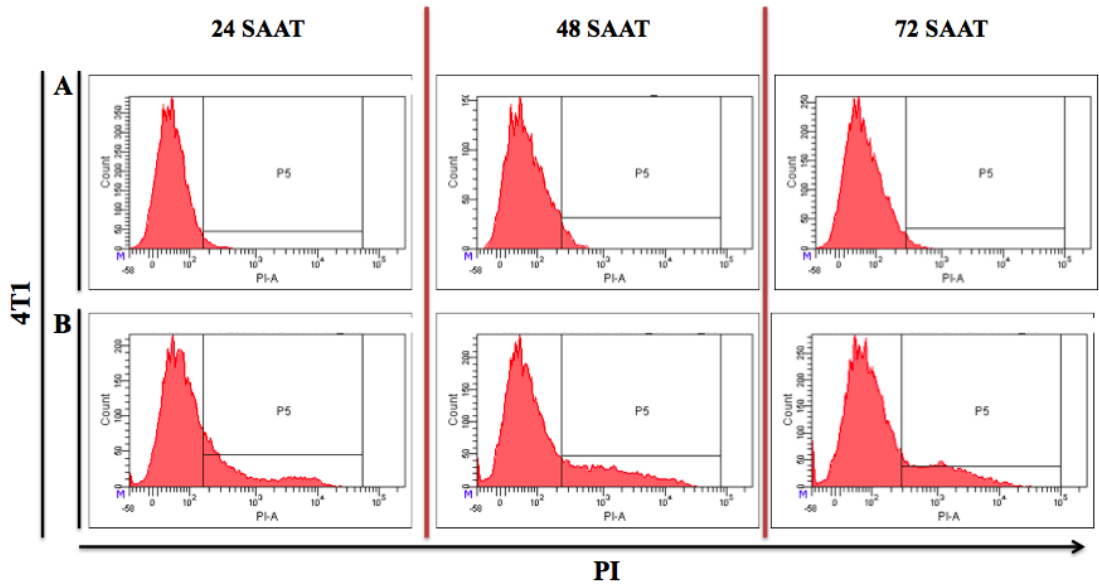
% ÖLÜM ORANI	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
Kontrol	11	10,15	12,95
UA	13,25	10,85	
PTX	34,1	34,3	37,5
UA + PTX	39,4	35,95	37,6



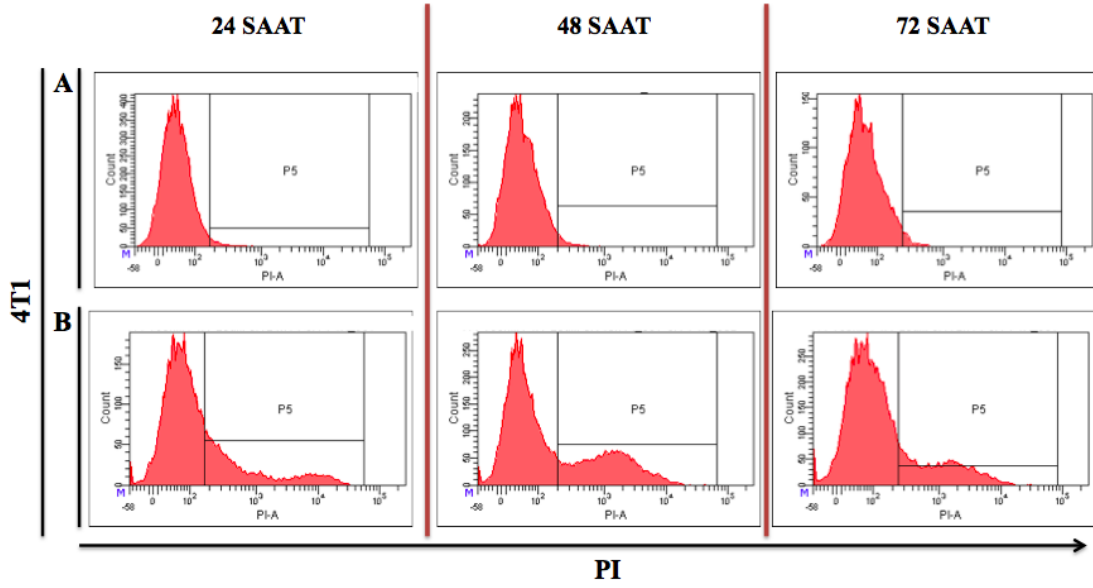
Şekil 4.37. 4T1 hücreleri PI boyama sonucu kontrol grubu A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.



Şekil 4.38. 4T1 hücreleri PI boyama sonucu usnik asit A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.



Şekil 4.39. 4T1 hücreleri PI boyama sonucu paklitaksel A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.

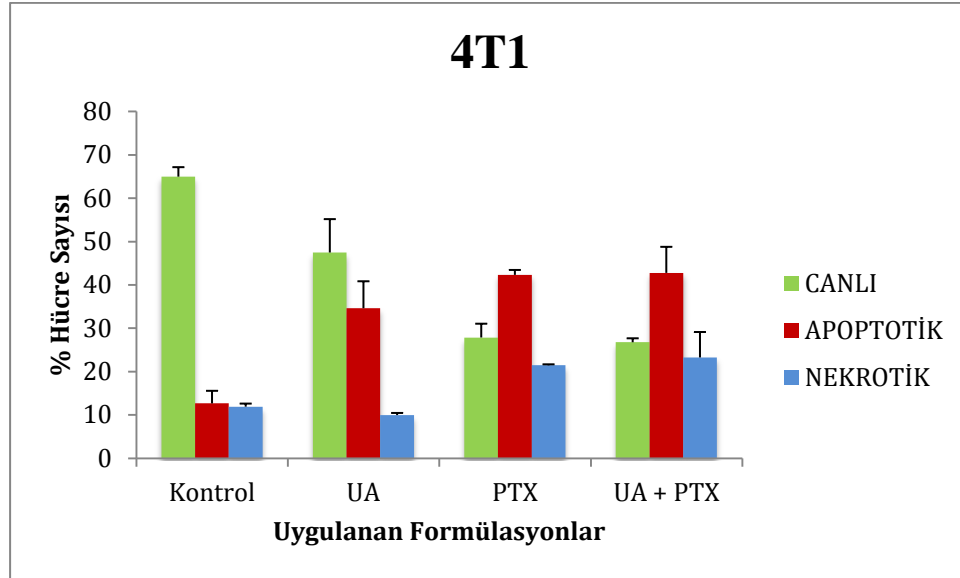


Şekil 4.40. 4T1 hücreleri PI boyama sonucu 25 μ M usnik asit ve 100 nM paklitaksel birlikte uygulama grubu A) Otofloresans B) Ölü hücre sayısı akım sitometri sonuçları.

