

**GLİOBLASTOMA KANSER HÜCRELERİNDE  
BİOCHANİN A KULLANIMININ ENDOPLAZMİK  
RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BIOCHANIN A  
USAGE ON ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN  
GLIOBLASTOMA CANCER CELLS**

**EZEL DEMİR**

**DOÇ. DR. EMEL SAĞLAR ÖZER**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024

# ÖZET

## GLİOBLASTOMA KANSER HÜCRELERİNDE BİOCHANİN A KULLANIMININ ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**EZEL DEMİR**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emel Sağlar Özer**

**Ocak 2024, 56 sayfa**

Glioblastoma multiform (GBM), beynin yaygın olarak gözlenen kötü huylu primer tümörlerinden biridir. Düşük sağ kalım oranı ve yüksek nüks riskiyle karakterize edilen GBM bir merkezi sinir sistemi tümördür. GBM geleneksel tedavisi kapsamında temozolomid (TMZ) kemoterapisi ve radyasyon tedavisi ile cerrahi tümör rezeksiyonu yapılmaktadır. Ancak bu tedavilerle bile sağ kalım oranı ilk beş yılda %5 civarındadır. Kullanılan tedavi yöntemlerinin seçici olmaması ve yüksek doz gereksinimi nedeniyle flavonoidlerin tedaviye yönelik etkileri güncel çalışmalarda araştırılmaya başlanmıştır. Flavonoidler sebze, meyve ve bitkisel içeceklerde bulunan doğal bileşiklerdir ve antioksidan, antimutajenik ve antiproliferatif özelliklere sahiptirler. Flavonoidlerin alt sınıflarından biri olan izoflavon grubunda yer alan Biochanin A'nın glioblastoma, ağız ve meme kanseri gibi çeşitli kanser hücrelerine karşı potansiyel kemopreventif ve antikanser özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir.

Bu tezin amacı literatürde çeşitli kanserler üzerinde etkisi olduğu bilinen Biochanin A'nın GBM'de kullanımının Endoplazmik Retikulum Stresi üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır.

Bu tez kapsamında, yapılan deneysel çalışmalarda T98G glioma hücre hattı kullanılmıştır. Deneylerde uygulanacak Biochanin A konsantrasyonlarının belirlenmesi için MTT yöntemi ile % hücre canlılıkları hesaplanmış ve 48 saat ve 100uM konsantrasyonda uygulama yapılması planlanmıştır. Biochanin A uygulanması sonrası apoptotik hücre oranları Annexin V-FITC kullanılarak akış sitometresi ile tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, Biochanin A uygulaması sonrası, uygulama yapılmayan hücrelere göre uygulama yapılan hücrelerde geç apoptozun indüklendiği gözlemlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan DMSO uygulanmış hücreler ile Biochanin A uygulanmış hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Biochanin A uygulamasının ER stresi ile ilişkisinin araştırılması için Kantatif Gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak ER stresi ile ilişkili *GADD153*, *GRP78*, *ATF4*, *eIF2S1* ve *XBPI* genlerin ifadelerine bakılmıştır. Gen ifadelerinde 48 saat için *ATF4* gen ifadesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Son olarak hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarları Calcium flux assay ile tespit edilmiştir. Uygulama sonrası hücre içi  $Ca^{+2}$  salınımı seviyelerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar Biochanin A'nın T98G hücrelerinde *ATF4* gen ifadesinde anlamlı bir değişikliğe neden olduğunu ve hücrelerde uygulama yapılmayan normal hücrelere göre geç apoptozu indüklediği göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Glioblastoma, flavonoidler, izoflavon, Biochanin A, ER stresi

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BIOCHANIN A USAGE ON ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN GLIOBLASTOMA CANCER CELLS**

**EZEL DEMİR**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Doç. Dr. Emel Sağlar Özer**

**January 2024, 56 pages**

Glioblastoma multiform (GBM) is one of the commonly observed malignant primary tumors of the brain. GBM is a central nervous system tumor characterized by a low survival rate and a high risk of recurrence.

Surgical tumor resection is performed with temozolomide (TMZ) chemotherapy and radiation therapy as part of the traditional treatment of GBM. Though even with these treatments, the survival rate is around 5% in the first five years. Due to the lack of selectivity of the treatment methods used and the high dose requirement, the effects of flavonoids on treatment have begun to be investigated in current studies. Flavonoids are natural compounds found in vegetables, fruits and herbal beverages and have antioxidant, antimutagenic and antiproliferative properties. Biochanin A, which is included in the isoflavone group, one of the subclasses of flavonoids, is known to have potential chemopreventive and anticancer properties against various cancer cells such as glioblastoma, oral and breast cancer.

The aim of this thesis is to investigate the effect of the use of Biochanin A in GBM, which is known to have an effect on various cancers in the literature, on Endoplasmic Reticulum Stress.

Within the scope of this thesis, the T98G glioma cell line was used for the experimental studies. In order to determine the optimal concentration of Biochanin A to be applied in the experiments, % cell viability was calculated using the MTT method and it was planned to apply at a concentration of 100uM for 48 hours. Apoptotic cell ratios after treatment of Biochanin A were determined by flow cytometry using Annexin V-FITC. The data obtained showed, after the treatment of Biochanin A, late apoptosis was induced in the treated cells compared to the normal cells without treatment. No statistically significant difference was found between the DMSO-treated cells that were used as controls and the Biochanin-A-treated cells. In order to investigate the relationship of Biochanin A usage on ER stress, the expressions of *GADD153*, *GRP78*, *ATF4*, *EIF2S1* and *XBPI* genes associated with ER stress were examined using the Quantitative Real-time PCR method. A significant increase in *ATF4* gene expression was observed for 48 hours. Finally, intracellular  $Ca^{+2}$  amounts were determined by Calcium flux assay. No change in intracellular  $Ca^{+2}$  release levels was observed after treatment.

The results obtained within the scope of the thesis showed that Biochanin A causes a significant change in the expression of the *ATF4* gene in T98G cells and induces late apoptosis in treated cells compared to non-treated normal

**Keywords:** Glioblastoma, flavonoids, isoflavones, Biochanin A, ER stress

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak yol gösteren, hiçbir emeği ve yardımını esirgemeyen değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Emel SAĞLAR ÖZER'e,

Tez çalışmalarım boyunca bütün sorularımı ve sorunlarımı sabırla dinleyerek, her aşamasında bana destek olan kıymetli Sayın Dr. Beril ERDEM TUNÇDEMİR'e,

Tez dönemim boyunca ne zaman yardıma ihtiyacım olsa yardımlarını esirgemeyen, yüksek lisans dönemimde hayatıma giren canım arkadaşlarım Elif Merve AVCU ve Ayça BOSTANOĞLU'na

Laboratuvarda en yoğun oldukları zamanda bile en ufak sıkıntıda bana yol gösteren arkadaşlarım Dilara VAİZOĞLU, Özgür ÖZDEMİREL ve Hazal TAHRAVİ'ye

Hayatımda olmalarını hep bir şans olarak gördüğüm, zorlu dönemlerimde bana her zaman tutunacak bir el uzatan Seçilay HIZ, Erkan KÜPÇÜK ve İrem ÇONGUR'a

Son olarak bana bu hayatı sevmeyi öğreten, tüm zorlukları göğüsleyerek her daim yanımda olan annem Berrin KARADAĞ ve babam Osman DEMİR'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**BU TEZ ÇALIŞMASI HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA  
PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ FHD-2022-19959 NUMARALI PROJE  
TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR**

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. Glioblastoma Multiform (GBM).....	8
2.1.2. Kanserde Tedavi Yaklaşımları.....	10
2.1.3. Epigenetik Mekanizmaların Kansere Etkisi.....	11
2.1.4. Kanser Metabolizmasını Etkileyen Doğal Bileşikler.....	12
2.2. Polifenoller.....	13
2.2.1. Flavanoidler .....	14
2.2.2. Biochanin A (BCA) .....	15
2.2.3. Biochanin A (BCA)'nın Antikanser Özellikleri .....	16
2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Kanserdeki Rolü .....	17
2.3.1. Katlanmamış Protein Cevabı .....	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	22
3.1. Biochanin A konsantrasyonlarının hazırlanması .....	23
3.2. T98G hücrelerinin Kültürasyonu .....	23
3.3. Hücre Sayımı ve Hücrelerin Deney İçin Hazır Hale Getirilmesi .....	24
3.4. T98G hücrelerine Biochanin A uygulanması .....	25
3.5. Biochanin A Uygulama Sonrası Hücre canlılığının belirlenmesi.....	25
3.5.1. MTT Analizi .....	25



3.5.2. Triphan Mavisi Analizi .....	26
3.6. Annexin V-PE/FITC ile Akış Sitometrisi Apoptoz Tayini.....	27
3.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) .....	28
3.7.1. Invitrogen PureLink RNA Mini Kit izolasyonu .....	29
3.7.2. Qiagen Quantitect Reverse Transcription Kit ile cDNA sentezi .....	30
3.7.3. Kantitatif Real Time ile Gen İfadesinin Belirlenmesi .....	32
3.8. Abcam Fluo-8 Calcium Flux Assay ile hücre içi kalsiyum birikiminin belirlenmesi.....	33
4. SONUÇLAR.....	35
4.1. T98G Hücrelerinin Üretilmesi ve Biochanin A Uygulaması Sonuçları .....	35
4.2 Biochanin A Uygulama Sonrası Hücre canlılık testlerinin Sonuçları .....	36
4.2.1. MTT Analizi Sonuçları .....	36
4.2.2. Tripan Mavisi Analizi Sonuçları.....	37
4.3. Akış Sitometri Sonuçları.....	39
4.4. Kantitatif Real-Time PZR Sonuçları .....	40
4.5. Sitolitik Ca <sup>+2</sup> değerlerinin Sonuçları .....	42
5. TARTIŞMA .....	45
6. KAYNAKLAR .....	50
EKLER.....	57
EK 1 – Tezden Türetilmiş Bildiriler .....	57
EK 2 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu .....	58
ÖZGEÇMİŞ .....	59

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Hanahan ve arkadaşları tarafından belirlenen kanserin ayırt edici özellikleri ile aktifleştirici özelliklerinin şemaları. ....	4
Şekil 2.2 Glioblastoma multiform (GBM) hücrel oluşumu ve heterojenliği gösterimi.....	10
Şekil 2.3 Flavonoidlerin alt sınıfları, yapısı ve besin kaynakları... ..	15
Şekil 2.4 Genistein ve Biochanin A moleküllerinin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.5 BCA'nın antikanser etkisinin şeması. →, doğrudan stimülasyon; ⊥, doğrudan inhibisyon.....	17
Şekil 2.6 Endoplazmik Retikulum Yapısı.....	18
Şekil 2.7 Katlanmamış Protein Cevabının üç kolu.....	21
Şekil 4.1. T98G hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri.....	35
Şekil 4.2. 50 ve 100 µM Biochanin A ve uygulaması yapılmış T98G hücrelerinin sonra 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası ışık mikroskobu görüntüleri.....	36
Şekil 4.3. 50 ve 100 µM Biochanin A uygulaması sonrası 24 ve 48 saat inkübe edilen hücrelerde MTT testi sonuçlarını gösteren grafiği .....	37
Şekil 4.4. 50 ve 100 µM Biochanin A uygulaması sonrası 24 ve 48 saat için elde edilen triphan mavisi analiz grafiği .....	38
Şekil 4.5. T98G hücrelerine Biochanin A uygulaması sonrası Annexin V-PE/FITC kiti kullanılarak gerçekleştirilen akış sitometrisi deneyi sonuçları.....	39
Şekil 4.6 Biochanin A uygulaması yapılan T98G hücrelerine ait yüzde ortalama apoptoz ve nekroz oranları.....	40
Şekil 4.7. Agaroz jelde yürütülmüş PCR örneklerinin görüntüleri .....	41
Şekil 4.8 T98G hücrelerine Biochanin A uygulaması sonrası RealQ Plus 2x Master Mix Green kiti kullanılarak gerçekleştirilen kantatif real-time PCR deney sonuçları.....	42
Şekil 4.9 Carbachol ile uyarılan T98G hücrelerindeki hücre içi kalsiyum miktarı.....	43
Şekil 4.10 Çizelge 4.3'deki verilerin grafik halinde sunulması.....	44

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneysel Çalışmalara Göre Kullanılan Hücre Miktarları ve Deney Koşulları.....	24
Çizelge 3.2 Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu bileşenleri.....	30
Çizelge 3.3 Reverse Transkripsiyon reaksiyonu bileşenleri.....	30
Çizelge 3.4. ER stresi ile ilişkili genlerin ifadelerini qPCR deneyi ile belirlemek için kullanılan primer dizileri.....	31
Çizelge 3.5 Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyon Koşulları.....	32
Çizelge 3.6 Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green kit bileşenleri .....	33
Çizelge 4.1. Biochanin A konsantrasyonları için MTT uygulamasının % sonuçları.....	36
Çizelge 4.2. Biochanin A konsantrasyonları için triphan mavisi analizi % Sonuçları.....	38
Çizelge 4.3 Biochanin A ile uyarılmış T98G hücrelerinin oluşturduğu hücre içi Ca <sup>+2</sup> miktarları.....	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

%	Yüzde
μ	Mikro
°C	Santigrat derece
α	Alfa

### Kısaltmalar

μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ATF4	mRNA kodlayan transkripsiyon faktörü 4
ATF6	Aktif transkripsiyon faktör 6
B2M	Beta-2 mikroglobulin
BAK	BCL-2 homolog antagonistini
BAX	BCL-2 ile ilişkili X proteini
BCA	Biochanin A
BCL-2	B hücreli lenfoma-2 protein ailesi
bç	Baz çifti
BiP / GRP78	78-kDa glukoz düzenleyici protein veya BiP
BT	Bilgisayarlı tomografi
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum
CBTRUS	Amerika Birleşik Devletleri Merkezi Beyin Tümörü Kayıt Sistemi

CDK	Sikline bağımlı kinaz
CKI	CDK inhibitörleri
DED	Ölüm efektör alanı
DER	Ribozom içermeyen düz endoplazmik retikulum
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DISC	Ölüme neden olan sinyal kompleksini
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSÖ	Dünya sağlık örgütünün
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
Ef1a	Alfa-Ökaryotik translasyon uzama faktörü 1
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
eIF2 $\alpha$	Ökaryotik başlatma faktörü 2 alfa
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	ER ile ilişkili bozunma
F	İleri primer
FADD	Fas ile ilişkili ölüm alanı
Fas-L	Fas ligandı
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Floresein izotiyosiyanat
g	g-kuvveti
G	Geri primer
GADD153/ CHOP	DNA hasarını indükleyen gen-153
GBM	Glioblastoma Multiform

GER	Ribozomla kaplı granüllü endoplazmik retikulum
GQC	Golgi kalite kontrol
GRP94	Glukozla Düzenlenen Protein 94
HDAC	Histon deasetilazın
HO-1	Heme oksijenaz 1
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın
IDH1	İzositrat dehidrogenaz 1
IRE1	İnositol gerektiren enzim 1
KBB	Kan-beyin bariyerini
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
M	Molar
MCAO / R	Orta serebral arter tıkanıklığı ve reperfüzyon
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MMP-2	Matriks metallopeptidaz-2
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	Metiltiazol Difenil Tetrazolyum
NE	Nükleer ER veya nükleer zarf
NF1	Nörofibromin 1
PDGFRA	Trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü A
PERK	PRK benzeri ER kinaz
PI	Propidyum iyodür
PMQC	Plazma membran kalite kontrolünü
PTEN	Fosfataz ve tensin homologunu

PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Geri Primer
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
RT-PZR	Gerçek Zamanlı PZR
S1P	Serin proteaz bölgesi-1
S2P	Metaloproteaz bölgesi-2
SLC7A11	Na <sup>+2</sup> bağımlı membran sistein-glutamat taşıyıcısı
TCGA	Kanser Genom Atlası
TMZ	Temozolomid
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRADD	TNF reseptörüyle ilişkili ölüm alanı
TRAIL	TNF'ye bağlı apoptozu indükleyen ligand
UPR	Katlanmamış protein yanıtı
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörünü
WA	Withaferin A
XBP-1	X-box bağlayıcı protein-1

# 1. GİRİŞ

Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) verilerine göre kanser önde gelen ölüm nedenlerinden biridir [1]. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'na (IARC) göre, 2018'de 17 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmıştır ve kanser kaynaklı 9,5 milyon ölüm yaşanmıştır. 2040 yılına kadar, küresel nüfus yaşlanması ve büyümesi nedeniyle 27,5 milyon yeni kanser tanısı konulacağı ve 16,3 milyon kanser kaynaklı ölüm yaşanacağı öngörülmektedir[2]. Kanser, hücre sağkalımı, proliferasyon ve DNA onarımı gibi hücrenin yaşamsal sürecini kontrol eden önemli yolların düzensizliği sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır [3]. Normal bir hücrenin tümör hücresine dönüşümü, ilerlemesi ve metastaz süreci, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde oluşan genetik ve epigenetik değişiklikler ile çevresel faktörlerin maligniteyi indüklemesiyle gerçekleşir [4]. Kanser için geleneksel tedavi yöntemleri kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapidir. Ancak, kullanılan tedavi yöntemlerinin seçici olmaması ve yüksek doz gereksinimi, farklı tedavi yöntemlerinin araştırılmasına sebebiyet vermiştir. Farklı bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin, aralarında kanserin de bulunduğu çeşitli rahatsızlıklara karşı terapötik ve antikanser etkisinin olduğu bilinmektedir [5]. Epigenetik değişiklikler, DNA dizisinde herhangi bir değişikliğe neden olmadan gen ifadesini etkileyen kalıtsal değişikliklerdir. Gen ifadesi ve kromozomal stabilite ile ilişkili rolü nedeniyle, epigenetik bozulmalar kanser başta olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Epigenetik değişikliklerin doğası gereği geri dönüşüm potansiyelinin olması kanser ve çeşitli hastalıklar için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır [6]. Polifenol ailesindeki en büyük ikincil metabolit grubu olan flavonoidlerin, biyolojik aktiviteleri sayesinde sağlığa yararlı oldukları ve hastalık riskini azalttıkları bilinmektedir. Kanser tedavisine yönelik olarak flavonoidler, özellikle epigenetik modifikasyonlar üzerindeki etkileri nedeniyle güncel araştırmalarda kullanılan doğal bileşikler arasında yer almaktadır. Bunlara örnek olarak brokoli ve diğer bazı bitkilerde bulunan Kaempferol, çeşitli kanserlerde histon deasetilazın (HDAC) aktivitesini düzenlemesi veya yonca, soya gibi bitkilerde bulunan Biochanin A'nın DNMT enzimlerini inhibe etmesi verilebilir [7]. Glioblastoma Multiforme (GBM), yüksek malignitesi, düşük sağ kalım oranı ve yüksek nüks riski ile karakterize olan bir merkezi sinir sistemi tümörüdür. Glioblastomalar primer malign beyin tümörlerinin %57,3' ünü oluşturur ve yaklaşık 5 yıl olan sağkalım süresi tanı konulduktan sonra %6,8'dir[8]. Günümüzde GBM'un standart tedavisi temozolomid (TMZ) kemoterapisi ve radyasyon



tedavisi ile tümörün cerrahi olarak çıkartılmasıdır. Ancak GBM'nin heterojenitesi, bu tedavilerin etkisini ciddi derecede azaltmaktadır. Bu nedenle klinik öncesi araştırmalarda anti-GBM özellikleri gösteren, diyetle alınabilen flavonoidler alternatif bir tedavi yöntemi olarak araştırılmaktadır[9].

Tez çalışmasında güncel tedavi yöntemleri arasında araştırılan doğal bileşiklerden biri olan Biochanin A kullanılmıştır. Biochanin A uygulamasının T98G glioma hücre hattında ER stresi ve hücre canlılığı üzerindeki etkisi,apoptoz analizi, hücre için  $Ca^{+2}$  ve ER stresi ile ilişkili olan bazı genlerin (*GRP78*, *eIF2S1*, *ATF4*, *GADD153*, *XBPI*) ekspresyon seviyelerine bakılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

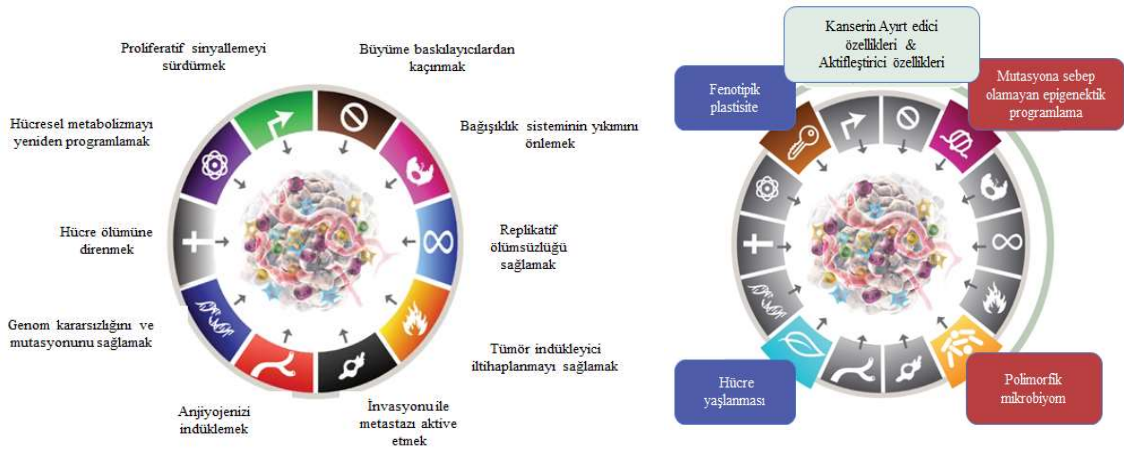
### 2.1 Kanser

Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) verilerine göre kanser, 2020'de yaklaşık 10 milyon ölüme sebep olması nedeniyle dünya genelinde en önemli hastalıklardan birisi olarak belirlenmiştir. Kanser normal bir hücrenin, genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle meydana gelen mutasyonlar ve değişiklikler sebebiyle normal işlevini kaybetmesidir ve küçük bir lezyon oluşumundan tümör hücresine kadar uzanan çok aşamalı bir süreç ile oluşmaktadır. Kanser, büyüme hızına, invaziv olmasına, prognozuna ve tedaviye verilen yanıtı göre farklı özelliklerde ortaya çıkabilmektedir[1]. DSÖ ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) topladığı veriler ile kansere neden olan etmenleri sınıflandırmıştır. Bu veriler, kanserin ortaya çıkmasında rol oynayan genetik faktörler ile üç dış etkenin arasındaki etkileşimin önemini vurgulamaktadır. Bu etkenler arsenik, tütün dumanı, alkol ve aflatoksin gibi kimyasal kanserojenler; ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel kanserojenler ve son olarak bazı virüslerden, parazitlerden veya bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonlar gibi biyolojik kanserojenler olarak sıralanabilirler [1,10].

Kişinin yaşı arttıkça kansere yakalanma riski çarpıcı bir şekilde artmaktadır. Yaşı artışı ile hücresel onarım mekanizmalarının daha az etkili olma eğilimi, hücre içerisindeki mutasyonların onarılamamasına sebebiyet vermektedir. Kanser riskini arttıran bir diğer faktör ise ailesel kalıttır. Genetik değişikliklerin ebeveynden çocuğa geçmesi, bazı kanser türlerinin popülasyona oranla ailelerde daha sık görülme olasılığını arttırmaktadır[11]. Ayrıca, DSÖ'nün 2020 verilerine göre kanser ölümlerinin üçte biri tütün ve alkol tüketimi, yüksek vücut kitle indeksi ve fiziksel aktivite eksikliğinden kaynaklanmaktadır [1]

2000 yılında kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri, Hanahan ve arkadaşları tarafından hücre temelinde yarattıkları fenotipik ve genotipik değişikliklere göre ayrılmıştır. Bu çalışma ile kanserin altı ayırt edici özelliği ortaya konulmuştur. Bunlar; proliferatif sinyalizasyonu sürdürmek, replikatif ölümsüzlüğü sağlamak, hücre ölümüne direnmek,

büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, anjiyogenezini indüklemek ve invazyon ile metastazı aktive etmektir. Sıralanan özelliklere ek olarak Hanahan ve arkadaşları, kanserin ayırt edici özelliklerini aktifleştiren veya aktifleşmesinde rol oynayan özellikleri de belirlemişlerdir. Genom bütünlüğünü korumak için bir veya daha fazla mekanizmanın kaybı sonucunda çoklu mutasyonların elde edilmesi aktifleştirici bir özellik olarak tanımlanmıştır [12]. 2011 yılında, hücresel metabolizmayı yeniden programlamak ve bağışıklık sisteminin yıkımını önlemek de kanserin ayırt edici özelliklerine eklenmiştir. Ayrıca tümör indükleyici enflamasyon, aktifleştirici bir özellik olarak tanımlanmıştır [13]. Yakın zamanda, fenotipik plastisite ve bozulmuş farklılaşma kanserin ayırt edici özelliklerine eklenirken mutasyona sebep olmayan epigenetik programlama, polimorfik mikrobiyom ve hücre yaşlanması aktifleştirici özellikler arasında tanımlanmıştır (Şekil 2.1) [14].



Şekil 2.1 Hanahan ve arkadaşları tarafından belirlenen kanserin ayırt edici özellikleri ile aktifleştirici özelliklerinin şemaları [14] kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır.

Hücre döngüsü, bir hücrenin büyümesi ve bölünmesi ile meydana gelen olaylar dizisidir. Bu döngü, dört farklı evreden oluşmaktadır ve üç farklı kontrol noktası ile denetimi sağlanmaktadır. Hücre döngüsü kontrolü, temel olarak iki olay akışını düzenler; genomik DNA'nın replikasyonu ve replike edilmiş genomik DNA'nın yavru hücreler arasında ayrımı. Yapılan çalışmalar doğrultusunda, kanser hücrelerinin bölünmeye devam

edebilmesi için hücre döngüsü kontrol noktalarının belirli işlevlerini yapamıyor olması gerektiği bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada, kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünmesinden ziyade hücre döngüsünden çıkma yeteneklerini kaybederek, bölünmeye devam ettikleri gözlemlenmiştir[15].

Hücre döngüsü iki ana evreden oluşmaktadır; interfaz ve mitotik evre. İnterfaz evresi G1, S (sentez) ve G2 fazlarından oluşmaktadır. Mitoz evresi M fazından oluşmaktadır. Mitozun ilk evresi, beş aşama ile hücre çekirdeğinin bölünmesinden oluşmaktadır. İkinci evresi ise, sitokinez ile sitoplazmasının bölünerek iki yavru hücre oluşturmasıdır. Hücre döngüsünün ilerlemesi, önceki döngünün uygun bir şekilde tamamlanmasına bağlıdır. Hücreler belirli ekstraselüler sinyallerin yokluğunda G0 fazına girebilir. G0 fazında olan bir hücre, metabolik olarak aktif haldedir ancak hücre döngüsünden çıkmıştır ve durgun bir evrededir[15, 16].

Hücreler G1 fazına, M fazından ya da G0 fazından girebilmektedir. G0 fazından G1 fazına geçişi ise hücre dışı mitojenik sinyaller ile gerçekleşmektedir. G1 aşaması büyüme fazı olup hücreler birçok proteini sentezler ve ribozom ve mitokondri de dahil olmak üzere organeller çoğaltır. Hücre boyut olarak büyürken G1 fazında çevreden gelen sinyaller, hücrenin gelişimini kontrol etmektedir. Gelen sinyallere bağlı olarak hücrede çoğalma ve bölünme, farklılaşma veya ölüm kararı verilebilir ancak bölünme için hücrenin kontrol noktasından geçerek S fazına gelmesi gerekmektedir[17]. S fazında, DNA sentezi gerçekleşmektedir. Her kromozom, replikasyon sonrası iki kardeş kromatidden oluşur ve DNA miktarı iki katına çıkar. S fazı boyunca, gen ifadesi ve protein sentezi aktiviteleri düşük seviyede devam etmektedir. S fazı kontrol noktasında, eğer DNA hasarlı ise veya replikasyona bağlı bir hata var ise hasarlı DNA'nın replikasyonunu önlemek için, hücrenin kontrol noktasından geçişi engellenir[18].

Hücre S fazını tamamladıktan sonra, G2 fazında kendini mitozu hazırlar. G2 fazında hücrede önemli proteinler ve lipit sentezi ile hücre büyümesi gerçekleşmekte olup bu evrede G2/M kontrol noktası bulunmaktadır. DNA çift zincir kırıkları, bu kontrol noktasında hücre mitoz evresine geçmeden önce onarılmaktadır[19]. M fazı, mitoz evresi ve hücre sitoplazmasının bölünerek iki yavru hücre oluşturulduğu sitokinez evresinden

oluşmaktadır. Mitoz evresinin ilk aşaması profazdır. Profaz aşaması, kromozom yoğunlaşması, sentrozom ayrımı ve çekirdek membran parçalanması ile karakterize edilmektedir. Sentrozomun iki zıt kutba göçü ve iğ ipliklerinin oluşumu sonraki adımlar için önemlidir. Prometafaz aşamasında çekirdek zarfının parçalanması tamamlanır. Mikrotübüllerin ve iğ ipliklerinin oluşumu ile kardeş kromatidler, kinetokor adı verilen proteinlerle iğ ipliklerine bağlanır[19,20]. Metafaz aşamasında, kardeş kromatidler, kinetokor mikrotübülleri tarafından metafaz düzleminde sıralanmaktadır. Devamında gelen anafaz aşamasında, kardeş kromatidler birbirlerinden ayrılarak, iğ iplikleri tarafından hücrenin kutuplarına doğru çekilmektedir. Telofaz aşamasında ise kromozom yoğunlaşması ve çekirdek zarfının oluşumu ile kromozomlar etrafında hücre zarı oluşmaktadır. Mitotik evrenin ikinci evresi olan sitokinez evresinde hücre sitoplazması ayrılarak, iki yavru hücre oluşmaktadır[19].