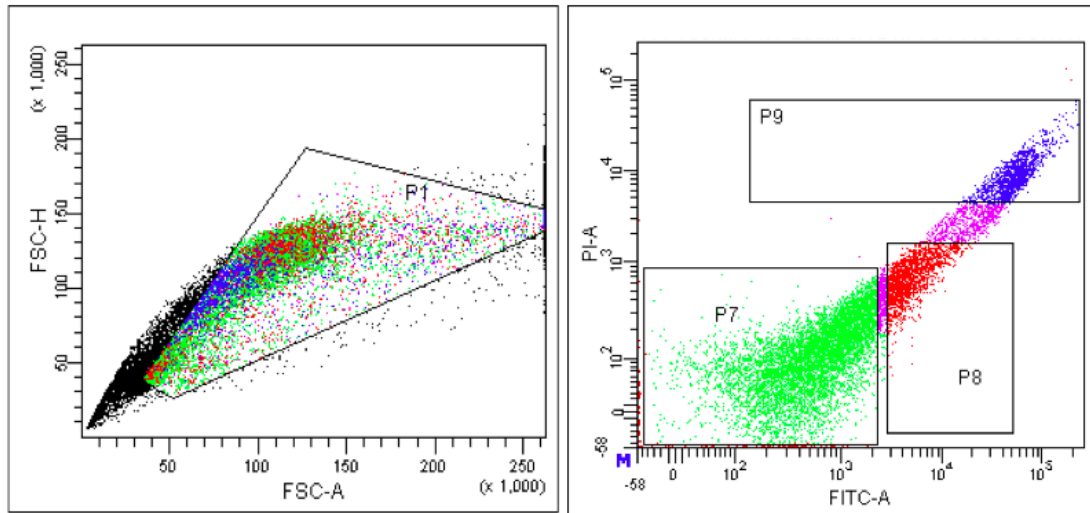
4T1 hücrelerine formülasyonların 24 saatlik uygulaması YO-PRO-1/PI boyama sonucunda canlı hücrelerin sayısında azalma, apoptotik hücre sayısında artma görülmüştür. Paklitakselin tek başına ve usnik asitle birlikte uygulanması nekrotik hücre sayısını kontrol ve tek başına usnik asit uygulamasına göre artırmıştır (Tablo 4.28 ve Şekil 4.41.- Şekil 4.45.).

Tablo 4.28. 4T1 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu hücre oranları.

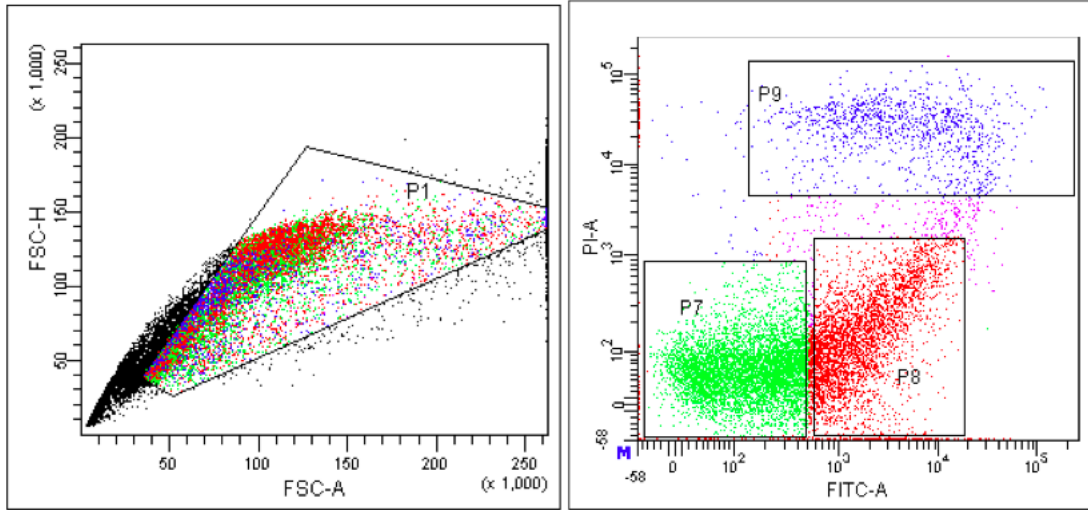
	CANLI	APOPTOTİK	NEKROTİK
Kontrol	64,95	12,65	11,9
UA	47,45	34,6	9,95
PTX	27,85	42,3	21,45
UA + PTX	26,75	42,75	23,25



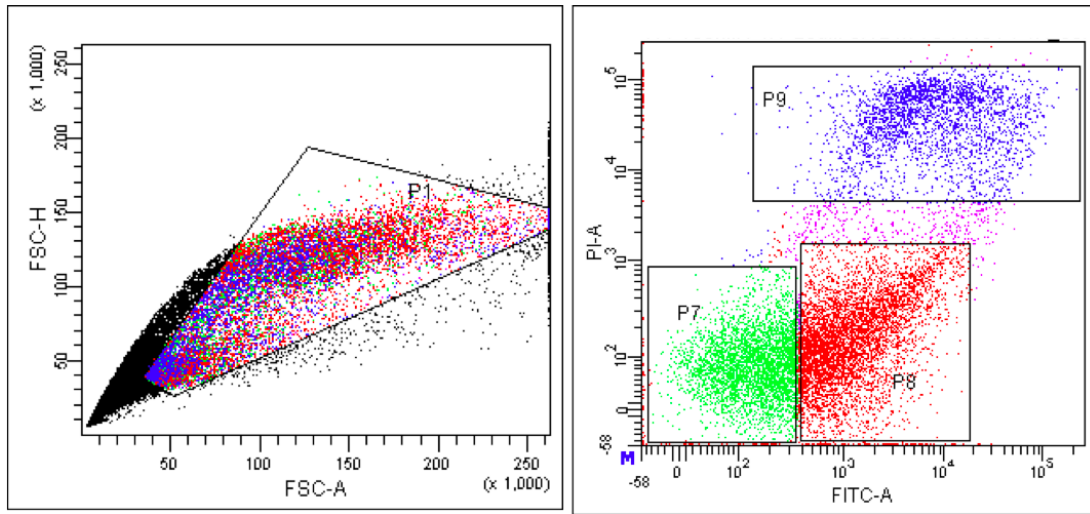
Şekil 4.41. 4T1 hücreleri 24 saat formülasyon uygulaması sonrasında hücre canlılığındaki değişimler.



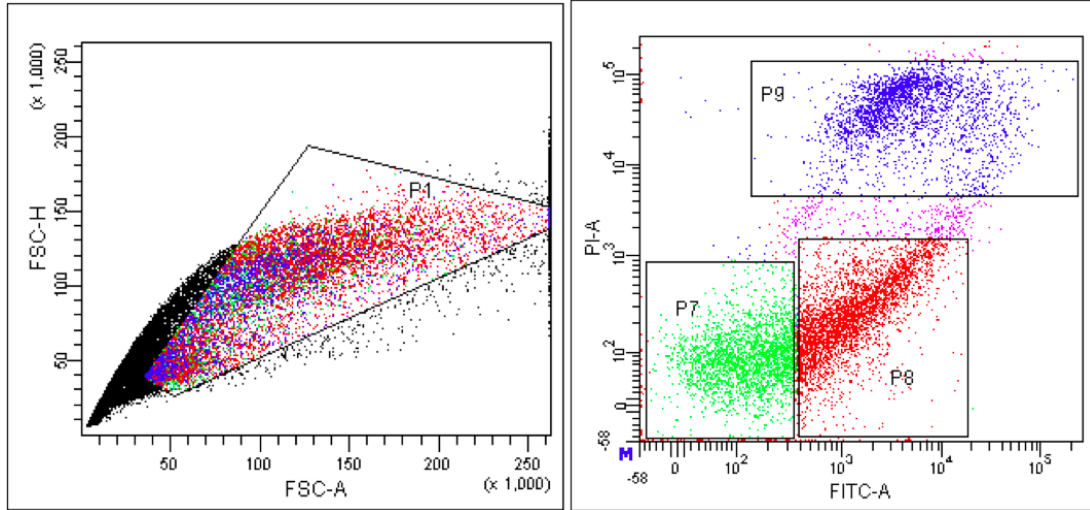
Şekil 4.42. 4T1 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu kontrol grubu temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri (P1 alanı çalışılan hücrelerin seçimini, P7 alanı canlı hücreleri, P8 alanı apoptotik hücreleri ve P9 alanı nekrotik hücreleri göstermektedir.).