Hücre döngüsünde, fazlar arası geçiş, serin/treonin kinazlar, siklin bağımlı kinaz (CDK) ailesi, siklinler, CDK inhibitörleri (CKI) ve retinoblastom protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. Hücre döngüsünün ilerlemesini CDK'ın siklinlerle veya CKI ile bağlanması sonucunda, aktif veya inaktif olma durumu kontrol etmektedir. CDK'ların ve CKI'ların aksine siklin seviyeleri sentez ile değişmektedir ve bu sayede siklinler CDK'ları, döngüsel olarak aktive edebilmektedir [21]. 20'den fazla CDK tanımlanmıştır. Bunlar arasında CDK 1, 2, 4 ve 6, hücre döngüsü ilerlemesinin düzenleyicileri olarak önemli rol oynamaktadır. Memeli hücrelerinde CDK 1, hücre döngüsü ilerlemesi için gerekli olan tek CDK'dır. Bunun nedeni ise CDK 1'in, hücre döngüsü ilerlemesi için gerekli olan tüm temel siklinlerle kompleksler oluşturabilmesidir. Aynı zamanda CDK 1, diğer CDK'ların yokluğunda hücre döngüsünün ilerlemesini negatif olarak düzenleyen bir tümör baskılayıcı protein olan Retinoblastom proteinini (pRb) döngünün farklı aşamalarında kısmen fosforile ederek hücre bölünmesini devam ettirmektedir [22, 23]. Hücre döngüsünde bahsi geçen G1/S, G2/M ve M kontrol noktalarında DNA replikasyonunun doğruluğu, kromozomların düzgün ayrılıp ayrılmadığı ve hasar varsa tamir edilip edilmediği test edilir. Bu sayede, normal çoğalan hücrelerde onarım mekanizmalarının devreye girmesine olanak sağlanarak mutasyonların birikmesi ve kromozomal anomalilerin sayısının artması engellenmiş olur ancak, DNA veya kromozomal hasar onarılamayacak kadar ciddi ve şiddetliyse, hücre ikinci bir savunma olarak programlanmış hücre ölümünü başlatır [24].

Apoptoz, programlanmış bir hücre ölüm mekanizması olup gereksiz veya zararlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Apoptotik yolun aktive olabilmesi için DNA hasarı veya kontrolsüz hücre çoğalması gibi çeşitli koşulların mevcut olması gerekmektedir. Apoptotik yolun aktivasyonu ve süreci, hücre içi ve hücre dışı sinyaller ile yönetilmektedir. Aktivasyon süreci iki yol üzerinden gerçekleşmekte olup bunlar sinyal türüyle ilişkili iç ve dış yollar. İç yol mitokondriyal olarak adlandırılırken, dış yol ölüm reseptörü olarak adlandırılır [25]. Başarılı bir apoptoz için bir sistein sınıfında yer alan kaspazlar, çeşitli proteinleri parçalamak için gereklidirler. Kaspazlar başlatıcı ve efektör olarak iki gruba ayrılmaktadır. Başlatıcı kaspazlar, dört kaspazdan oluşmaktadır; kaspaz 2, 8, 9 ve 10. Kaspaz 3,6 ve 7 ise efektör kaspazlardır. Cellat kaspazları hedef proteinleri keserek, hücrenin ölümüne yol açar[25].

Apoptozun içsel yol mekanizması mitokondriyi ve mitokondriyal proteinleri kullanmaktadır. İçsel yol, ifadesi artmış onkogenler veya hasarlı DNA'ya sahip hücreler tarafından uyarılabilmektedir. Büyüme faktörü yoksunluğu, fazla  $Ca^{+2}$  miktarı veya DNA'ya zarar veren moleküller, içsel yol aktivasyonunu gerçekleştirmektedir[26]. İçsel yol, B hücreli lenfoma-2 (BCL-2) protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. Proapoptotik BH3 proteinlerinin apoptotik uyarımlar sonucu ifadesi artar ve BCL-2 ile ilişkili X proteini (BAX) ile BCL-2 homolog antagonistini (BAK) aktive eder[25]. Tümör baskılayıcı olarak geçen p53 tarafından BAX düzenlenir. BAX ve BAK aktivasyon sonrası oligomerize olur ve bu sayede mitokondriyal dış zar geçirgenleşmesine (MOMP) sebep olur. MOMP, sitokrom c ve kaspazın, ikinci SMAC gibi zarlar arası proteinlerin geçişine olanak sağlar. Sitokrom c salımını ile beraber apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1), dATP ve prokaspaz-9 birleşerek apoptozomu oluşturmaktadır. Prokaspaz-9, apoptozom içinde kaspaz-9'a dönüşür ve cellat kaspazları olan kaspaz 7 ve 3'ü aktive eder. Cellat kaspazları proteinlerin yıkımını sağlayarak, hücre ölümünü gerçekleştirmektedir[26, 27].

Apoptozu indüklemekte kullanılan bir diğer yol ise hücre dışı sinyal yoludur. Hücre ölümü sinyalleri (ölüm ligandları), tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi ölüm reseptörlerine bağlanmaktadır. Ölüm reseptörlerinde, Fas ligandı (Fas-L), TNF'ye bağlı apoptozu

indükleyen ligand (TRAIL) ve TNF bulunmaktadır. Ölüm reseptörüne, Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ve TNF reseptörüyle ilişkili ölüm alanı (TRADD) bulunan bir adaptör proteini bağlanır. Başlatıcı prokaspazlar 8 ve 10, adaptör proteinine bağlanarak ölüme neden olan sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Prokaspazlarda bulunan ölüm efektör alanı (DED), adaptör proteininin ölüm efektör alanına bağlanır. DISC, prokaspaz 8 ve 10 tarafından aktif hale getirilir. Cellat kaspazları 3,6 ve 7 aktive edilerek hem proteinleri hem de hücre iskeletini keserek, hücrenin ölümüne yol açar[28, 29].

### 2.1.1 Glioblastoma Multiform (GBM)

Glioblastom, ABD ve Avrupa ülkelerinde en sık görülen primer merkezi sinir sistemi (MSS) tümörüdür [30]. Amerika Birleşik Devletleri Merkezi Beyin Tümörü Kayıt Sistemi (CBTRUS) verilene göre 2020'de primer malign beyin ve diğer MSS tümörlerinin dünya çapındaki insidans oranı her 100.000 kişide 3,5'tir [31]. Gliomlar, glial hücreler tarafından üretilen MSS tümörleri olarak tanımlanırlar. Glioblastoma multiform (GBM), beynin en yaygın ve en kötü huylu primer tümörlerinden biridir. En yaygın primer malign beyin kanseri olarak kabul edilen GBM multimodal tedavinin varlığına rağmen kötü prognoz ile karakterizedir. Cerrahi rezeksiyon, lokal radyoterapi ve sistemik kemoterapiyi içeren tedaviye rağmen tanı sonrası ortalama sağkalım süresi sadece 12 aydır [30,32].

DSÖ, glioma tümörlerini morfolojik olarak grade I-IV olarak sınıflandırır. Grade I iyi huylu tümörler sınıfını içerir ve derecesi arttıkça tümörlerin agresifliği artmaktadır. Bu sınıflandırma hücrenin anaplazma derecesine bağlı olarak beş kritere ayrılmaktadır; hücresel yoğunluk, nükleer atipi, mitoz, nekroz ve endotel proliferasyon. GBM bu derecelendirmeye göre grade IV sınıfındadır. Grade IV ise hücresel yoğunluğun yüksek olması, nükleer atipinin ve yüksek mitotik aktivitenin belirgin olması, endotel proliferasyon ile nekrozun mevcut olması ile karakterize edilmiştir[33].

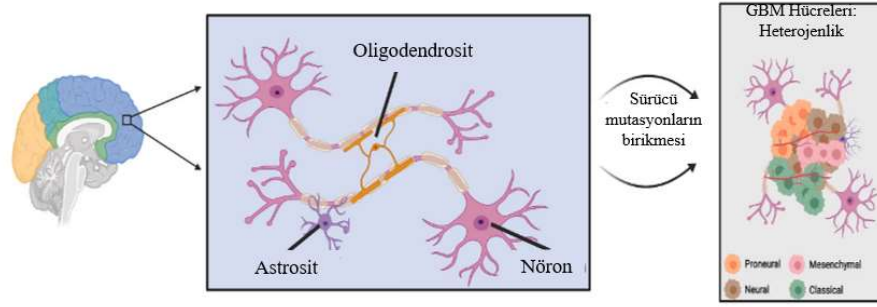
GBM primer ve sekonder olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Primer GBM tanısı yaşlı hastalarda daha fazla görülmektedir ve var olan bir tümörün değişime uğramasından oluşmazlar (*de novo*). Sekonder GBM'ler daha az yaygındır ve grade II (düşük dereceli diffüz astrositom) veya III (anaplastik astrositom)'ten kalan gliomalardan nüks ederler.

Sekonder GBM'lerin çoğu genç hastalarda görülmekte olup (<45 yaş), primer GBM'lere göre daha iyi prognoza sahiptir. Hastalık insidansı yaşla birlikte artmaya devam etmektedir ve tanıdaki ortalama yaş 64 olarak belirlenmiştir [34, 35].

GBM teşhisi konmuş hastalarda en sık görülen semptomlar; ilerleyici baş ağrıları, nöbetler ve odaksal nörolojik eksikliklerdir. GBM tanısı için bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI) taraması yapılmaktadır. Eğer hasta GBM'ye sahip ise MRI'da kullanılan gadolinyum kontrastı ile GBM vakalarına özel düzensiz bir nekroz merkezi görülür. DSÖ sınıflandırma sistemine göre bir beyin tümörünün grade IV olması için bu nekroz varlığı gerekmektedir. GBM vakaları multifokal (ikiden fazla lezyon), uzak fokaller (primer lezyona bitişik olmayan ikinci lezyon) veya yaygın hastalık olarak ortaya çıkabilmektedir[36].

GBM vakalarının neden ortaya çıktığı günümüzde hala kısıtlı olan bir bilgidir. GBM olumunda üç farklı mekanizmanın tümör oluşumuna katkı sağlayabileceği bilinmektedir. Bu üç mekanizma alerji, ailesel kalıtım ve çevresel faktörlerdir [37]. Ayrıca, nöral kök hücrelerin, astrositlerin ve öncü oligodendrositlerin GBM oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir [38]. Bu hücreler sürücü mutasyon birikmesi ile tümör içi ve tümörler arası heterojeniteyi oluşturmaktadır. Kanser Genom Atlası (TCGA) veri tabanı GBM'leri genetik ve epigenetik özelliklerine göre dört sınıfa ayırmıştır; mezenkimal, klasik, pronöral ve nöral[39]. Mezenkimal GBM'ler nörofibromin 1 (NF1), fosfataz ve tensin homologunu (PTEN) ve TP53 tümör baskılayıcı gen mutasyonları ile karakterize edilmiştir. Klasik GBM'ler epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'nin ifade artışı ile karakterize edilirler ve hücre proliferasyonları oldukça yüksektir bu tümörlerde TP53 mutasyonu yoktur. Pronöral GBM'ler de izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) ve trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü A (PDGFRA) ile ilişkilendirilmektedir. Nöral GBM'ler beynin normal kanserli olmayan nöronlarında bulunan birçok gen ile karakterize edilmektedir (Şekil 2.2.) [40].





Şekil 2.2 Glioblastoma multiform (GBM) hücresel oluşumu ve heterojenliği gösterimi. Nöral kök hücreler, astrositler ve öncü oligodendrositler GBM oluşumunun hücresel kökeni olduğu düşünülmektedir. GBM tümör içi ve tümörler arası heterojenliği ile karakterize edilmektedir. Bu nedenle dört alt gruba ayrılmaktadır; mezenkimal, klasik, pronöral ve nöral. [40] kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır.

### 2.1.2 Kanserde Tedavi Yaklaşımları

GBM tedavisinde en temel zorluklar tümörün yeri ve karmaşık heterojen biyolojisidir. Cerrahi yaklaşımlar, radyoterapi ve kemoterapi tedavileri, GBM hastalarının sağ kalımında ve yaşam kalitelerinde kademeli iyileşme göstermiştir; ancak prognoz açısından hala verimli sonuçlar alınmamıştır. Cerrahi yaklaşımın, tümör tipine bağlı olarak tümör yükünün azaltılması, lokal terapötik ajanın uygulanması ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi gibi birçok yönü bulunmaktadır. Fakat, GBM cerrahi yöntemler ile tamamen tedavi edilememektedir. Sahip olduğu invaziv özelliğinden dolayı, vakaların %80'inde orijinal lezyonun kenarından 2-3 cm içerisinde, nüks meydana getirmektedir. Cerrahi müdahaleyi takiben yapılan radyoterapinin yüksek dereceli gliomalarda yaşam beklentilerini yükselttiği görülmüştür. Bazı tümörlerin radyasyona karşı direnci ve radyasyona bağlı kalıcı nöronal hasar, radyoterapinin verimliliğini sınırlamaktadır. GBM tedavisinde, kemotörpik ajan olarak Temozolomid (TMZ) kullanılmaktadır. TMZ dışında, klinik çalışmalarda kullanılan diğer alkilleyici ajanlar hem yüksek seviyede toksisite hem de erken direnç gelişimi göstermektedir. TMZ'nin sitotoksitesinden sorumlu ana mekanizma, DNA'nın yapısında bulunan guanin bazı üzerindeki, N7 ve O6 konumunun metillenmesidir. Bu metilleme ile DNA yanlış eşleşme onarım mekanizması, metillenmiş guanin için tamamlayıcı bir baz bulamaz ve DNA'da çentikler oluşur. Hücre döngüsü, G2-M kontrol noktasında bloke olur ve hücre apoptoza girer [41].

### 2.1.3 Epigenetik Mekanizmaların Kansere Etkisi

Epigenetik, 1942 yılında Conard Waddington tarafından, çevresel etkiler ile uyarılan fenotip modifikasyonları olarak tanımlanmıştır [42]. Epigenetik, DNA dizisindeki değişikliklerden bağımsız, çevresel faktörlerin tetiklenmesi ile oluşan fenotipik düzenlemelerdir. Epigenetik değişiklikler, çoğunlukla geri dönüşümlü olmakla beraber, bu değişiklikler gen ifadelerinin aktifleşmesine veya sessizleşmesine sebep olmaktadır. Epigenetik mekanizmaların çeşitli kanser tiplerinde ve Frajil X sendromu gibi birçok hastalıkta rolü olduğu bilinmektedir[43,44] . Epigenetik mekanizmalar, üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar; histon modifikasyonları, kodlanmayan RNA'lar ve DNA metilasyonudur[45].

Kanser ve epigenetik arasındaki bağlantı, DNA metilasyonu ve gen ifadesi ile ilgili çalışmalar sırasında keşfedilmiştir. DNA metilasyonu memelilerde düzenleyici bölgelerde, sentromerlerde, telomerlerde, inaktif X kromozomlarında ve tekrarlanan DNA dizilerinde görülen bir mekanizmadır. Malign hücre genomunda, yaygın olarak hipometilasyon (gen ifadesinin aktivasyonu) gözlenir de özellikle promotör bölgelerdeki CpG adacıklarında, hipermetilasyon (gen ifadesinin inaktivasyonu) varlığı da bilinmektedir. CpG adası metilasyonu, transkripsiyonel düzenlemede önemli bir rol oynar ve malign transformasyon sırasında bazı genlerde gerçekleşir. Örneğin, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücre adhezyonu gibi görevleri olan, *APC* proteininin hipermetilasyon ile inaktivasyonu, akciğer, meme ve kolorektal kanserlerine neden olmaktadır [46] Histon modifikasyonlarında asetil grubunun, histon lizin kuyruklarına eklenmesi, kromatinin sahip olduğu formu değiştirebileceği gibi, aynı zamanda hücre içi pH'ı da düzenler. Yapılan çalışmalarda, tümör hücrelerinin düşük histon asetilasyonuna sahip olmasıyla beraber hücre içi pH'ının da düşük olduğu tespit edilmiştir. Özellikle, H4 histonunda lizin 16 asetilasyon kaybı ve yine H4'te lizin 20'nin trimetilasyonu çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir[47,48]. Kanser hücrelerinde ncRNA'ların birçok varyasyonu ve RNA modifikasyonu bulunmaktadır. Özellikle anormal miRNA'lar, çoğu kanser türünde bulunmaktadır. Onko-miRNA'lar (örneğin miR-21, miR-210, vb.), onkogenlerin aktivasyonu ile tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasını hedefleyerek kanser hücrelerini indüklemektedir. Buna karşılık tümör baskılayıcı miRNA'lar (örneğin miR-34 ailesi) kanserlerde tam tersi işlev göstermektedir [49].miRNA'ların ve

lncRNA'ların düzensizliği, kanser patogenezi ile ilişkilidir ve bu ilişki lncRNA'ların kansere bağlı genlerin düzenleyicileri olarak işlev gösterdiği bilinmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalar, anormal sinyal iletiminin lncRNA düzensizliğini indüklediğini göstermiştir [50].

Kanser insidansı, dünyanın farklı bölgeleri arasında değişmektedir. Gözlemsel olarak yapılan çalışmalarda, beslenme ve yaşam tarzının önemli bir risk faktörü olduğu öne sürülmektedir. Bu gözlemler ile kansere bağlı birçok ölümün, diyet veya beslenmedeki değişiklikler ile önlenebileceği tahmin edilmektedir. Aynı zamanda yapılan araştırmalar, beslenme diyetinin hücrenin epigenetik modifikasyonunu yani hücrelerin anormal veya değiştirilmiş gen ekspresyon modellerinin önemli bir modülatörü olduğu düşünülmektedir[51].

#### **2.1.4 Kanser Metabolizmasını Etkileyen Doğal Bileşikler**

Doğal bileşikler olan flavonoidler, kan-beyin bariyerinden (KBB) hücre içi taşımayla ya da endotel hücreleri arasındaki bariyer yoluyla difüze olabilirler. Her iki difüzyon türünde, moleküler boyutu küçük olan flavonoid moleküllerin geçişine izin vermektedir. Bazı flavonoidlerin, GBM üzerindeki etkisi hücre kültürü çalışmaları ile gösterilmiştir[52].

Quercetin; brokoli, soğan gibi çeşitli sebzelerde bol bulunan bir flavonoiddir ve güçlü bir antikanserojen flavonolu olarak kabul edilmiştir. Quercetin, tirozin kinaz inhibitörüdür ve kanserde MAPK/ERK 1 ve Raf1 kinaz aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda, U87 ve U251 glioblastoma hücre hatlarında kemoterapiye direnç sağlayan, ırsı şoku proteini 27'nin ifadesini baskılayarak hücreleri temozolomidinin sitotoksik etkilerine karşı hassaslaştırmaktadır. C6 glial hücreleri ile yapılan çalışmalarda, ırsı şoku protein ailesine ait olan heme oksijenaz 1 (HO-1) indüklenmesi ile apoptoz inhibe edilmiştir. Quercetin insan glioblastoma multiform T98G hücrelerinde ise apoptozu indüklemiştir. T98G hücrelerinde, Quercetin uygulaması kaspaz 3 ve 9'un aktivasyonuna, sitokrom C'nin mitokondriyenin salınmasına ve mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalmaya yol açmaktadır[53, 54].

Genistein polifenolik bir izoflavondur ve yalnızca Leguminosa ailesi tarafından üretilir. Bol miktarda Genistein soya fasulyesinde bulunmaktadır. Genistein, meme kanseri ve

prostat kanseri gibi hormonlara bağı kanser riskini azalttığı bilinen bir fitoöstrojendir. Yapılan çalışmalarda, Genistein ve Rapamisin ile kombinasyon tedavisi sonucunda insan GBM U87 hücrelerinde Akt ve mTOR fosforilasyonunun inhibe edildiği gözlemlenmiştir. Genistein, yalnızca A172 ve ONS76 gibi radyasyona duyarlı hücrelerde hücre büyümesini durdururken KNS60 ve U251MG gibi radyasyona dirençli hücrelere etki etmemektedir. Bu durum, Genistein'in sitotoksik etkisinden ziyade kemopreventif potansiyeli olduğunu ve özellikle kombinasyon kemoterapileri için kullanılabileceğini düşündürmektedir. Genistein ile yapılmış olan başka bir çalışmada ise Genistein'nin beyin tümör hücrelerinin proliferasyonunu önlediği ve telomeraz aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur [55, 56, 57].

## **2.2. Polifenoller**

Modern beslenme multidisipliner bir alandır. Biyoloji, gıda bilimi, biyokimya ve benzeri birçok alanı kapsayan bir çalışma alanıdır. İnsanların yaşam boyu yedikleri yiyecekler, bedenlerinde potansiyel olarak bir birikime neden olmaktadır. Yiyecek seçimi, bulunabilirliği, genetik faktörler, tüketilen kalori ve enerji harcaması modern beslenme için göz önünde bulundurulması gereken faktörlerden bir kaçıdır. Biyokimya tüm beslenme etkileşimlerinin temelini oluşturur. Kişinin uyguladığı diyetin vücutla nasıl bir etkileşime girdiğini anlayabilmek için ilk olarak metabolizma, enzim etkisi ve hücrel regülasyonun anlaşılması gerekmektedir. Besinler, vücutta sindirilen ve depolanan makro besinler ve vücutta depolanan veya geçici olarak tutulan mikro besinler olarak iki ayrı kategoriye ayrılmaktadır. Makro besinler karbonhidrat, yağ ve proteinler olarak, mikro besinler ise vitaminler ve mineraller olarak sıralanırlar. Mikro besinler, vücutta depolanmayan diğer birçok bileşiği içerir ve temel biyokimyasal süreçlere doğrudan katkıda bulunmaz ancak hücreleri strese karşı korur, uzun vadeli sağlığın iyileştirilmesinde yardımcı olur[58].

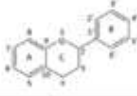
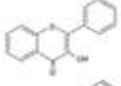
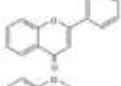
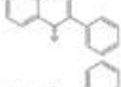
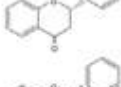
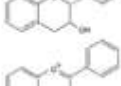
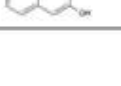
Polifenoller, mikro besin grubunda yer almaktadırlar. Sadece bitki bazlı gıdalarda bulunurlar ve bitkilerde ikincil metabolitler olarak rol oynarlar. Polifenoller, vitaminler ve omega-3 yağ asitleri gibi biyoaktif bileşikler çeşitli kronik hastalıkların önlenmesindeki rolleri nedeniyle güncel araştırılan konular arasında yer almaktadır. Polifenollerin, sadece kronik hastalıkların önlenmesi için değil aynı zamanda dejeneratif hastalıkların, kanserin, kardiyovasküler hastalıkların ve nörodejeneratif hastalıkların

önlenmesinde de rol oynadığı bulunmuştur [59]. Polifenoller, meyve, sebze, şarap, çay, sızma zeytinyağı, çikolata ve diğer kakao ürünlerinde yaygın olarak bulunurlar [60]. Polifenoller kimyasal olarak fenolik yapıya sahip bileşikler olarak bilinmektedir. Polifenollerin 8000'den fazla fenolik yapısı bulunmaktadır. Bu grup içerisinde 4000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır.

Bitkilerdeki, çeşitliliği ve geniş dağılımından dolayı, polifenoller buldukları kaynaklara, biyolojik işlevlerine ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmıştır [61]. Polifenoller, kimyasal yapılarına göre, flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olarak iki gruba ayrılır.

### 2.2.1 Flavonoidler

Flavonoidler, insan diyetinde meyveler, sebzeler, baklagiller, çay, bitter çikolata ve benzeri gıdalarda bulunurlar. Bazı gıdaların belirli bölgelerinde daha fazla bulunurlar. Örneğin meyvelerin kabuk kısımları gibi. Flavonoidlerin tüketimi ülkelerin mutfak alışkanlıklarına bağlı olarak değişebilmektedir. Örneğin, soya fasulyesi tüketimi tarihsel olarak doğu kültürleriyle ilişkilendirilmiştir ancak çay tüketimi İrlanda veya Türkiye gibi ülkelerde daha yüksektir [62]. Flavonoid tüketiminin günlük 140 grama kadar kullanılmasında toksik bir etkiye rastlanmadığı ve önemli yan etkileri olmadığı bildirilmiştir. Aynı zamanda, farmakolojik etkileri arasında antioksidan, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif, hepatoprotektif, antimikrobiyal ve antikanser özellikleri bulunmaktadır[63]. Kimyasal olarak flavonoidler, iki fenil halkası (A ve B) ve bir piran halkasından (C) oluşan 15 karbonlu difenilpropan (C6 – C3 – C6) ortak iskeleti paylaşır. Temel iskelet dışında kalan kısımlar, flavonoidlere farklı özellikler kazandırmaktadır. Flavonoidler, B ve C halkaları arasındaki bağlantıya, B halkasının yapısına ve üç halkanın hidroksilasyon ile glikosilasyon modellerine bağlı olarak farklı alt sınıflara ayrılabilirler. Bu alt gruplar ise şöyledir; flavanoller, flavanonlar, flavonlar, izoflavonlar, flavonoller ve antosiyanidinlerdir (Şekil 2.3) [64].

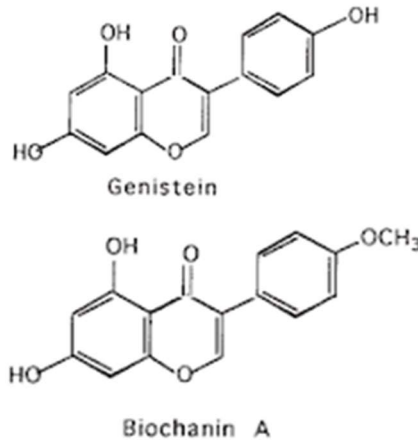
Subclass	Structure	Type	Food
			
Flavonol		Quercetin, kaempferol, galandis, myricetin	Apples, cherries, berries, onions, tomatoes, broccoli, tea, red wine
Flavone		Luteolin, apigenin, chysin	Fruits, vegetables, cereals
Isoflavone		Genistein, daidzein, glycitein	Legumes such as soybean
Flavanone		Naringenin, hesperetin, eriodictyol	Citrus fruits
Flavanol		Catechin, epicatechin, gallocatechin	Apples, red grapes, tea
Anthocyanidin		Cyanidin	Fruits

Şekil 2.3 Flavonoidlerin alt sınıfları, yapısı ve besin kaynakları[62] kaynağından alınmıştır.

### 2.2.2 Biochanin A (BCA)

Biochanin A ( $C_{16}H_{12}O_5$ ) ilk olarak Fabaceae olarak da bilinen, Leguminosae familyasından *Trifolium pretense* L.'nin yapraklarından ve gövdelerinden izole edilmiştir. Biochanin A (BCA), başta kırmızı yonca olmak üzere birçok yonca türünde ve ayrıca soya, yonca, yer fıstığı ve nohut gibi diğer bitkilerde de bulunan bir izoflavondur [65]. Aynı zamanda Genisteinin metoksi formu olarak da bilinmektedir. BCA'nın yapısı, östrojenlere benzerlik göstermektedir. İzoflavonların yapısındaki 7. ve 4. pozisyonda bulunan hidroksil grupları nedeniyle estradiole benzerlik gösterirler ve östrojen reseptörlerine bağlanabilirler. BCA'nın nöroprotektif, anti-kanser, antioksidan, anti-enflamatuar, anti-alerjik, anti-hiperglisemik ve antihiperlipidemik etkiler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özellikleri olduğu bilinmektedir (Şekil 2.4) [66]. BCA'nın çok sayıda faydalı etkisine rağmen zayıf biyoyararlanımı nedeniyle klinikte kullanımı sınırlıdır. Besinlerin biyoyararlanımı “emilebilen ve kullanıma veya depolamaya hazır bir besinin oranı” olarak tanımlanır ve besinlerin emilimini, dağılımını, metabolizmasını ve

eliminasyon kinetiğini etkileyen faktörlere bağlıdır. Tüketildikten sonra glikosile edilmiş izoflavonlar, intestinal enterositler ile karaciğerde emilir ve metabolize edilir. Çeşitli araştırmalar, flavonların insanlarda uygulandıktan sonra biyoyararlanımını  $< \% 1 \mu\text{mol} / \text{L}$  olarak bildirmiştir. Farelerde yapılan çalışmalar, düşük dozda verilen ilaçların sadece sınırlı bir kısmının sistemik dolaşımında emildiğini bu sebeple yüksek dozda oral yoldan verilmesi gerektiği göstermiştir[67].



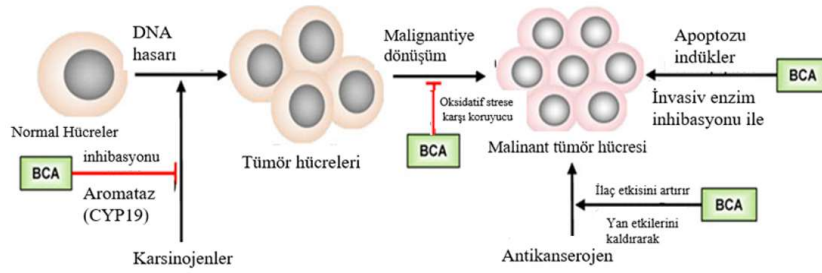
Şekil 2.4 Genistein ve Biochanin A moleküllerinin kimyasal yapısı [68]

### 2.2.3. Biochanin A (BCA)'nın Antikanser Özellikleri

Biochanin A'nın kanserojen aktivitesini inhibe ettiği ilk olarak 1988 yılında, hamster embriyosu üzerinde yapılan hücre kültürü çalışmalarında bulunmuştur [69]. Daha sonra ise BCA'nın çeşitli kanser türleri üstündeki etkisi hem hücre kültüründe hem de hayvan modellerinde araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda BCA'nın akciğer, gastrointestinal sistem, prostat, meme, pankreas ve merkezi sinir sistemi tümörlerini inhibe ettiği bulunmuştur [70].

Bazı kanser türlerinde BCA'nın kanser büyümesi üzerindeki inhibisyon etkisinin Genistein'den az olduğu gözlenmiştir [71]. Bununla beraber yapılan çalışmalar doğrultusunda BCA'nın özellikle malign beyin tümörlerinde antikanser aktivite

göstererek glioma hücrelerine toksik olduğu bulunmuştur [72] Başka bir çalışmada ise Ki-67'nin BCA tarafından inhibe edilerek, akciğer kanserinde kaspaz 3 ve kaspaz 9'un aktivasyonu ile apoptozu indükleyebileceği gözlemlenmiştir. Bununla beraber, matriks metalloproteinaz-2'yi (MMP-2) ve vasküler endotel büyüme faktörünü (VEGF) ifadesini azaltarak hücre göçünü baskılayabildiği bilinmektedir(Şekil 2.5)[70, 73]



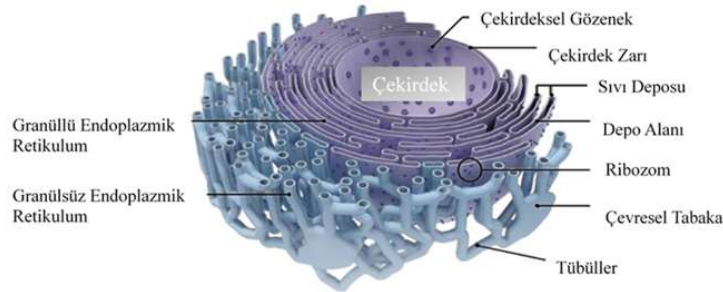
Şekil 2.5 BCA'nın antikanser etkisinin şeması. →, doğrudan stimülasyon; ⊥, doğrudan inhibisyon [70] kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır.