Şekil 4.43. 4T1 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 12,5 μ M usnik asit uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri (P1 alanı çalışılan hücrelerin seçimini, P7 alanı canlı hücreleri, P8 alanı apoptotik hücreleri ve P9 alanı nekrotik hücreleri göstermektedir.).



Şekil 4.44. 4T1 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 100 nM paklitaksel uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri (P1 alanı çalışılan hücrelerin seçimini, P7 alanı canlı hücreleri, P8 alanı apoptotik hücreleri ve P9 alanı nekrotik hücreleri göstermektedir.).



Şekil 4.45. 4T1 hücreleri YO-PRO-1/PI boyama sonucu 12,5 μ M usnik asit ve 100 nM paklitaksel birlikte uygulaması temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri (P1 alanı çalışılan hücrelerin seçimini, P7 alanı canlı hücreleri, P8 alanı apoptotik hücreleri ve P9 alanı nekrotik hücreleri göstermektedir.).

5. TARTIŞMA

5.1. MTT Sonuçları

Çeşitli tetrazolium bileşikleri hücre canlılığını belirlemede kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan bileşikler; MTT, MTS, XTT ve WST-1' dir. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) aktif metabolizmaya sahip canlı hücrelerde formazan ürünlerine dönüşmektedir. Hücreler öldüğü zaman MTT'yi formazana dönüştürme özelliklerini kaybederler ve bu sayede sadece canlı hücrelerin belirlenebileceği bir marker olarak kullanılmaktadır (108). Bizim yaptığımız MTT testi sonucunda çalıştığımız hücre hatlarında hücre canlılığının anlamlı oranda azaldığının, paklitaksel ile usnik asit kombinasyonunun uygulandığı gruplarda tek başlarına uygulanmaya göre daha yüksek oranda hücre canlılığında azalma olduğu bulunmuştur.

5.1.1. Paklitaksel Uygulaması Sonuçları

İlk olarak 1993 yılında paklitakselin sitotoksik etki mekanizmalarından birisinin apoptozis ile ilişkili olduğu insan lenfositler lösemi hücrelerinde gösterilmiştir (109). Paklitakselin neden olduğu sitotoksitenin ve apoptozisin arasında pozitif korelasyon olduğu *in vivo* bir çalışmada da gösterilmiştir (110). Bizim elde ettiğimiz sonuçlarda da 4T1 ve HCC38 hücreleri üzerine paklitaksel uygulanması hücre canlılığını kontrol gruplarına kıyasla anlamlı ölçüde azaltmıştır. HeLa hücrelerinde yapılan bir çalışmada 10 nM paklitaksel mikrotübül kütlesine etkili değil iken mitotik tutuklama ve apoptozla sonuçlanan mikrotübül dinamiklerini baskılamıştır. 100 nM gibi yüksek konsantrasyonlarda paklitaksel uygulanmasında stabil mikrotübül demetleri oluşmuş ve mikrotübül polimerlerinin kütlesi artmıştır. G2/M hücre siklusunda tutulma ve apoptozis ile sonuçlanan mitoz bölünmenin durması meydana gelmiştir (45, 68).

Paklitaksel'in apoptozise neden olması Bcl-2 gen ailesi tarafından regüle edilmektedir. Paklitaksel Bcl-x1 anti-apoptotik ifadesini azaltıp, Bak ve Bax ifadesini arttırmaktadır (111). Chaudhri ve arkadaşları HCC38 hücrelerine uygulanan 20 µM taksol konsantrasyonunda mitokondriden sitozole sitokrom C geçişinde artış ve ayrıca BAX/BCL2 artışı meydana geldiği ve taksolun HCC38 meme kanseri

hücrelerinde apoptozu indüklediği bulunmuştur. (112). Elde ettiğimiz sonuçlarda 4T1 hücrelerine paklitakselin 1000 nM konsantrasyonda uygulanması ile hücre canlılığındaki düşüş her üç saatte de kontrole göre anlamlıdır. HCC38 hücrelerindeki kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalma 48 ve 72 saat uygulamalarında paklitakselin daha düşük konsantrasyonlarında görülmektedir.

Liebmann ve arkadaşları MCF-7, A549, HeLa, U373, HT-29, OVG-1, PC-Sh ve PC-Zd insan tümör hücre hattıyla çalışmışlardır ve 2 nM- 20 nM konsantrasyon aralığında 24 saatten 72 saate kadar uzayan sürelerde paklitaksele maruz kalmanın farklı hücre hatlarında sitotoksitesiyi 5 kattan 200 kata kadar arttırdığı bulunmuştur (113). Bizim çalışmamızda 4T1 hücrelerine zamana bağlı olarak uygulanan paklitaksel konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaz iken HCC38 hücrelerinde ise sadece 24 saatte konsantrasyona bağlı bir azalma görülmezken zamana bağlı olarak konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark görülmüştür. HCC38 hücrelerine 100 nM paklitaksel uygulamasında 24 saat sonra hücre canlılığı yaklaşık olarak %3 azalır iken 72 saat sonrasında bu azalma %35 civarındadır.

Paklitakselin *in vitro* olarak 24 saat boyunca uygulamasında 50 nM konsantrasyonun üzerinde artmış sitotoksitesiyeye neden olmazken, 50 nM konsantrasyona kadarki uygulamalarında ise 24 saatten 72 saate kadar maruz bırakılan hücrelerde daha etkili olduğu bulunmuştur (45). Yeung ve arkadaşları taksolun canlı hücre üzerinde meydana getirdiği azalmayı bifazik olarak gerçekleştirdiğini göstermiştir. İlk fazdaki azalmanın 0,005'den 0,05 μ M konsantrasyonlarda olduğu ikinci fazdaki azalmanın ise 5'den 50 μ M'a kadarki konsantrasyonlarda meydana geldiğini ve bu konsantrasyonlar arasında bir platonun görüldüğünü bulmuşlardır. Bifazik cevabın iki farklı mekanizma tarafından oluştuğunu, bunlardan ilkinin düşük konsantrasyonlarda (0,005- 0,05 μ M) taksolun mitoz boyunca iği stabilize ettiğini ve böylece mitozu bloke ettiğini belirtmişlerdir. Bu mitotik blok hücre proliferasyonunda inhibisyona yol açmış ve apoptozu uyarmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda ise (5-50 μ M) taksol mikrotübül polimerizasyonunu artırmış ve mikrotübül oluşumunu uyarılmış, S fazına girişi bloklamıştır. S fazına girişin bloklanması ile hücre proliferasyonunda azalma meydana gelmiş ve nekrozis uyarılmıştır (114). HCC38 hücrelerinden elde ettiğimiz

sonuçlara göre özellikle 72 saatlik paklitakselin 10 nM ve altındaki düşük konsantrasyonlarında hücre canlılığında yüksek oranda bir azalma olduğu daha yüksek konsantrasyonlarında ise bu azalmanın sabit kaldığı görülmüştür.