### 2.3 Endoplazmik Retikulum Stresi ve Kanserdeki Rolü

Endoplazmik Retikulum (ER), ökaryotik hücre içerisindeki en büyük organeldir. Nükleer ER veya nükleer zarf (NE), iki tabakadan oluşur; bunlar ise ribozomsuz düz endoplazmik retikulum (DER) ve ribozom ile kaplı granüllü endoplazmik retikulum (GER) yapılarıdır[74]. ER, sahip olduğu yapılar ile sitoplazmanın büyük bir kısmını kaplayan, uzun tübüller ve keseler halinde birbirine bağlı, ağ benzeri, labirent bir yapı halinde düzenlenmiştir (Şekil 2.6) [75]. ER zarfı, Golgi aparatı, lizozomlar, endozomlar, salgı vezikülleri ve plazma zarfı dahil olmak üzere, hücrenin çoğu organeli için tüm transmembran proteinlerin ve lipidlerin üretim bölgesidir. ER aynı zamanda karbonhidrat metabolizması, lipid ve steroid sentezi, protein sentezi ve taşınması, protein katlanması ve kalsiyum depolamasının yapıldığı bölgedir [76]. ER yapısında bulunan, ribozom içermeyen DER'in birçok işlevi vardır. Triasilgliseroller ve fosfolipitler gibi birçok lipidin sentezi için enzimler içerir [77]. Bunlarla beraber, DER sitokrom P450 enzimlerini



içerir. Sitokrom P450 enzimleri hücre zarlarında, toksik seviyelerde biriken ve suda çözünmeyen ilaçların veya metabolitlerin, hücreyi terk etmesi ve idrarla atılması için suda çözünür hale getirildiği bir dizi reaksiyonu katalize eden enzim ailesidir[78] . Ribozomla kaplı granüllü endoplazmik retikulum (GER) ise protein sentezinde rol oynar. GER zarına bağlı ribozomlar, granüllü bir görünüm sağlar. Sentezlenen proteinler, GER'un lümenine girer ve buradan veziküller halinde Golgi kompleksine taşınırlar. Golgi kompleksinde bu proteinler, lizozomlar gibi membranla çevrili organel içinde tutulup plazma zarına gömülürler veya hücreden salınırlar. Sentezlenen proteinlerin N bağlı glikozilasyonunun başlatılması gibi translayon sonrası modifikasyonlar GER'de gerçekleşir [75] .



Şekil 2.6 Endoplazmik Retikulum Yapısı [79] kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır.

Proteinler, ER'ye katlanmamış polipeptit zincirleri olarak girerler; ancak ER'deki akışları değişkendir. Akış dinamiği, çevresel koşullara ve hücrenin fizyolojik durumuna bağlı olarak değişebilir. Bu durumu kontrol etmek için hücreler, ER protein katlama kapasitesini gereksinimlerine göre ayarlar böylece hücre yüzeyinin ve salgılanan proteinlerin kalitesinin yüksek doğrulukla korunabilmesi sağlanır [80] . Fakat yeni sentezlenen proteinler, stabil değildir. Potansiyel olarak, toksik türler oluşturan, yanlış katlanma ve devamında da agregasyon oluşumuna sebebiyet verebilirler. Proteinlerin yanlış katlanmalarını önleyebilmek ve ER homeostazını koruyabilmek için kalite kontrol sistemleri vardır. Bu sistemler Golgi kalite kontrol (GQC) ve ER ile ilişkili bozunma (ERAD), plazma membran kalite kontrolünü (PMQC) içermektedir[81]. Homeostazın

bozulması, yanlış katlanmış proteinin birikmesine ve hücrede toksik etki yaratılarak, metabolik hastalıklar ve kanser gibi hastalıkların oluşmasına yol açar.

Kanser hücrelerinin çevredeki dokulara lokal olarak veya metastaz ile yayılmaları, hipoksi, düşük glukoz, büyüme faktörü eksikliği, oksidatif stres ve amino asit eksikliği gibi çeşitli stres durumları ER'da protein katlanmasının doğruluğunu azaltır. Hem kanserli hücrelerin besin ihtiyacı hem de normal koşullara göre fazla besin bulunması ER stresine neden olur. Bu birikim, ER'da metabolik ve enflamatuar tepkiler oluşmasına sebebiyet vermektedir. ER stresinin tümörler üzerinde ikili bir etkisi vardır. Tümör büyümesini artıran bir uyaran olarak görev yaparken aynı zamanda apoptozu indükleyen sitotoksik etkilere sahiptir. Kanser hücreleri, UPR aktivasyonu ile mikroçevreye uyum sağlayarak, bulunduğu ortama büyüme faktörleri ve anjiyojenik faktörler salgılayarak kanser hücresi gelişimi ve yayılması için daha uygun bir ortam yaratır [82, 83].

### **2.3.1 Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)**

UPR üç sinyal yolağından oluşmaktadır; PERK (PRK benzeri ER kinaz), IRE1 (İnositol gerektiren enzim 1) ve ATF6 (Aktif transkripsiyon faktör 6). IRE1a ile aktive olan X-box bağlayıcı protein-1 (XBP-1) proteini kanser gelişimine katkı sağlamaktadır. Aktive edilmiş XBP-1'in yüksek ifadesi, artan tümör sağkalımı ile ilişkilendirilirken inaktif XBP-1'in yüksek ifadesi, tümör hücrelerinde apoptozu arttırmaktadır. Benzer şekilde UPR'nin başka bir kolu olan PERK/eIF2 $\alpha$  (ökaryotik başlatma faktörü 2 alfa), tümör başlangıcı ile sağkalımında düzenleyici olarak rol oynamaktadır. Aynı zaman düzenleyici rolü sayesinde hipoksi ve oksidatif stres gibi farklı durumlarda ortam adaptasyonuna katkı yapabilmektedir. Bunlarla beraber, ER stres refakatçileri olarak bilinen BiP / GRP78 (78-kDa glukoz düzenleyici protein veya BiP) ve GRP94 (Glukozla Düzenlenen Protein 94), çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese edilmektedir. Hem GRP78 hem de GRP94'ün, hepatit C virüsü ve insan papilloma virüsü dahil olmak üzere çeşitli onkojenik virüsler tarafından da ifadesi arttırılabilmektedir[82, 83].

UPR aktivasyonu, ER'un hatalı katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucu homeostazının bozulmasıyla tetiklenir. Bu tetiklemenin altında yatan, birkaç faktör bulunmaktadır. Bunlar; protein katlanmasında ER'nin boyut, şekil ve bileşenlerinin değişen çevreye adaptasyonunu sağlamak, ER katlama kapasitesini artırarak lümenine gelen katlanmamış protein miktarını azaltmak, yanlış katlanmış ve katlanmamış proteinlerin degradasyonunu sağlayarak ER fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlamak. [84, 85]

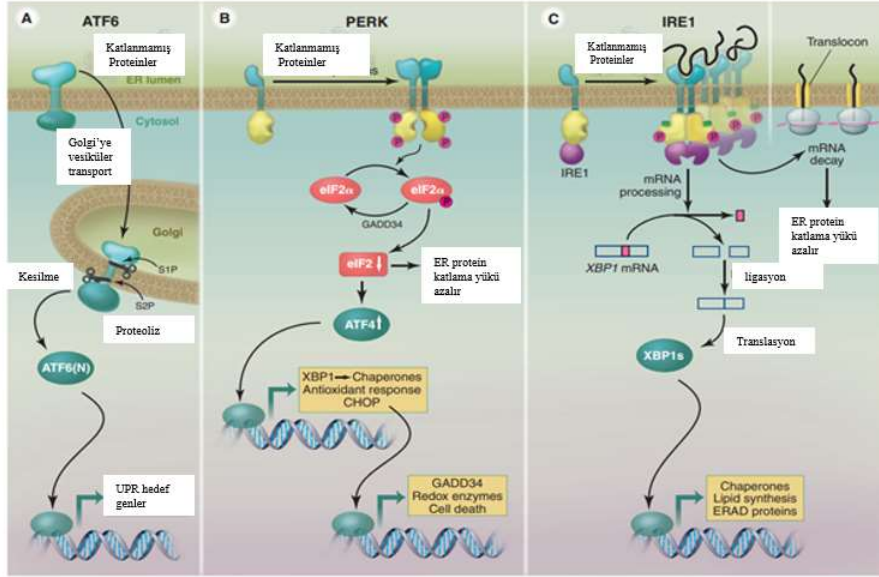
Ökaryot hücrelerde, üç ER transmembran sinyal proteini, ER stres sensörü olarak görev yapmaktadır. Bunlar; PERK , IRE1 ve ATF6 olarak sıralanabilirler.

PERK bir Ser/Thr (serin-treonin) protein kinazdır ve katalitik alanı eIF2a ailesinin kinazlarıyla benzerdir. GRP78 salınımı ile PERK, ER membranında oligomerize olur. Bu PERK'in otofosforilasyonunu indükler ve kinaz alanını aktive eder. PERK, eIF2a'yı fosforilize ederek inhibisyonunu sağlar. eIF2a fosforilasyonu, mRNA translasyonunu durdurur ve ER üzerindeki protein yükünü azaltır. eIF2a fosforilasyonu mRNA kodlayan transkripsiyon faktörü ATF4'ün translasyonuna yol açabilir. ATF4, ER işlevinde yer alan genlerin ekspresyonunu, ER stresine bağlı apoptozu, reaktif oksijen türlerinin ER stres aracılı üretimini ve UPR'nin hiperaktivasyonunu önlemek için eIF2a fosforilasyonu yoluyla, inhibe edici bir geri bildirim döngüsünü indükler(Şekil 2.7).

IRE1, GRP78 salınımı ile ER membranında oligomerize olur. IRE1a proteini, hem bir Ser / Thr kinaz alanı, hem de bir endoribonükleaz alanı içeren bir tip I transmembran proteinidir. Aktive edilmiş IRE1a, XBP-1'i kodlayan mRNA'dan 26 bazlık bir parçayı ayırır. Bölünmüş XBP-1, bir transkripsiyon faktörü olan 41-kDa XBP-1, proteininin translasyonunu başlatır ve XBP-1 aktif hale getirir. XBP-1, ER membran biyogenezinde, ER protein katlanmasında, ERAD'da ve hücreden protein salgılanmasında rol oynayan, proteinleri kodlayan çeşitli genlerin promotörlerine bağlanır ve aktive eder(Şekil 2.7).

ATF6 $\beta$ , ATF6a'nın uzaktan bir homologudur, ancak her ikisi de tüm dokularda eksprese edilir. GRP78 salınımı ile ATF6a, PERK ve IRE1 yollarına göre farklı bir protein aktivasyon mekanizmasına sahiptir. PERK ve IRE1 gibi oligomerize olmak yerine, GRP78 salınımı ile ATF6a N-terminalinden salınır. Golgi aparatında bulunan serin proteaz bölgesi-1 (S1P) ve metaloproteaz bölgesi-2 (S2P) tarafından kesilir. Bu kesilme sonrası ATF6'nın transkripsiyon aktive edici formu olan ATF6 $\alpha$ (N) elde edilir.

ATF6α(N) sitozole salınır ve gen ekspresyonunu düzenlemek için çekirdeğe geçişi sağlanır. ATF6 aynı zamanda IRE1 ile beraber çalışarak, XBP-1'in mRNA'sının transkripsiyonunu ve IRE1'in endoribonükleaz aktivitesini arttırarak üretilen XBP-1 mRNA'sının translasyonunu sağlar ve dolayısıyla XBP-1'i indükler. ATF6, şaperonlar gibi UPR proteinlerini hedefler. XBP-1 dışında GADD153 (DNA hasarını indükleyen gen-153) yani CHOP'u da indükleyebilir (Şekil 2.7) [86, 87, 88]



Şekil 2.7 Katlanmamış Protein Cevabının üç kolu. Üç transmembran sinyal proteinleri (ATF6, PERK ve IRE1), ER lümenindeki protein birikimi ile BiP tarafından salınır. Bu sayede UPR hedef genlerinin transkripsiyonunu yönlendirmek için çekirdeğe giren bZIP transkripsiyon düzenleyicilerinin üretilmesi sağlanır. Her bir sinyal yolu farklı protein aktivasyon mekanizması kullanır: ATF6 proteoliz ile düzenlenir, PERK translasyon yolu ile düzenlenir ve son olarak IRE1 geleneksel olmayan mRNA bölünmesi ile düzenlenir [86] kaynağından Türkçeleştirilerek alınmıştır.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışması kapsamında, agresif malignant kanserlerden biri olan glioma kanseri T98G hücrelerinde, bir metoksi izoflavonu olan Biochanin A (BCA)'nın sitotoksik ve bazı gen ifadeleri düzeyinde etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçların varolan tedavilerden daha az toksik etkiye sahip olan flavonoidlerin glioblastoma gibi tedavisi zor ve nüksetme olasılığı yüksek olan kanserler için yenilikçi ilaç araştırmalarında kullanılabilirliği değerlendirilmesiyle literatüre katkı sağlaması hedeflenmiştir.

Tez kapsamında deneysel çalışmalar sırasıyla;

1. Biochanin A stok çözeltisinin hazırlanması,
2. Hücre kültürü çalışmalarıyla T98G hücre hattının çoğaltılması ve devamlılığının sağlanması,
3. T98G hücrelerine uygulanacak olan Biochanin A konsantrasyonunun sitotoksikite deneyleri ile belirlenmesi;
  - Metiltiazol Difenil Tetrazolyum (MTT) Analizi
  - Tripan Mavisi ile boyama metodu
4. Akış Sitometresi ile Biochanin A uygulaması sonrası hücrelerdeki apoptoz evrelerinin belirlenmesi
5. Biochanin A uygulaması sonrası T98G hücrelerinden RNA izolasyonu yapılması ve ardından cDNA sentezi
6. ER stresi ile ilişkilendirilen *GRP78*, *GADD153*, *ATF4*, *eIF2S1*, *XBPI* genlerinin ifade seviyelerinin kantitatif gerçek zamanlı PZR kullanılarak belirlenmesi
7. Biochanin A uygulaması sonrası hücre içerisinde meydana gelen kalsiyum birikiminin tespit edilmesi

### 3.1 Biochanin A konsantrasyonlarının hazırlanması

Cayman Chemical Biochanin A (Cas:491-80-5) 100mg toz halinde -20 °C'de saklanmıştır. Stok Biochanin A dimethyl sulfoxide (DMSO) içerisinde 1M konsantrasyonunda olacak şekilde çözülmüştür. Hazırlanan Biochanin A 1M konsantrasyonu, DMSO ile seyreltilerek 100 mM konsantrasyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler alikotlanarak kullanım için -20 °C'de saklanmıştır.

### 3.2 T98G Hücrelerinin Kültürasyonu

Deneylerde kullanılan T98 hücre hattı, glioblastoma multiform beyin tümörüne sahip 61 yaşındaki erkek bir hastadan elde edilmiş hücre hattıdır. T98G hücreleri, T98 hücre hattının poliploid bir türevidir. T98G hücreleri fibroblast benzeri ve poligonal bir şekle sahip tümör hücreleridir. Bu hücreler özelliklerinden dolayı çok hızlı çoğalabilirler ancak serumdan yoksun bırakıldığında veya kültür kabı çok yoğun olduğunda, hücreler G0 evresine girer[89, 90].