McCloskey ve arkadaşları (115) MDA-MB-468 insan meme kanseri hücrelerine 10 nM ve üzeri konsantrasyonlarda paklitakseli 3 ve 24 saat süreyle uyguladıklarında büyümenin inhibe olduğunu ve apoptozla ilişkili morfolojik değişikliklerin meydana geldiğini bulmuşlardır. 120 saat paklitaksel uygulaması ile 24 saat paklitaksel uygulama sonuçlarının benzer olduğunu ve en uygun sürenin 3 veya 24 saat olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 4T1 hücreleri üzerine uygulanan paklitaksel her üç zaman diliminde de benzer etkiyi göstermiştir. HCC38 hücrelerinde ise hücre canlılığındaki azalmanın en fazla 48 ve 72 saatlerde olduğu bulunmuştur.

5.1.2. Usnik Asit Uygulaması Sonuçları

Brisdelli ve arkadaşları (13) altı liken sekonder metabolitini (difraktaik asit, lobarik asit, usnik asit, visanisin, varilarik asit ve protolikhesterinik asit) MCF-7 (meme adenokarsinoma), HeLa (serviks adenokarsinoma) ve HCT-116 (kolon karsinoma) insan kanser hücre hatları üzerinde çalışmışlardır. Metabolitler hücrelere farklı konsantrasyonlarda (2,5-100 mM) 48 saat boyunca uygulanmıştır. Liken metabolitleri konsantrasyona bağlı olarak çeşitli sitotoksik etki göstermiştir ve usnik asitin en kuvvetli sitotoksik ajan olduğu bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada usnik asitin HCC38 hücreleri üzerine 48 ve 72 saatleri boyunca uygulanması sonucunda hücre canlılığının kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı görülmüştür.

Baliga ve arkadaşlarının (116) 4T1 hücreleri ile yaptıkları çalışmada yeşil çay polifenollerinin *in vivo* ve *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Yeşil çay fenollerinin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Abu ve arkadaşları (2) flavokawain B (FKB)' nin 4T1 meme kanserli farelerdeki antitümör ve antimetastatik etkisini incelemişlerdir. FKB' nin *in vivo* olarak tümör büyümesini inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bizim yaptığımız çalışmada ise usnik asitin 4T1 hücre canlılığını azaltıcı etkisi tespit edilmiş ancak bu azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Usnik asit ayrıca fare lösemi L1210 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak apoptozisi indüklemiştir (117). Çalışmamızda kullandığımız HCC38 hücreleri üzerine usnik asitin hücre canlılığını azaltıcı etkisi ise 48 ve 72 saat boyunca uygulamasında 12,5 ve 25 μM konsantrasyonları her iki zamana ve her iki konsantrasyona bağlı istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir.

Yapılan diğer çalışmalarda ise usnik asitin ve atranorinin sitotoksik etkisi A2780 (over karsinoma), MCF-7 (meme adenokarsinoma), HT-29 (kolon adenokarsinoma), HL-60 (promiyelositik lösemi), Jurkat (T-cell lenfosit lösemi), HeLa (serviks adenokarsinoma), SK-BR-3 (meme adenokarsinoma) HCT-116 p53 +/+ (kolon karsinoma) ve HCT-116 p53 -/- (yabancıl tip p53 kolon karsinoma veya p53-null) *in vitro* kanser modellerine karşı gösterilmiştir. Usnik asitin 50 μM konsantrasyonu çalışılan çoğu hücre için en etkili doz olarak gösterilmiştir (61). 4T1 hücreleriyle yaptığımız çalışmada usnik asitin 25 μM konsantrasyonu hücre canlılığını her üç zaman diliminde de %60'lara indirirse de bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. HCC38 hücrelerinde ise 12,5 μM usnik asit uygulaması hücre canlılığını kontrol grubuna göre 48 ve 72 saatlerinde sırası ile %83 ve %62 seviyelerine indirmiştir ve istatistiksel olarak anlamlıdır.

5.1.3. Usnik Asit ve Paklitaksel Kombinasyon Sonuçları

İnsan serum albuminini kullanarak terapötik etki ve sistemik toksisitelerinin azaltılması için pirarubisin ve paklitaksel nanopartikül sistemini (Co-AN) kullanmışlardır (118). 4T1 hücreleri kullanılarak meme kanseri oluşturulan BALB/c farelerin tümörlerinde Co-AN uygulaması sonrasında yüksek ilaç birikimi meydana gelmiş ve normal dokulara dağılımı azalmıştır. *in vitro* 4T1 hücreleri üzerine sitotoksik etkisine ve *in vivo* 4T1 antitümör etkisine baktıklarında Co-AN'in antitümör etkisi tekli ilaç uygulamasından ya da serbest kombinasyonundan daha etkili olduğu bulunmuştur. Tekli ilaç uygulamasıyla karşılaştırıldığında Co-AN uygulaması apoptoziste artışa ve hücre döngüsünün G2/M evresinde kalmasında artışa neden olduğu bulunmuştur (118). Chen ve arkadaşları (119) fare CCL21 genini kodlayan rekombinant adenovirüsle (Ad-mCCL21) kombine düşük doz paklitaksel (Paklitaksel, 40 μg /fare, 100 μL) verdiklerinde 4T1 meme kanserli farelerde tümör büyümesinin ilaçların tek başına verilmelerine göre daha etkili bir şekilde azalttığını

ve önemli ölçüde hayatta kalım sürelerini uzattığını bulmuştur. Bizim yaptığımız çalışma sonucunda 4T1 hücreleri üzerine 100 nM paklitakselle birlikte 25 µM usnik asit uygulanması sonucunda her üç saat diliminde de (24-48-72 saat) hücre canlılığının yaklaşık %50'ler seviyesine indiği bulunmuştur. Paklitakselin ve usnik asitin ayrı ayrı uygulanmasına kıyasla hücre canlılığındaki azalmanın daha fazla olduğu görülmüştür.

Quispe-Soto ve Calaf (120), MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerine 15 ve 30 µM konsantrasyonlarda curcumin, 10'dan 240 nM'a kadar artan konsantrasyonlarda paklitaksel ve iki ilacın kombinasyonunu uygulamışlardır. MCF-7 hücrelerinde 15 µM curcumin ve 120 nM paklitaksel uygulamasında kontrol grubuna göre ikilenme zamanının önemli ölçüde uzamış olduğu bulunmuştur. MDA-MB-231 hücrelerinde ise 15 µM curcumin ile paklitakselin 10, 20 ve 240 nM konsantrasyonlarının uygulanmasında ve 30 µM curcumin ile paklitakselin 10 nM konsantrasyonunun uygulanması kontrol grubuna ve tek başına 15 µM curcumin uygulamasına kıyasla ikilenme zamanını önemli ölçüde uzattığı bulunmuştur. Curcumin ve paklitakselin hücre hatlarına birlikte uygulanmasının ilaçların tek başlarına uygulanmasına kıyasla büyümeyi engelleyici etkisinin daha etkili olduğu ve paklitakselin apoptotik etkisini curcuminin güçlendirdiği bulunmuştur. HCC38 hücrelerine paklitaksel ve usnik asitin birlikte uygulanması hücre canlılığını tek başlarına olan etkileriyle kıyaslandığında daha yüksek oranda azalttığı görülmüştür. 12,5 µM usnik asit ve 100 nM paklitakselin ayrı ayrı uygulanmasından sonraki hücre canlılığı %62 seviyesinde iken birlikte uygulanmasıyla bu oran %41'lere inmektedir.