T98G hücrelerinin hücre kültüründe pasajlanması aşağıdaki gibidir;

1. T98G hücre hattı hücre kültürü kaplarında (25 cm<sup>2</sup> veya 75 cm<sup>2</sup>) %10 fetal bovine serum (FBS), 100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin içeren DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 2-3 gün boyunca çoğaltıldı.
2. Hücrelerin %70-80 konfluent olup olmadıkları ışık mikroskobu altında kontrol edildi. Konfluent olan hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı.
3. Ölü hücreleri ve besiyeri kalıntılarını uzaklaştırmak için 1XDPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ile yıkama yapıldı. 25 cm<sup>2</sup> kültür kabı için 2 ml, 75 cm<sup>2</sup> kültür kabı için 5 ml 1XDPBS kullanıldı. DPBS, hücre kabının köşesinden bırakıldı.
4. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra 1XDPBS çekildi.
5. Hücreleri yüzeyden kaldırmak için 25 cm<sup>2</sup> kültür kabına 0,5 ml, 75 cm<sup>2</sup> kültür kabına 1,5 ml %0,25 Trypsin-EDTA çözeltisi eklendi ve inkübatörde 2 dakika inkübe edildi.

6. 2 dakika sonra inkübatörden alınan hücrelerin kalkıp kalkmadığı ışık mikroskobu ile kontrol edildi.
7. 25 cm<sup>2</sup> kültür kabına 4,5 ml, 75 cm<sup>2</sup> kültür kabına ise 13,5 ml DMEM eklenerek hücreler homojenize edildi.
8. 1 ml'deki hücre miktarı Thoma lamı kullanılarak hesaplandı ve plâtelere hazırlandı.

### 3.3. Hücre Sayımı ve Hücrelerin Deney İçin Hazır Hale Getirilmesi

T98G hücre hattı deneylerde kullanılmadan önce Thoma lamı kullanılarak 1 ml'deki hücre miktarı hesaplanır. Thoma lamında sayılan hücre miktarına göre kullanılacak olan miktar DMEM ile süspansiyon edilerek hazırlanır. Yapılan deney setlerinde ekilen hücre miktarları ile kullanılan hücre kültür kabı boyutları Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel Çalışmalara Göre Ekilen Hücre Miktarları ve Deney Koşulları

Deneyler	Kullanılan Kültür Kabı	Ekilen Hücre Miktarı
MTT Triphan Mavisi ile Boyama Hücre içi sitozolik Ca <sup>+2</sup>	96 kuyucuklu kültür kabı	50.000 hücre/kuyu
Akış Sitometrisi RNA İzolasyonu	6 kuyucuklu kültür kabı	400.000 hücre/kuyu

### **3.4. T98G hücrelerine Biochanin A Uygulanması**

Biochanin A 100 mM konsantrasyonu DMSO içerisinde seyreltilerek 1mM stok hazırlanmıştır. T98G hücrelerine literatür taramaları sonucu belirlenen 100, 50 ve 0  $\mu$ M konsantrasyonlarında Biochanin A uygulanmıştır. 0  $\mu$ M konsantrasyonu için sadece DMSO uygulaması yapılmıştır. Bunun yanı sıra kontrol örnekleri olarak 50 ve 100  $\mu$ M konsantrasyonlarında DMSO ve hiçbir uygulama yapılmamış örnekler de deneylere dahil edilmiştir. Uygulama yapıldıktan sonra hücreler 24 ve 48 saat boyunca %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir.

### **3.5 Biochanin A Uygulama Sonrası Hücre canlılığının belirlenmesi**

#### **3.5.1 MTT analizi**

Hücelere toksik olmayan Biochanin A konsantrasyonunu ve yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonları IC<sub>50</sub> değerini belirlemek için sitotoksikite testi olan MTT uygulaması yapılmıştır. IC<sub>50</sub> değeri bir bileşiğin biyolojik etkinliğini inhibe etme derecesini ölçmektedir. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT, metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından mor renge sahip suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgenir ve formazan kristalleri izopropil alkol içerisinde çözdürülerek spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılır. Hücre canlılığı % olarak hesaplanır[91, 92].

24 ve 48 saat için uygulanan protokol aşağıda yer almaktadır:

1. 1 ml'deki hücre miktarı Thoma camı kullanılarak hesaplandı ve 96 kuyucuklu kültür kabına 50.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı.
2. Ekimden 24 saat sonra, hücelere 0  $\mu$ M , 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M Biochanin A (DMEM içerisinde) uygulandı ve hücreler 24 ve 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi.



3. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonrasında hücelere ayrı ayrı 100 µl MTT çözeltisi eklendi (1:9 = MTT : serumsuz DMEM). İnkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası MTT çözeltisi uzaklaştırıldı ve kuyulara %100'lük 100 µl izopropanol eklendi.
5. 570 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen veriler GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplandı.

### 3.5.2 Tripan Mavisi Analizi

Hücelere toksik olmayan Biochanin A (DMSO içerisinde 1 M stok olarak hazırlanmıştır) konsantrasyonunu ve IC<sub>50</sub> değerini belirlemek için tripan mavisi ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Triphan mavisi hücre zarı dağılmış olan ölü hücrelerin içine girerek, onları maviye boyarken canlı olan hücreler ise renksiz olarak görünür. 24 ve 48 saat için uygulanan protokol aşağıda yer almaktadır:

1. 1 ml'deki hücre miktarı Thoma camı kullanılarak hesaplandı ve 96 kuyucuklu kültür kabına 50.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı.
2. Ekimden 24 saat sonra, hücelere 0 µM , 50 µM ve 100 µM Biochanin A (DMEM içerisinde) uygulandı ve hücreler 24 ve 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 100µl 1X PBS ile yıkandı.
4. Hücreler 20 µl Tripsin-EDTA ile tripsinize edildi ve üzerine 180 µl DMEM eklenerek pipetaj yapıldı ve mikro santrifüj tüp içerisine aktarıldı.
5. Farklı bir mikro santrifüj tüpü içerisine 50 µl hücrelerden aktarılarak üzerine 50 µl PBS içerisinde seyreltilen %0,2'lik Tripan Mavisi çözeltisi eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra hücreler thoma camında konularak ışık mikroskobu altında sayıldı

### 3.6 Biolegend Annexin V-PE/FITC ile Akış Sitometrisi Apoptoz Tayini

Biochanin A'nın MTT analizi ve tripan mavisi ile boyanması sonucu belirlenen sitotoksik olmayan konsantrasyonu T98G glioma hücrelerinde apoptoz ve nekroz açısından etkilerinin araştırılması için Biolegend Annexin V-PE/FITC (Cat:640914) kiti kullanılarak akış sitometrisi yapılmıştır. Annexin V, spesifik olarak fosfatidilserine (PS) bağlanabilen bir proteindir. Ancak sağlam yapıda olan hücre plazma zarından geçemez. Apoptoz sırasında zar asimetrisi kaybolur ve PS'lerin hücre plazma zarı dışına translokasyonu gerçekleşir. Annexin V, floresein izotiyosiyanat (FITC) ile konjüge edilerek apoptotik hücreleri belirlemek için kullanılır. Fakat, Annexin V sadece FITC ile kullanıldığında nekrotik hücrelerde de plazma zarı bütünlüğü bozulduğu için apoptotik ve nekrotik hücre ayrımı yapılamaz. Propidyum iyodür (PI) DNA'ya bağlanan floresan bir boyadır. PI, FITC ve Annexin V ile kullanıldığında nekrotik, erken apoptotik ve geç apoptotik hücrelerin ayırt edilmesini sağlar[93]. Akış sitometresi sonuçlarına bakıldığında nekrotik ve geç apoptozda olan hücrelerin FITC Annexin V ve PI pozitif, canlı olan hücrelerin FITC Annexin V ve PI negatif, erken apoptozdaki hücrelerin ise FITC Annexin V pozitif ve PI negatif olduğu bilinmektedir. Deney düzenğinde hücreleri kaldırmak için Tripsin-EDTA çözeltisi yerine Biolegend Accutase Cell Detachment solüsyonu kullanılmıştır. Accutase Cell Detachment solüsyonu, Tripsin-EDTA çözeltisine göre hücre yüzeyi için daha az toksik kabul edilen ve hücrelerin daha nazik bir şekilde yüzeyden kalkmasını sağladığı bilinen bir üründür. Biochanin A konsantrasyonlarının hücrelerde apoptozu tetiklediği bilinmektedir. Annexin V-PE/FITC kiti ile hücrelerin erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz miktarları ölçülmüştür. Annexin V-PE/FITC kiti kullanılarak gerçekleştirilen akış sitometrisi protokolü aşağıda yer almaktadır:

1. 1 ml'deki hücre miktarı Thoma camı kullanılarak hesaplandı ve 6 kuyucuklu kültür kabında e 400.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi.
2. Ekimden 24 saat sonra, kuyularda bulunan besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücrelere 0  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M Biochanin A ile 0  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M DMSO (DMEM içerisinde) uygulandı ve hücreler 24 ve 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi.

3. 24 ve 48 saat sonunda kuyularda bulunan besiyerleri uzaklaştırılıp, temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
4. Mikrosantrifüj tüplerine alınan besiyerleri 1000x g'de 10 dakika santrifuj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpler 5. basamak için saklandı.
5. Besiyeri uzaklaştırılan hücrelere yüzeyden ayrılmaları için 400 µl Accutase Cell Detachment solüsyonu ilave edildi. Etüvde inkübasyon sonrası hücrelerin üzerine 800 µl DMEM eklendi ve pipetaj yapılarak hücreler toplandı. 4. basamakta saklanan tüplerin üzerine eklendi.
6. Tüpler 1000x g'de 10 dakika santrifuj edildi ve süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
7. Hücreler 500 µl soğuk Cell Staining Buffer ile yıkandı ve tekrar 1000 x g'de 10 dakika santrifuj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem iki defa tekrarlandı.
8. Akış sitometrisi için hazırlanan boyasız hücreler (uygulama yapılmamış) 200 µl PBS ile toplanıp, 5 ml'lik akış sitometrisi tüplerine aktarıldı. Cell Staining Buffer ile ikinci yıkama bu hücrelere uygulanmadı.
9. Santrifüj sonrası hücrelerin üzerine 100 µl Annexin V Binding Buffer ile eklendi ve pipetaj yapılarak örnekler 5ml'lik akış sitometrisi tüplerine aktarıldı.
10. Tüp içerisindeki örneklere 5 µl FICT Annexin eklendi (Boyasız örnekler hariç).
11. Tüp içerisindeki örneklere 10 µl Propidium iodide solüsyonu eklendi (Boyasız örnekler hariç).
12. Tüp içerisindeki hücreler hafifçe vortekslenip 15 dakika karanlıkta inkübe edildi.
13. İnkübasyon sonrası her tüpe 200 µl Annexin V binding buffer eklendi ve BD FACSCANTO II cihazında ölçüm işlemi gerçekleştirildi.

### **3.7 Kantatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR)**

Akış sitometrisi deneylerini takiben gerçek zamanlı PZR deneyleri yapılmıştır. Gerçek zamanlı PZR için RNA izolasyonu Thermo Fisher Scientific PureLink RNA Mini Kit (Cat no:12183018A) tüketici firmanın prokolüne göre 48 saat kimyasal uygulaması yapılmış olan T98G hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'lar Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit (Cat no:205311) kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. ER stresi ile ilişkili genlerden *GRP78*, *eIF2S1*, *ATF4*, *GADD153* ve *XBPI* ifade seviyelerine Thermo Fisher Scientific Applied Biosystems 7500 Real-Time

PCR cihazı kullanılarak bakılmıştır. Gen ifadelerinin belirlenebilmesi için Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green (Cat. No.: A324402) kiti kullanılmıştır. Referans olarak *B2M* (Beta-2 mikroglobulin) ve *Efla* (Alfa-Ökaryotik translasyon uzama faktörü 1) genleri seçilmiştir. Primer dizileri Çizelge 3.4'te verilmiştir. Reaksiyon koşulları ile kullanılan kit bileşenleri Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6' da verilmiştir.

### 3.7.1 Invitrogen PureLink RNA Mini Kit izolasyonu

1. 1 ml'deki hücre miktarı Thoma lamı kullanılarak hesaplandı ve 6 kuyucuklu kültür kabına 400.000 hücre/kuyu şeklinde ekildi.
2. Ekimden 24 saat sonra, kuyularda bulunan besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücrelere, 0  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M Biochanin A ile 0  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M DMSO (DMEM içerisinde) uygulandı ve hücreler 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyudaki hücreler ayrı ayrı 300  $\mu$ l taze hazırlanmış liziz buffer ile pipetaj yapılarak toplandı ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
4. Hücre lizatlarının üzerine eş hacim olacak şekilde %70 etanol eklendi ve tüpler nazikçe vortekslendi.
5. Karışım, kit içeriğinde bulunan spin kolon tüpüne aktarıldı ve oda ısısında 12.000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Tüpün dibindeki süzüntü uzaklaştırıldı.
6. Spin kolona 700  $\mu$ l Wash Buffer I eklendi. Tüpler oda ısısında 12.000x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Tüpün dibindeki süzüntü atıldı. Kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
7. Spin kolona 500  $\mu$ l Wash Buffer II eklendi. Tüpler oda ısısında 12.000x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Tüpün dibindeki süzüntü atıldı.
8. Tekrar Spin kolona 500 $\mu$ l Wash Buffer II eklendi. Tüpler oda ısısında 12.000x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Tüpün dibindeki süzüntü atıldı.
9. Tüpler 12.000x g'de 1-2 dakika santrifüj edildi. RNA'ya bağlı membranı kurutmak için spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
10. Spin kolonuna 30-100  $\mu$ l RNaz içermeyen su eklendi, 1 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi ve 12.000x g'de 2 dakika santrifüj edildi. İzole edilen RNA

kullanılmak üzere buz üstüne alındı. Konsantrasyonları ölçülen RNA'lar cDNA dönüşümü için kullanıldı.

### 3.7.2 Quigen Quantitect Reverse Transcription Kit ile cDNA sentezi

Kit protokolü için kullanılan genomik DNA Wipeout reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.2'de ve Reverse Transkripsiyon reaksiyonu bileşenleri Çizelge 3.3'te verilmiştir. Bu reaksiyon ile izolasyon sonrası olası genomik DNA'lar uzaklaştırılmıştır.

Çizelge 3.2 Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu bileşenleri

Çözelti	Hacim	Konsantrasyon
7x genomik DNA temizleme Tamponu	2 µl	1x
RNA örneği	Farklılık göstermekte	
H <sub>2</sub> O	Farklılık göstermekte	
Son Hacim	14 µl	-

Çizelge 3.3 Reverse Transkripsiyon reaksiyonu bileşenleri

Çözelti	Hacim	Konsantrasyon
Reverse Transkriptaz	1 µl	
5x RT tamponu	4 µl	
RT Primer Karışımı	1 µl	1x
RNA örneği	14 µl	
Son Hacim	20 µl	-

1. Çizelge 3.2'ye göre genomik DNA Wipeout reaksiyonu buz üstünde hazırlandı. Her bir RNA örneğini konsantrasyonu 1000 ng/ml olacak şekilde Reaksiyon karışımı hazırlandı.
2. Genomik DNA Wipeout reaksiyonu 42°C'de 2 dakika boyunca inkübasyon ile gerçekleştirildi. İşlemden sonra örnek karışımlar buz üstünde saklandı.
3. Çizelge 3.3'e göre cDNA dönüşümü reaksiyonu hazırlandı. Tüpler 42°C 20 dakika inkübe edildikten sonra Quantiscript Reverse Transkriptazı in aktive olabilmesi için 95°C' de 3 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA'ların konsantrasyonları ölçüldükten sonra -20°C'de saklandı.

Çizelge 3.4. qRT-PCR yöntemiyle ER stresi ile ilişkili genlerin ifade düzeylerini belirlemek için kullanılan primer dizileri. Primer dizileri, grubumuz tarafından ekzon ve intron atlamalarına dikkat edilerek tasarlanmıştır.

<i>EIF2S1</i>	İleri primer 5'- AAGCATGCAGTCTCAGACCC -3' Geri primer 5'- AGCCACTTCAATATCTGCTC -3'
<i>GRP78</i>	İleri primer 5'- ATCAACGAGCCTACGGCAGC -3' Geri primer 5'- AATGGTGAGAAGAGACACATCG C-3'
<i>ATF4</i>	İleri primer 5'- ACAGCAAGGAGGATGCCTTC -3' Geri primer 5'- AGGTCATCTGGCATGGTTTC -3'
<i>XBPI</i>	İleri primer 5'-TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG -3' Geri primer 5'-GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG -3'
<i>GADD153</i> ( <i>CHOP</i> )-Eski	İleri primer 5'- AGCTGAGTCATTGCCTTTCTC -3' Geri primer 5'- TTGATTCTTCCTCTTCATTTCC -3'
<i>GADD153</i> ( <i>CHOP</i> )-Yeni	İleri primer 5'- GGTATGAGGACCTGCAAGAGGT-3' Geri primer 5'- CTTGTGACCTCTGCTGGTTCTG -3'
<i>B2M</i>	İleri primer 5'- CTATCCAGCGTACTCCAAAG -3' Geri primer 5'-GTCAACTTCAATGTCCGGATGG -3'

<i>EF1a</i>	İleri primer 5'-CTGAACCATCCAGGCCAAAT-3' Geri primer 5'-GCCGTGTGGCAATCCAAT-3'
-------------	---

### 3.7.3 Kantitatif Real Time ile Genlerin İfadesinin Belirlenmesi

Sentezlenen cDNA'lar ve sekanslanan primer dizileri kullanılarak *GRP78*, *eIF2S1*, *ATF4*, *GADD153* ve *XBPI* genlerinin ifade seviyeleri Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green kiti ve Thermo Fisher Scientific Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR cihazı ile belirlenmiştir.

1. Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green kit bileşenleri ile mix hazırlamak için ilk olarak su ve daha sonra diğer bileşenler dağıtıldı.
2. 96 kuyucuklu Real-Time PCR kültür kaplarına ilk olarak cDNA'lar ve negatif kontroller için sular dağıtıldı.
1. Hazırlanan karışım örneklerle dağıtıldı ve kit protokolü doğrultusunda Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR cihazına reaksiyon koşulları girilip, çalıştırıldı.

Çizelge 3.5 Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyon Koşulları

Aşama	Zaman	Sıcaklık	Döngü Sayısı
Başlangıç ısısı	15 dakika	95°C	1
Denatürasyon	30 saniye	95°C	40
Bağlanma	30 saniye	60°C	
Uzama	30 saniye	72°C	
Erime Eğrisi	15 saniye	95°C	-
	1 dakika	60°C	-
	30 saniye	95°C	-
	15 saniye	60°C	-

Çizelge 3.6 Ampliçon RealQ Plus 2x Master Mix Green kit bileşenleri

Çözelti	Hacim	Konsantrasyon
RealQ Plus 2x Master Mix	10 µl	1x
Primer A (10µM)	0.5 µl (0.25-2µl)	0.2 µM (0.1-0.8µM)
Primer B (10µM)	0.5 µl (0.25-2µl)	0.2 µM (0.1-0.8µM)
PCR-grade H <sub>2</sub> O	12 µl	-
DNA (200ng/l)	2 µl	
Total Hacim	25 µl	-

### 3.8 Abcam Fluo-8 Calcium Flux Assay ile hücre içi kalsiyum birikiminin belirlenmesi

Biochanin A uygulaması sonrası hücre içerisinde meydana gelen kalsiyum birikimini tespit etmek amacıyla Abcam Fluo-8 Calcium Flux Assay Kit (Cat. No: ab112129) kullanılmıştır. Kit protokolünde kullanılan, Fluo-8 kalsiyuma bağlanan floresan bazlı bir boyadır. Fluo-8 hücre plazma zarından geçerek, bulundurduğu lipofilik bloke edici grupları bir esterez tarafından parçalanır. Negatif yüklü kısmı hücre içinde kalarak, kalsiyuma bağlanır. Hücre içi kalsiyum salınımı ne kadar yüksek ise, Fluo-8 ışınması da o kadar yoğun olmaktadır[94]. Calcium flux assay uygulaması sırasında kalsiyum salınımını indüklemek için kontrol amaçlı Carbachol kullanılmıştır[95].

1. 1 ml'deki hücre miktarı Thoma lamı kullanılarak hesaplandı ve 96 kuyucuklu kültür kabına 50.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi.
2. Ekimden 24 saat sonra, kuyularda bulunan besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücrelere 0 µM ve 100 µM Biochanin A ile 0 µM ve 100 µM DMSO (DMEM içerisinde) uygulandı ve hücreler 24 ve 48 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi

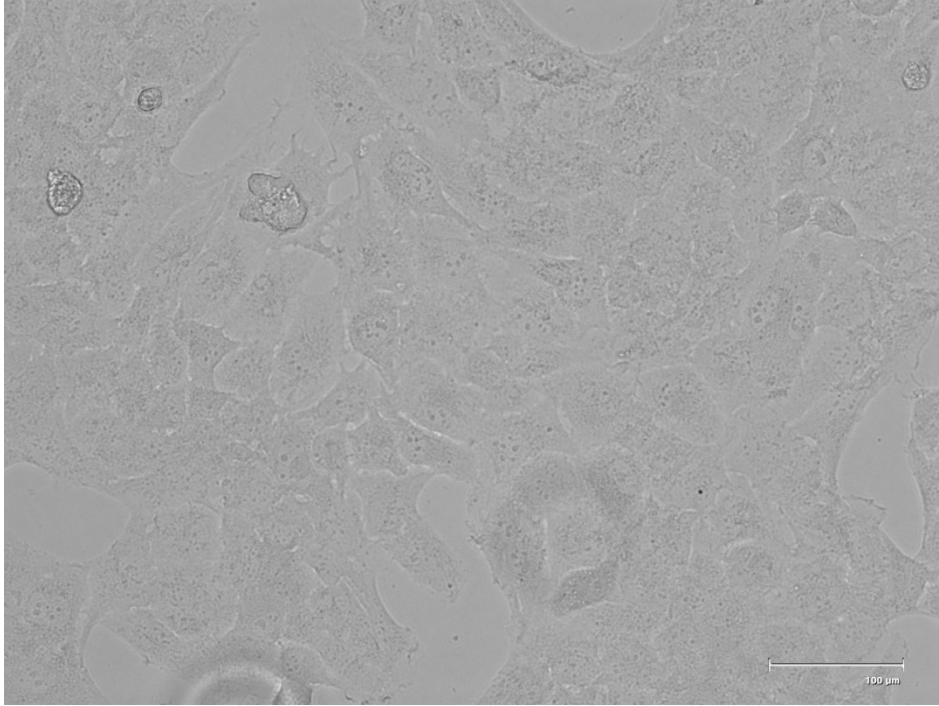


3. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırılarak, hücreler 50µl HHBS solüsyonu ile yıkandı.
4. Daha önceden hazırlanmış olan 1X assay buffer, Fluo-8 ve HHBS solüsyonu, her kuyuya 33.3 µl olacak şekilde dağıtıldı.
5. Plate'ler bir alüminyum folyoya sarılarak 30 dakika inkübatörde inkübe edildi. Sonrasında tekrardan bir 30 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası farklı konsantrasyonlarda ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-6}$ ) hazırlanmış olan Carbachol , her kuyuya 33.3 µl olacak şekilde dağıtıldı.
7. Uygulama yapıldıktan sonra 0.dakika, 30.dakika ve 60.dakika olarak EnSight™ Multimode plate reader (Perkin Elmer) cihazında Ex/Em=490/525 nm'de 3'er kez ölçüm alındı.

## 4.SONUÇLAR

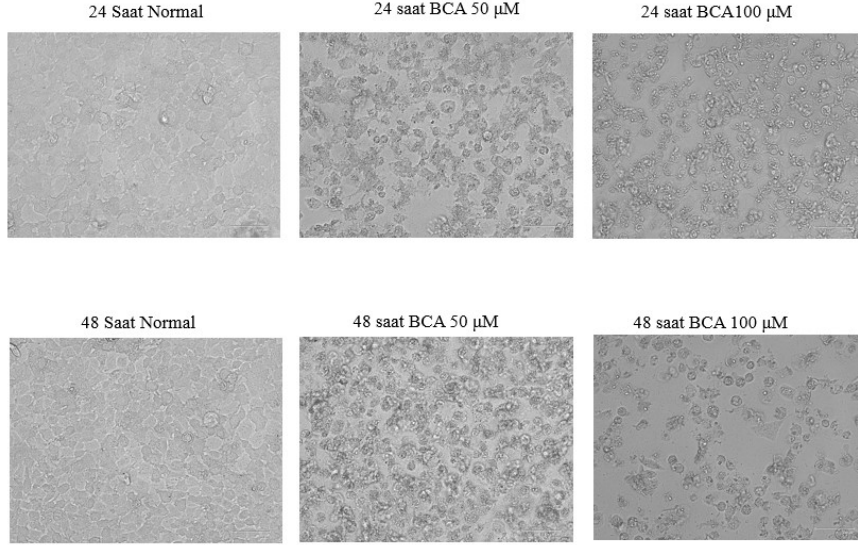
### 4.1 T98G Hücrelerinin Üretilmesi ve Biochanin A Uygulaması Sonuçları

Çalışma kapsamında kullanılan T98G hücreleri %10 fetal bovine serum, 100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin içeren DMEM besiyerinde 37°C’de %5 CO<sup>2</sup>’li etüvde çoğaltılarak pasajlanmıştır. Deney protokolleri gereğince hücre hazırlıkları yapılmıştır.



Şekil 4.1. T98G hücrelerinin ışık mikroskobu altında alınmış görüntüleri

Biochanin A'nın toksik olmayan dozlarının belirlenmesi için 1mM konsantrasyondaki stok kullanılarak Biochanin A'nın 50 ve 100 µM konsantrasyonları DMEM içerisinde hazırlanmıştır. Kontrol olarak 50 µM DMSO uygulaması yapılan ve Biochanin A uygulanmayan hücreler kullanılmıştır. Biochanin A 100 mg stok hassas terazide tartılarak, pipetaj yöntemi ile DMSO içerisinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Uygulama yapıldıktan sonra hücreler 24 ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 4.2. 50 ve 100 µM Biochanin A uygulaması yapılmış T98G hücrelerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası ışık mikroskobu görüntüleri

## 4.2. Biochanin A Uygulama Sonrası Hücre canlılık testlerinin Sonuçları

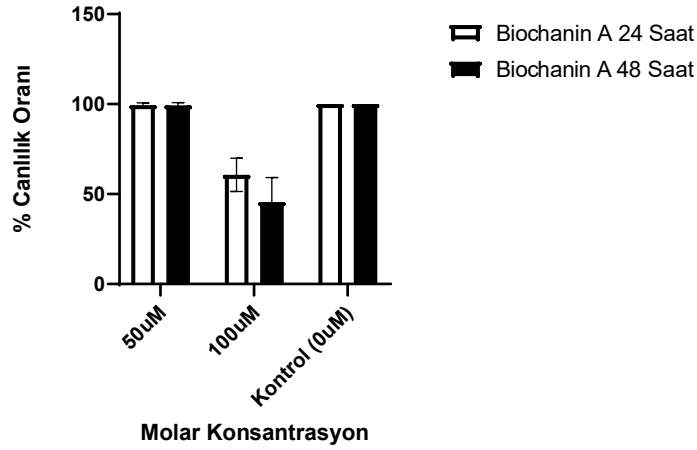
### 4.2.1 MTT Analizi Sonuçları

T98G hücrelerine uygulanan Biochanin A'nın toksik olmayan konsantrasyonlarını belirleyebilmek için olan MTT sitotoksitite testi uygulanmıştır. MTT analizi ile % hücre canlılığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 24 ve 48 saat için 100 µM hesaplanan IC<sub>50</sub> değerine uygun bulunmuştur. Aynı zamanda Biochanin A'nın 48 saat inkübasyonda daha etkin olduğu görülmüştür. MTT analizi sonuçları GraphPad Prism 8.4.3 uygulaması ile hesaplanıp, grafikleri çizilmiştir.

Çizelge 4.1. Biochanin A konsantrasyonları için MTT uygulamasının % sonuçları (Her bir bağımsız deney seti 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.)S.D.: Standart sapma, n: Bağımsız deney seti

Biochanin A 24 Saat (n: 5)			Biochanin A 48 Saat (n: 5)	
	% Ortalama	S.D.	% Ortalama	S.D.
50 $\mu$ M	99,39	1,355	99,34	1,471
100 $\mu$ M	60,68	9,262	45,62	13,58
Kontrol	100	0	100	0

**24 ve 48 Saat MTT Biochanin A uygulaması**



Şekil 4.3. 50 ve 100  $\mu$ M Biochanin A uygulaması sonrası 24 ve 48 saat inkübe edilen hücrelerde MTT testi sonuçlarını gösteren grafik

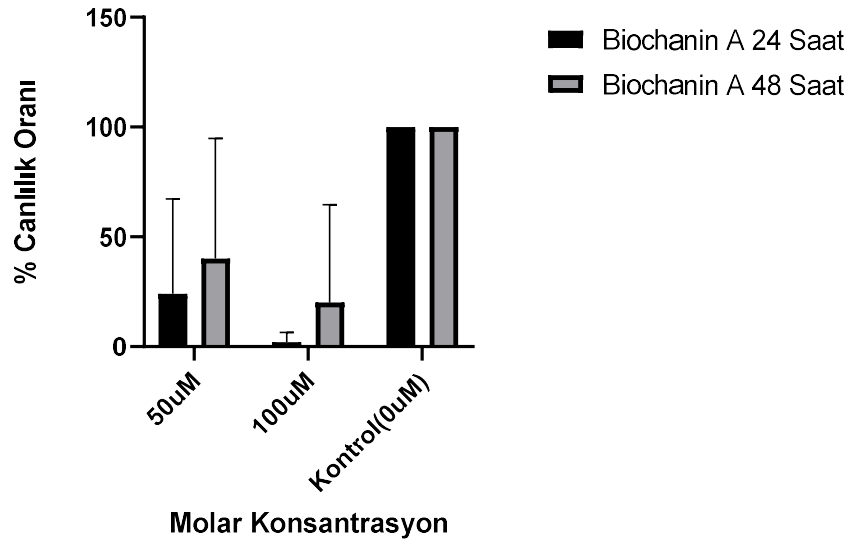
#### 4.2.2 Tripan Mavisi Analizi Sonuçları

T98G hücrelerine uygulanan Biochanin A'nın toksik olmayan konsantrasyonlarını belirleyebilmek için tripan mavisi boyaması yapılarak % hücre canlılığı tespit edilmiştir. Tripan mavisi analiz sonuçları GraphPad Prism 8.4.3 uygulaması ile hesaplanıp, grafikleri çizilmiştir. MTT analiz sonuçları ve tripan mavisi analiz sonuçları değerlendirildiğinde bu çalışma için MTT analizinin daha anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ve tripan mavisi boyama yönteminde elde edilen sonuçlar kapsama alınmamıştır.