5.2. Akım Sitometri Sonuçları

Gawlitta ve ark. (107) YO-PRO-1 ile propidium iodide ikili boyamasının C2C12 kültüründe apoptoz ve nekrozu belirlemede uygulanabilirliğini göstermiştir. Apoptoz ve nekrozun canlı hücre kültürlerinde hasar oluşturmadan ölçülebileceğini ve ayırt edilebileceğini göstermişlerdir. Liao ve arkadaşları (121) U937 hücrelerinde paklitaksel tarafından başlatılan apoptoz ve nekrozu incelemişlerdir. Paklitaksel uygulamasından sonra yaptıkları Anneksin ve PI analizi ile hücrelerin G1 ve S fazında ölümlerin çoğunun apoptoz ile meydana geldiğini buna karşılık G2/M fazındaki hücrelerde ölümün hem apoptoz hem de nekroz ile oluştuğunu

bulmuşlardır. Sitokrom c salımı ve mitokondri membran potansiyelinde azalma gibi apoptozun tipik olayları G2/M fazı yerine öncelikle S fazında olmaktadır. Yaptıkları çalışma göstermiştir ki paklitaksel G1 ve S fazındaki hücrelerde apoptozu uyarırken G2/M fazındaki hücrelerde ise hem apoptozu hem de nekrozu uyarmaktadır. 20 nM konsantrasyonda 12 saat paklitaksele maruz kalan S ve G2/M hücrelerinde DNA fragmentasyonunu uyarırken hücre döngüsünde tüm evrelerindeki hücrelerde 24 saat paklitaksel uygulaması ile şiddetli apoptozis görülmüştür. 24 saat uygulamasından sonra G1, S ve G2/M hücrelerindeki apoptozis oranı sırasıyla %65, %85 ve %81 olarak bulunmuştur. 4T1 hücreleriyle yaptığımız analizler sonucunda 100 nM paklitaksel ve 25 µM usnik asitin 24 saat uygulanmasıyla apoptotik hücre oranları sırasıyla %42,3 ve %34,6 olarak bulunmuştur. Aynı sürede HCC38 hücrelerinde ise 100 nM paklitaksel uygulamasından sonra apoptotik hücre oranı %38,65 iken 12,5 µM usnik asit uygulaması sonrasında oran %29,6 olarak bulunmuştur.

Yuan ve arkadaşları (122), A549 hücreleriyle yaptıkları çalışmada paklitakselin 13 ve 40 nM konsantrasyonlarını tek başlarına ve 10 µM Andrographolide (Andro) ile birlikte uygulamış ve sinerjistik antikanser etkisini araştırmışlardır. Andro ile kombine edilmiş paklitakselin apoptozisi tek başına uygulamasına göre önemli derecelerde arttırdığı bulunmuştur. Paklitaksel uygulaması A549 hücrelerini G2/M fazında doza bağlı olarak tutmaktadır ve Andro ile uygulanmasıyla ise yine aynı seviyelerde hücre döngüsü tutulması olduğunu göstermişlerdir. Paklitaksel A549 hücrelerindeki apoptozu Andro ile birlikte sinerjistik olarak uyarılmaktadır. Akım sitometri analizinden elde ettiğimiz sonuçlara göre 4T1 hücreleri üzerine paklitakselin ve usnik asitin ayrı ayrı uygulanması ile birlikte uygulanması arasında bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda klinikte usnik asit ile paklitaksel kombinasyonunun kullanılmasının tedavi sürecine bir katkısı olmayacağı söylenebilir fakat MTT sonuçlarına baktığımızda formülasyonların ayrı ayrı uygulanmasına kıyasla birlikte uygulanmasının hücre canlılığını daha da azalttığı bulunmuştur. MTT sonuçlarından elde edilen azalma hücrede mitokondriyal aktivitenin azalması sonucunda meydana gelmiş olabilir. Çünkü MTT testi sitotoksosite, proliferasyon ve mitokondriyal aktivite ölçmektedir ve MTT testinin sonucu hücre sayısı ile her hücredeki mitokondriyal aktiviteye bağlı olarak değişmektedir (123, 124). Bunula ilişkili olarak uygulanan formülasyonlar

4T1 hücrelerinin metabolizmalarını yavaşlatmış olabilir ve MTT'de bu hücrelerin formazan kristalleri oluşturma kapasiteleri azalıp bunların da sanki ölü hücreler gibi algılanmasına ve hücre canlılığında daha çok azalma meydana gelmiş gibi görülürken akım sitometri analizinde metabolizmaları yavaşlamış olan bu hücreler halen canlı oldukları için bir fark bulunamamış olabilir. HCC38 hücrelerinde ise 100 nM paklitakselle birlikte usnik asitin 12,5 μ M konsantrasyonunun uygulanması sinerjistik etki gösterip ayrı ayrı uygulanmalarına kıyasla apoptozu artırdığı görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada,

1. HCC38 hücreleri üzerine paklitakselin 24 saat boyunca uygulanması sonucunda hücre canlılığında çalışılan tüm konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$).
2. HCC38 hücreleri üzerine 100 nM paklitakselin 48 ve 72 saat uygulanması ile hücre canlılığı sırasıyla %78 ve %62 seviyelerine inmiştir ve kontrol grubuna kıyasla anlamlıdır.
3. HCC38 hücreleri üzerine usnik asitin artan konsantrasyonlarının 24 saat boyunca uygulanması ile hücre canlılığı açısından kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark meydana gelmemiştir ($P>0,05$).
4. HCC38 hücreleri üzerine usnik asitin 12,5 ve 25 μ M konsantrasyonlarının 48 saat uygulaması sonucunda sırasıyla hücre canlılığı %83 ve %65 seviyelerine inmiştir. Aynı konsantrasyonların 72 saat boyunca uygulanması ile hücre canlılığı sırasıyla %62 ve %54 seviyelerindedir.
5. HCC38 hücreleri üzerine 12,5 μ M usnik ast ile birlikte 100 nM paklitakselin birlikte uygulanması ile 24 saatte hücre canlılığı %50'ye, 48 saatte %55'e ve 72 saatte %41 seviyelerine inmiştir.
6. MTT testi sonuçlarına göre usnik asit ve paklitakselin ayrı ayrı uygulanmasına kıyasla birlikte uygulanması HCC38 hücrelerinde hücre canlılığını daha çok azaltmıştır.
7. HCC38 hücreleri üzerine usnik asit ve paklitakselin birlikte 24, 48 ve 72 saat uygulamaları sonucunda ölü hücre oranı kontrol grubuna kıyasla her üç saatte de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır fakat bu artış tek başına paklitaksel uygulanmasındaki kadardır.
8. HCC38 hücrelerine paklitakselin 10 nM'a kadarki konsantrasyonlarında özellikle 72 saatte hücre canlılığında yüksek bir azalma, 10 nM'ın üzerindeki

konsantrasyonlarda ise hücre canlılığında bir plato görülmüştür.

9. 4T1 hücreleri üzerine paklitakselin 100 nM konsantrasyonda 24 saat uygulanmasında hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde %77'lere, 48 saat uygulamasında %80'lere ve 72 saat uygulamasında %63'lere inmiştir.

10. 4T1 hücreleri üzerine 25 µM konsantrasyonda usnik asitin 24 saat boyunca uygulanması hücre canlılığını %75'e indirmiştir. 48 ve 72 saat sürelerinde ise hücre canlılığı %63'lere inmiştir fakat her üç saatteki bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P>0,05$).

11. 4T1 hücreleri üzerine 25 µM usnik asit ile birlikte 100 nM paklitakselin uygulanmasının 24 saat sonrasında hücre canlılığı %57'ye, 48 saat sonrasında %53'e ve 72 saat sonrasında ise %46'ya inmiştir ve her üç saatte de bu azalma kontrol grubuna göre anlamlıdır.

12. 4T1 hücrelerinin flow sitometri analizi sonucunda 24, 48 ve 72 saat boyunca paklitakselin tek başına ve 25 µM usnik asit ile birlikte uygulanması sonucunda ölü hücre oranında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma meydana gelmiştir fakat bu artış paklitakselin tek başına ve usnik asit ile birlikte etkisi arasında anlamlı değildir ($P>0,05$).

13. 4T1 hücreleri üzerine formülasyonların uygulanması sonucunda canlı hücre oranı azalırken apoptotik hücre oranında artış meydana gelmiştir. Paklitakselin tek başına ve usnik asitle birlikte 24 saat boyunca uygulanması sonucunda nekrotik hücre oranında da artış meydana gelmiştir.

Bu verilere dayanarak önerilerimiz;

14. HCC38 insan meme kanserinin tedavisinde paklitakselle birlikte klinikte kullanılması için daha ileri moleküler boyutta ve hayvan deneylerini de içeren çalışmaları yapılmalıdır.

15. İnsan meme kanserinin dördüncü evresine çok benzeyen 4T1 hücreleriyle yapacağımız *in vivo* çalışmalar için ön bilgi sağlanmıştır ve buradan elde edilen

sonuçlar doğrultusunda tedavi yaklaşımları uygulanabilir.

16. 4T1 hücrelerindeki metabolizma yavaşlamasının tam olarak aydınlatılabilmesi için moleküler seviyede ileri çalışmalar yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013; 63(1):11–30.
2. Abu N, Mohamed NE, Yeap SK, Lim KL, Akhtar MN, Zulfadli AJ, et al. *In vivo* antitumor and antimetastatic effects of flavokawain B in 4T1 breast cancer cell-challenged mice. *Drug Design, Development and Therapy.* 2015; 9:1401–1417.
3. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer, Breast Cancer Chemosensitivity, In: Yu D. and Hung M.C. (ed.), Chapter 1, Springer, New York, USA, 2007; 1-22. ISBN: 978-0-387-74037-9.
4. Karlığa B, Talınlı N. 3'-N-Tiyokarbamat paklitaksel türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivite çalışmaları. *Fen Bilimleri GTÜ Dergisi.* 2004; 2(1): 25-30.
5. Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980; 77:1561–1565.
6. Ingoldsdottir K. Usnic acid. *Phytochemistry.* 2002; 61:729-736.
7. Mayer M, O'Neill MA, Murray KE, Santos-Magalhaes NS, Carneiro-Leao AM, Thompson AM, et al. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anti-cancer Drugs.* 2005; 16:805–809.
8. O'Neill MA, Mayer M, Murray KE, Rolim-Santos HML, Santos-Magalhaes NS, Thompson AM, et al. Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells? *Braz. J. Biol.* 2010; 70(3):659-664.
9. Campanella L, Delfini M, Ercole P, Iacoangeli A, Risuleo G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription. *Biochimie.* 2002; 84:329–334.
10. Manojlovic NT, Vasiljevic PJ, Maskovic PZ, Juskovic M, Bogdanovic-Dusanovic G. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;1–8.
11. Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Bayir Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phytomedicine.* 2005; 12:656–662.
12. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol.* 2006; 103:59–65.
13. Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, et al. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. *Phytother Res.* 2013; 27(3):431–437.

14. Otsuka H, Komiya T, Tsukumi M, Toyosato T, Fujimura H. Studies on anti-inflammatory drugs. Anti-inflammatory activity of crude drugs and plants (II). *J. Takeda Res. Lab.* 1972; 31:247.
15. Yamamoto R, Miyase T, Ueno A. Stachys saponins I–VIII, new oleananetype triterpene saponins from *Stachys riederi* Chamisso. *Chemical and Pharmacological Bulletin.* 1994; 42:1291-1296.
16. Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshit Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med.* 1995; 61:113.
17. Kumar S, Muller K. Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J. Nat. Prod.* 1999; 62:821-823.
18. Pramyothin P, Janthasoot W, Pongnimitprasert N, Phrukudom S, Ruangrungsi N. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology.* 2004; 90:381-387.
19. Odabaşoğlu F, Aslan A, akır A, Suleyman H, Karagoz Y, Halıcı M. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytotherapy Research.* 2004; 18(11):938-41.
20. Odabaşoğlu F, akır A, Suleyman H, Aslan A, Bayır Y, Halıcı M, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of ethnopharmacology.* 2006; 103(1):59-65.
21. Honda NK, Pavan FR, Coelho RG, deAndradeLeite SR, Micheletti AC, Lopes TIB, et al. Anti mycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine.* 2010; 17:328-332.
22. Cansaran-Duman D. Türkiye’de bazı liken turlelerindeki usnik asitin HPLC yöntemi ile değerlendirilmesi ve antimikrobiyal aktiviteleri. *Turk Hij Den Biyol Derg.* 2010; 66(4):153-60.
23. Cansaran-Duman D, Halıcı MG. Antimicrobial activity of usnic acid on *Squamarina lentigera* lichen species. *Turk Hij Den Biyol Derg.* 2012; 69(3):127-34.
24. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015; 136:E359-E386.
25. Türkiye Sağlık İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Ankara, 2016.
26. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. [Erişim Tarihi 25 Kasım 2016]. Erişim Adresi: <http://globocan.iarc.fr>.
27. Manual of Breast Diseases. Ed: Ismail Jatoi. Lippincott Williams & Wilkins. 2002.

28. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. Early Stage Breast Cancer, Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott; 2008; 1179.
29. Casciato DA, Territo MC. Manual of Clinical Oncology 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins 2009; 237-65.
30. Sarkar S, Mandal M. Breast Cancer: Classification Based on Molecular Etiology Influencing Prognosis and Prediction, Breast Cancer-Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis. In: Gunduz M, editors. Chapter 4, InTech, Rijeka, Croatia, 2011; 69-84.
31. Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Health*. 2015; 11:59-66.
32. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 1995; 333(22):1456-1461.
33. Cuzick J, Stewart H, Rutqvist L, Houghton J, Edwards R, Redmond C, et al. Cause-specific mortality in long-term survivors of breast cancer who participated in trials of radiotherapy. *J Clin Oncol*. 1994; 12(3):447- 453.
34. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(24):2431-2442.
35. Jordan VC, O'Malley BW. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25(36):5815-5824.
36. Lonning PE, Taylor PD, Anker G, Iddon J, Wie L, Jorgensen LM, et al. High-dose estrogen treatment in postmenopausal breast cancer patients heavily exposed to endocrine therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2001; 67(2):111-116.
37. Bese NS, Iribas A, Dirican A, Oksuz D, Atkovar G, Ober A. Ovarian ablation by radiation therapy: is it still an option for the ablation of ovarian function in endocrine responsive premenopausal breast cancer patients? *Breast*. 2009; 18(5):304-308.
38. Işık G. Meme Kanseri Tedavisinde Paklitaksel Yüklü Katyonik Siklodekstrin Nanokapsül Ve Nanoküre Formülasyonu. Hacettepe University, Ankara, Turkey, 2013.
39. De Laurentiis M, Canello G, D'Agostino D, Giuliano M, Giordano A, Montagna E, et al. Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008; 26(1):44-53.
40. Vogel C, Chan A, Gril B, Kim SB, Kurebayashi J, Liu L, et al. Management of ErbB2-positive breast cancer: insights from preclinical and clinical studies with lapatinib. *Jpn J Clin Oncol*. 2010; 40(11):999-1013.

41. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J. Am. Chem. Soc. 1971; 93:2325–2327.
42. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and Its Formulations. International Journal of Pharmaceutics. 2001; 235:179-192.
43. Panchagnula R. Pharmaceutical Aspects of Paclitaxel. International Journal of Pharmaceutics. 1998; 172:1-15.
44. Adams JD, Flora K, Goldspiel BR, Wilson JW, Finley R. Taxol: a History of Pharmaceutical Development and Current Pharmaceutical Concerns. J. Nat. Cancer Inst. Monogr. 1993; 15:141-147.
45. McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. Biochim Biophys Acta 2008; 1785(2):96–132.
46. Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of taxol-induced cell death are concentration dependent. Cancer Research. 1998; 58:3620-3626.
47. Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of Paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. Cancer Research. 1996; 53:816-825.
48. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. Nature. 1979; 277:665-667.
49. Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (Taxotere): A semisynthetic analogue of taxol. J Natl Cancer Inst. 1991; 83:288-291.
50. Dias DA, Urban S. Phytochemical investigation of the Australian lichens *Ramalina glaucescens* and *Xanthoria parietina*. Nat Prod Commun. 2009; 4(7):959-64.
51. Singh N, Nambiar D, Kale RK, Singh RP. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. Nutr Cancer. 2013; 65(1):36-43.
52. Dinçsoy AB, Cansaran- Duman D. Changes in apoptosis related gene expression profiles in cancer cell line exposed to usnic acid lichen secondary metabolite. Turkish Journal Biology. 2017. Accepted for publications.
53. Lisci M, Monte M, Pacini E. Lichens and higher plants on stone: a review. Int Biodeterior Biodegrad. 2003; 51:1–17.
54. Melo MG, dos Santos JPA, Serafini MR, Caregnato FF, de Bittencourt Pasquali MA, Rabelo TK, et al. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. Toxicol In Vitro. 2011; 25:462–468.
55. Rabelo TK, Zeidan-Chulia F, Vasques LM, dos Santos JPA, da Rocha RF, Pasquali MAdB, et al. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). Toxicol In Vitro. 2012; 26:304–314.

56. Mitrovic T, Stamenkovic S, Cvetkovic V, Tosic S, Stankovic M, Radojevic I, et al. Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12:5428-5448.
57. Cansaran D, Atakol O, Halıcı MG, Aksoy A. HPLC Analysis of the Usnic Acid in some *Ramalina* Species from Anatolia and Investigation of their Antimicrobial Activities. *Pharmaceutical Biology.* 2007; 45(1):77-81.
58. Cansaran D, Kahya D, Yurdakulol E, Atakol O. Identification and Quantitation of Usnic Acid from the Lichen *Usnea* Species of Anatolia and Antimicrobial Activity. *Zeitschrift für Naturforschung C.* 2006; 61c:773-776.
59. Jin JQ, Li CQ, He LC. Down-regulatory effect of usnic acid on nuclear factor-kappa B-dependent tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Phytother Res.* 2008; 22:1605-1609.
60. Einarsdottir E, Groeneweg J, Björnsdottir GG. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. *Planta Med.* 2010; 76(10):969-974.
61. Backorova M, Backor M, Mikes J, Jendzelovsky R, Fedorocko P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicol. In Vitro.* 2011; 25:37-44.
62. Backorova M, Jendzelovsky R, Kello M. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol. In Vitro.* 2012; 26:462-468.
63. Machado NM, de Rezende AAA, Nepomuceno JC, Tavares DC, Wilson Roberto Cunha Mario Antonio Spano. Evaluation of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of (p)-usnic acid in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology.* 2016; 96:226-233.
64. Polat Z, Aydın E, Türkez H and Aslan A. *In vitro* risk assessment of usnic acid. *Toxicology and Industrial Health* 2016; 32(3):468–475.
65. Yang Y, Nguyen TT, Jeong M-H, Crişan F, Yu YH, Ha H-H, et al. Inhibitory Activity of (+)-Usnic Acid against Non-Small Cell Lung Cancer Cell Motility. *PLoS ONE.* 2016; 11(1).
66. Akhmanova A, Steinmetz MO. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2015; 16:711-726.
67. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science. 2002.
68. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:253–265.
69. Van Vuuren RJ, Visagie MH, Theron AE, Joubert AM. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015; 76:1101–1112.
70. Moudi M, Go R, Yien CY, Nazre M. Vinca alkaloids. *Int J Prev Med.* 2013; 4:1231–1235.

71. Barbuti AM, Chen ZS. Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. *Cancers (Basel)*. 2015; 7:2360–2371.
72. Zhai Y, Kronebusch PJ, Simon PM, Borisy GG. Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J Cell Biol*. 1996; 135:201–214.
73. Rusan NM, Fagerstrom CJ, Yvon AM, Wadsworth P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein- α tubulin. *Mol Biol Cell*. 2001; 12:971–980.
74. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:379–393.
75. Agic A, Djalali S, Diedrich K, Hornung D. Apoptosis in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*. 2009; 68(4):217–23.
76. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *Bmj*. 2001; 322:1536–8.
77. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 1998; 60:601–17.
78. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994; 73:2013–26.
79. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239–57.
80. Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 1999; 187:127–37.
81. Mayer B, Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci* 2003; 18:89–94.
82. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 2008; 18:157–64.
83. Galonek HL, Hardwick JM. Upgrading the BCL-2 network. *Nat Cell Biol* 2006; 8:1317–9.
84. Ghibelli L, Diederich M. Multistep and multitask Bax activation. *Mitochondrion* 2010; 10:604–13.
85. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87:99–163.
86. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25:4798–811.
87. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 2000; 256:58–66.
88. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues, *Teratology*. 1973; 253–266.

89. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 589–598.
90. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.* 1980; 68:251–306.
91. Zong WX, Thompson CB, Necrotic death as a cell fate, *Genes Dev.* 2006; 20:1–15.
92. Iyer SS, Pulsikens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; 106:20388–20393.
93. Radogna F, Dicato M, Diederich M. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. *Biochemical Pharmacology.* 2015; 94:1–11.
94. Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M. The ‘complexities’ of life and death: death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res* 2012; 318:1269–77.
95. Lacour S, Micheau O, Hammann A, Drouineaud V, Tschopp J, Solary E, et al. Chemotherapy enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand DISC assembly in HT29 human colon cancer cells. *Oncogene* 2003; 22:1807–16.
96. Bianchi K, Meier P. A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNFR1 signaling. *Mol Cell* 2009; 36:736–42.
97. Reiley WW, Jin W, Lee AJ, Wright A, Wu X, Tewalt EF, et al. Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses. *J Exp Med* 2007; 204:1475–85.
98. Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, et al. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 2002; 277:45162–71.
99. Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, Fligiel Z, Vogel R, Heppner GH. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1978; 38:3174-3181.
100. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1992; 52:1399-1405.
101. Heppner GH, Miller FR, Shekhar PM. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2000; 2:331–334.
102. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8:228.
103. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2539.aspx#culturemethod>. [Erişim Tarihi 25 Ekim 2016].
104. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2314.aspx>. [Erişim Tarihi 25 Ekim 2016].

105. Idziorek T, Estaquier J, De Bels F, Ameisen JC. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* 1995; 185:249–258.
106. Liu X, Van Vleet T, Schnellmann RG. The role of calpain in oncotic cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004; 44:349–370.
107. Gawlitta D, Oomens CWJ, Baaijens FPT, Bouten CVC. Evaluation of a continuous quantification method of apoptosis and necrosis in tissue cultures. *Cytotechnology.* 2004; 46:139–150.
108. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. *Assay Guidance Manual, Cell Viability Assays.* Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Created: May 1, 2013; Updated: July 1, 2016; 305-335.
109. Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Mahohey ME, Huang Y. Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia* 1993; 7:563-8.
110. Milross CG, Mason KA, Hunter NR, Chung WK, Peters LJ, Milas L. Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1308–14.
111. Blagosklonny MV, Giannakakou P, el-Deiry WS, Kingston DG, Higgs PI, Neckers L, et al. Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res* 1997; 57:130–5.
112. Chaudhri RA, Hadadi A, Lobachev KS, Schwartz Z, Boyan BD. Estrogen Receptor-alpha 36 Mediates the Anti-apoptotic Effect of Estradiol in Triple Negative Breast Cancer Cells via a Membrane-Associated Mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843(11):2796–2806.
113. Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer.* 1993; 68(6):1104–1109.
114. Yeung TK, Germond C, Chen X, Wang Z. The Mode of Action of Taxol: Apoptosis at Low Concentration and Necrosis at High Concentration. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1999; 263:398–404.
115. McCloskey DE, Kaufmann SH, Prestigiacomo LJ, Davidson NE. Paclitaxel induces programmed cell death in MDA-MB-468 human breast cancer cells. *Clinical Cancer Research.* 1996; 2(5):847-854.
116. Baliga MS, Meleth S, Katiyar SK. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells *in vitro* and *in vivo* systems. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(5):1918-27.
117. Bezivin C, Tomasi S, Rouaud I, Delcros JG, Boustie J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen *Cladonia convolute*. *Planta Med.* 2004; 70:874–877.
118. Yi X, Lian X, Dong J, Wan Z, Xia C, Song X, et al. Co-delivery of Pirarubicin and Paclitaxel by Human Serum Albumin Nanoparticles to Enhance Antitumor Effect and Reduce Systemic Toxicity in Breast Cancers. *Mol. Pharmaceutics.* 2015; 12(11):4085–4098.

119. Chen P, Luo S, Wen YJ, Li YH, Li J, Wang YS, et al. Low-dose paclitaxel improves the therapeutic efficacy of recombinant adenovirus encoding CCL21 chemokine against murine cancer. *Cancer Sci.* 2014; 105:1393–1401.
120. Quispe-Soto ED, Calaf GM. Effect of curcumin and paclitaxel on breast carcinogenesis. *International Journal Of Oncology.* 2016; 49:2569-2577.
121. Liao PC, Lieu CH. Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. *Life Sciences.* 2005; 76:1623–1639.
122. Yuan H, Sun B, Gao F, Lan M. Synergistic anticancer effects of andrographolide and paclitaxel against A549 NSCLC cells. *Pharmaceutical Biology.* 2016; 54(11):2629–2635
123. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.
124. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986; 22:89(2):271-7.

8. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Adnan Berk DİNÇSOY

Doğum yeri ve tarihi : Altındağ, 16.04.1990

Uyruğu : T.C.

İletişim adresi ve telefonu : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2. Kat, Fizyoloji Anabilim Dalı.

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

2014 (Şubat)- devam ediyor Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji AD (Araştırma Görevlisi -Yüksek Lisans)

2013 (Şubat)- 2014 Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD (Araştırma Görevlisi)

2013 (Mart- Ekim) ODTÜ Yabancı Dil Eğitimi (6 ay, İngilizce)

2012-2016 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (Yüksek Lisans)

2008-2012 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Lisans)

2007-2008 Hacettepe Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu (İngilizce Hazırlık)

III- Mesleki Deneyimi

- 2014 (Şubat)- devam ediyor** Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Fizyoloji AD (Araştırma Görevlisi)
- 2013 (Şubat)- 2014** Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji AD (Araştırma Görevlisi)

IV- Bilimsel Faaliyetleri

Yayınları:

Dinçsoy AB, Cansaran- Duman D. Changes in apoptosis related gene expression profiles in cancer cell line exposed to usnic acid lichen secondary metabolite. Turkish Journal Biology. 2017. Accepted for publications.

Özenoğlu S, Aydoğdu G, **Dinçsoy AB**, Taghidizaj AA, Derici K, Yılmaz E, Aras S, Cansaran-Duman D. Lichen sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2013; 70(4): 215-26.

Hamutoğlu R, **Dinçsoy AB**, Cansaran-Duman D, Aras S. Biyosorpsiyon, adsorpsiyon ve fitoremediasyon yöntemleri ve uygulamaları. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2012; 69(4): 235-53.

Berk Dinçsoy, Semra Soydam-Aydın, Hakan Büzkaya, Kürşat Derici, Sümer Aras, Demet Cansaran-Duman. “Screen a usnic acid lichen seconder metabolite to determine their cytotoxic effects and mRNA expression level” IV. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. November 27-29, METU, TURKEY (POSTER SUNUMU).

Katıldığı kongreler, sempozyum vb.

1. Hacettepe Üniversitesi, **TUBİTAK 1000 Rejeneratif ve Restoratif Tıp Alanı Strateji Belgesi Hazırlanma Çalıştayı**, 16 Aralık 2016, Ankara.

2. Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, ***Kök Hücre Günü-2016***, 22 Kasım 2016, Ankara.
3. Hacettepe Üniversitesi, ***12. Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Sempozyumu***, 17-18 Kasım 2016, Ankara.
4. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, ***Kök Hücre ve Uygulamaları Sempozyumu***, 2-3 Nisan 2016, İstanbul.
5. Hacettepe Üniversitesi, ***Temel İşaret Dili ve İlk Yardım Eğitimi***, 19 Şubat 2016, Ankara.
6. Hacettepe Üniversitesi, ***Turnitin ve iThenticate İntihal Kontrol Programlarının Kullanımı ve Tanıtımına Yönelik Eğitim Semineri***, 13 Ocak 2016, Ankara.
7. Akdeniz Üniversitesi Teknokent BabyLife- ***Kordon Kanı Bankacılığı Semineri***, 21 Ekim 2015, Ankara.
8. ***4th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*** 27-29 November 2015, Turkey.
9. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü- ***"Kantitatif Real Time PCR Uygulamaları"*** 23-24 Haziran 2015, Ankara.
10. Hacettepe Üniversitesi-***"Laboratuvar Güvenliği Eğitimi"*** 22-23 Haziran 2015, Ankara.
11. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, ***TÜBİTAK Fen ve Sağlık Bilimcileri İçin Proje Hazırlama ve Yürütme Becerilerinin Geliştirilmesi Eğitimi***, 27-28 Kasım- 9 Aralık 2013, Muğla.
12. Ankara Üniversitesi, ***Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası***, 04-13 Kasım 2013, Ankara.
13. ODTÜ Yabancı Diller Yüksek Okulu, ***İngilizce Yabancı Dil Eğitimi***, Yabancı Dil Sertifikası, 25 Mart-04 Ekim 2013, Ankara.

14. *Ulusal Biyoteknoloji Öğrenci Zirvesi* 23-24 Eylül 2011, Ankara.
15. *Uluslararası Katılımlı İTÜ IV. Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi*, 27- 31 Ağustos 2010, İstanbul.
16. *Uluslararası Katılımlı İTÜ IV. Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, Biyoformatik Çalıştayı*, 27-31 Ağustos 2010, İstanbul.