Çizelge 4.2. Biochanin A konsantrasyonları için triphan mavisi analizi % Sonuçları (Her bir bağımsız deney seti 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.)S.D.: Standart sapma, n: Bağımsız deney seti

Biochanin A 24 Saat (n: 5)			Biochanin A 48 Saat (n: 5)	
	% Ortalama	S.D.	% Ortalama	S.D.
50 $\mu$ M	24	43.35	40	54.77
100 $\mu$ M	2	4.47	20	44.72
Kontrol	100	0	100	0

24 ve 48 Saat Tripan Mavisi Biochanin A uygulaması



Şekil 4.4. 50 ve 100  $\mu$ M Biochanin A uygulaması sonrası 24 ve 48 saat için elde edilen tripan mavisi analiz grafiği

### 4.3 Akış Sitometrisi Sonuçları

Akış sitometrisi süspansiyon halindeki hücrelerin veya partiküllerin büyüklük, granülarite gibi karakteristik özelliklerinin ölçülmesidir. Akışkan bir sıvıda bulunan hücreler lazer algılama alanından geçirilerek, geçiş sırasında verdikleri sinyallerin toplanarak analiz edildiği bir sistemdir [96]. Annexin V-PE/FITC kiti ile alınan sonuçlarda elde edilen veriler dört bölge olarak ayrılmıştır. Bunlar ise:

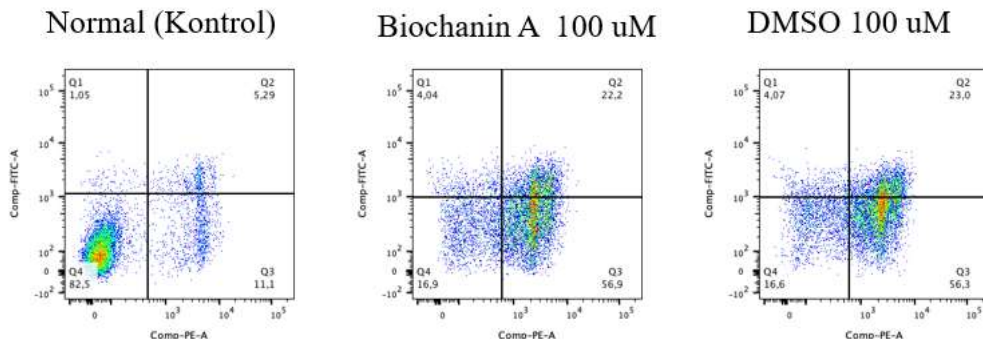
Q1: Erken apoptoz bölgesidir ve sadece FITC Annexin V pozitif hücreleri göstermektedir.

Q2: Geç apoptoz bölgesidir. Hem FITC Annexin V hem PI pozitif hücreleri göstermektedir.

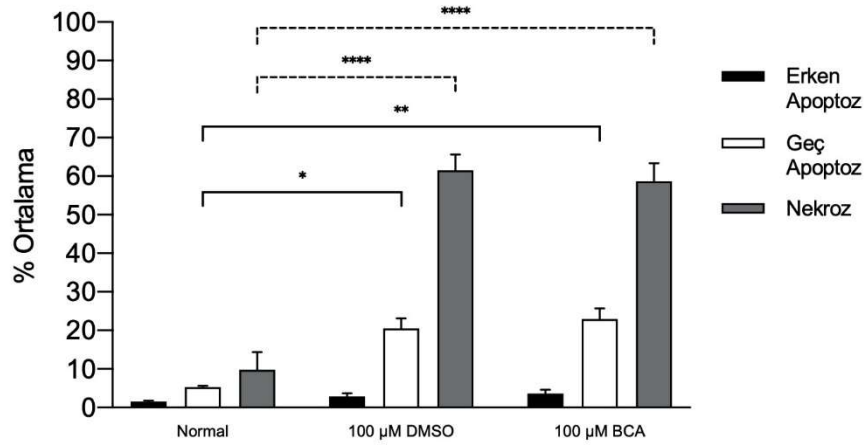
Q3: Nekrotik bölgesidir. Sadece PI pozitif hücreleri göstermektedir.

Q4: Canlı hücre bölgesidir. Hem FITC Annexin V hem PI negatif hücreleri göstermektedir.

Elde edilen grafikler doğrultusunda kimyasal uygulaması yapılmayan hücrelerde 48 saat için Q4 bölgesinde yoğunluk gözlemlenmiştir. Kontrol olarak 0  $\mu\text{M}$  ve DMSO 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonu kullanılmıştır. 48 saat için kontrol amaçlı kullanılmış konsantrasyonlarda erken ve geç apoptoz miktarlarının, Biochanin A 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonuna göre daha düşük olduğu görülmüştür ancak Biochanin A 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda, DMSO konsantrasyonlarına göre daha az nekrotik hücrelerin olduğu gözlemlenmiştir. Veriler, Biochanin A'nın apoptozu kontrol örneklerine göre daha fazla teşvik ettiğini göstermiştir.



Şekil 4.5. T98G hücrelerine 48 saat Biochanin A uygulaması sonrası Annexin V-PE/FITC kiti kullanılarak gerçekleştirilen akış sitometrisi deneyi sonuçları. Grafiklerde her bölgede bulunan sayılar, hücrelerin yüzde kaçının o bölgede toplandığını göstermektedir. Q1: sadece FITC Annexin V pozitif (erken apoptoz), Q2: hem PI hem FITC Annexin V pozitif (geç apoptoz), Q3: sadece PI pozitif (nekroz), Q4: hem PI hem FITC Annexin V negatiftir (canlı).

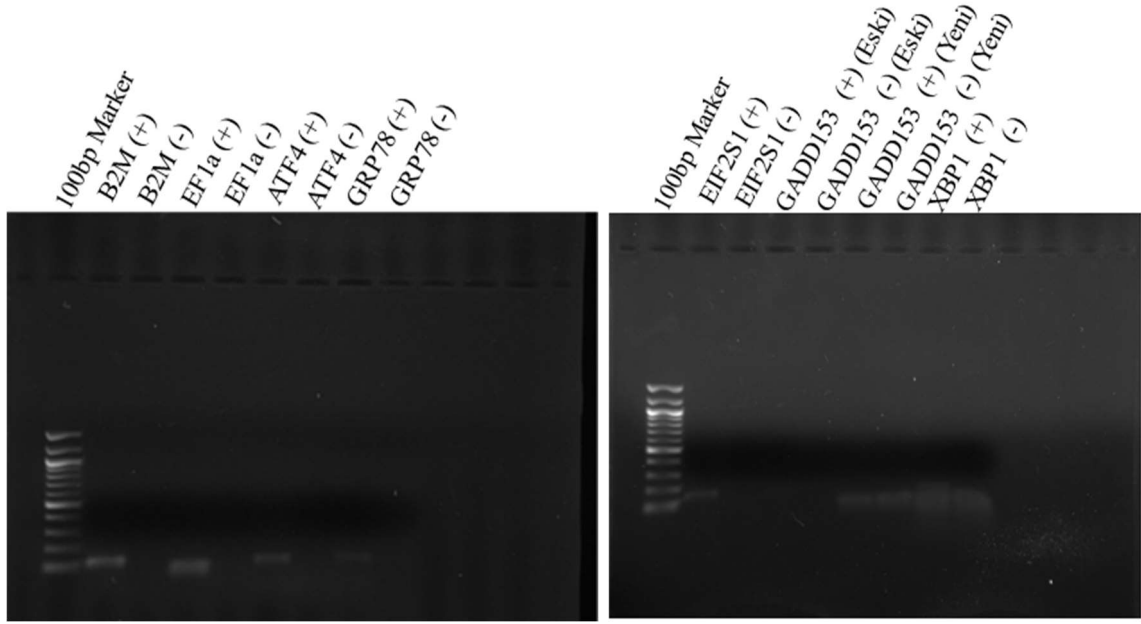


Şekil 4.6 Biochanin A uygulaması yapılan T98G hücrelerine ait yüzde ortalama apoptoz ve nekroz oranları. Normal örnekler Biochanin A uygulaması yapılmayan hücrelerdir. 3 bağımsız deney kendi içinde üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Veriler standart sapma değerleri ile sunulmuştur. Two-way ANOVA sonucu istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar işaretlenmiştir (*P* değerleri \*0,0115, \*\*0,011, \*\*\*\*<0,0001). BCA: Biochanin A. 48 saat Biochanin A uygulaması sonrası nekrotik hücre yoğunluğunda anlamlı bir artış görülmektedir. 48 saat 100 µM Biochanin A uygulanan örneklerdeki geç apoptoz oranı istatistiksel olarak anlamlıdır.

#### 4.4 Kantitatif Real-Time PZR sonuçları

Kantitatif Real-Time PCR (qPCR) deneyinde ER stresi ile ilişkili genlerin ifade seviyelerinin incelenmesi için *GRP78*, *eIF2S1*, *ATF4*, *GADD153*, *XBPI* ve iki referans gen olarak *B2M* ile *EF1a*'nın primer dizileri tasarlanmıştır. RNA izolasyonları ve cDNA

sentezi için T98G hücrelerine 50 ve 100 µM Biochanin A ve DMSO uygulaması yapılmıştır. Invitrogen Purelink RNA Mini kit ve Quigen Quantitect Reverse Transcription kit ile RNA ve cDNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Ancak tasarlanan primer dizilerinden *GADD153* (CHOP) primer dizisi iki defa tasarlanıp sentezlenmesine rağmen çalışmamıştır.

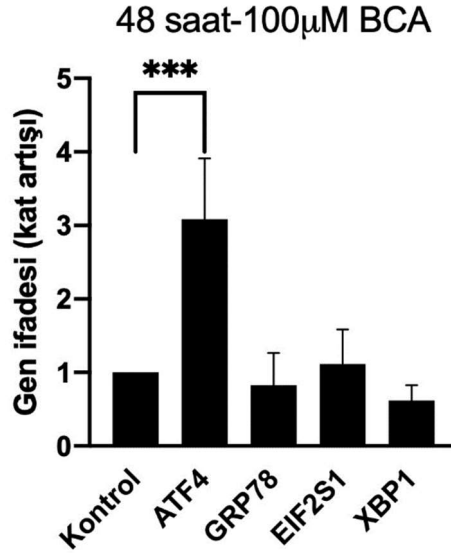


Şekil 4.7. Agaroz jelde yürütülmüş PCR örneklerinin görüntüleri

Pozitif kontrol: cDNA içeren örnekler Negatif kontrol: steril su içeren örnekler.

Kantatif Real-Time PCR (qPCR) deneyinde 48 saat olacak şekilde *GRP78*, *eIF2S1*, *ATF4*, *XBP1* ve referans genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Referans gen olarak sadece *EF1a* kullanılmıştır. 100 µM Biochanin A uygulamasıyla gen ifadesindeki değişimler  $\Delta\Delta Ct$  değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. Genlerin ifade seviyelerinde anlamlı bir farklılık olup olmadığı GraphPad Prism 8 for macOS (Version 8.4.3., GraphPad Software, LLC) ile Tukey's multiple comparisons test yapılarak analiz edilmiştir ( $p < 0,05$ ). 100 µM Biochanin A'nın 48 saat uygulandığı örneklerde sadece *ATF4* geninin ifade seviyesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p: 0,0002$ ) (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). PCR ayrıca agaroz jel elektroforezinde yürütülüp kontrol edilmiştir (Şekil 4.7).





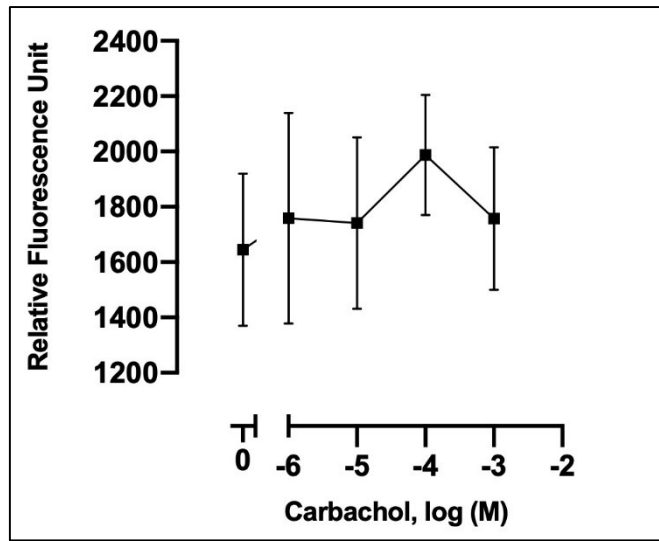
Şekil 4.8 T98G hücrelerine 48 saat Biochanin A uygulaması sonrası RealQ Plus 2x Master Mix Green kiti kullanılarak gerçekleştirilen kantatif real-time PCR deney sonuçları.

#### 4.5 Sitozolik Ca<sup>+2</sup> değerler Sonuçları

Calcium flux assay uygulaması sırasında Carbachol kullanılmıştır. Carbachol 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> ve 10<sup>-6</sup> konsantrasyonlarında kalsiyum salınım standardını belirlemek için kullanılmıştır. Bu amaçla, Biochanin A uygulaması dışında ayrı bir set olarak Fluo-8 boyası ile yukarıda verilen konsantrasyonlarda uyarılma gerçekleştirilmiştir. Hücre içindeki kalsiyum miktarı saniyeler içinde değişim gösterir. Bu sebeple floresan ölçüm 1-2 sn içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bir seri carbachol uyarımı sonrası T98G hücrelerinde saniyeler içerisinde meydana gelen maksimum kalsiyum cevabı, göreceli floresan birimi olarak grafiklendirilmiştir (Şekil 4.11).

48 saatlik deney seti için belirlenen maksimum kalsiyum seviyesini belirten floresan birim %100 cevap olarak kabul edilip buna göre 100  $\mu$ M Biochanin A uygulanan örneklerdeki kalsiyum cevabı değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.3 ve Şekil 4.11).

Hücre içi kalsiyum miktarına dair elde edilen tüm veriler göz önünde bulundurularak, kalsiyum cevaplarıyla ilişkili ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

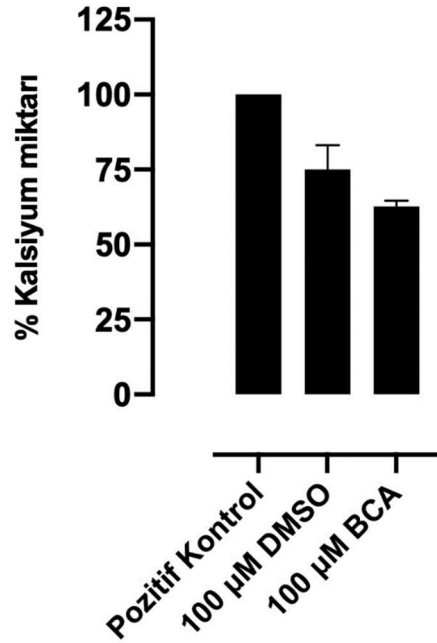


Şekil 4.9 Carbachol ile uyarılan T98G hücrelerindeki hücre içi kalsiyum miktarı. Biochanin A uygulaması yapılmamış olan T98G hücreleri, agonist aracılı kalsiyum salınımının indüklenmesi için bir seri farklı konsantrasyonda Carbachol ile uyarılmıştır ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ve 0 M). 48 saat deney setlerinde en fazla kalsiyum cevabının gözlemlendiği agonist uyarım konsantrasyonu  $10^{-4}$  M carbachol ile olmuştur. Hücre içi kalsiyum miktarı saniyeler içerisinde ve uyarılar neticesinde değişim göstermektedir. M: Molarite. Veriler  $\pm$  standart sapma olarak sunulmuştur. 3 bağımsız deney kendi içerisinde 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3 Biochanin A ile uyarılmış T98G hücrelerinin oluşturduğu hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarları.  $Ca^{+2}$  miktarları, Biochanin A uygulaması yapılmamış T98G hücrelerinde pozitif kontrol amaçlı agonist salınımlı  $Ca^{+2}$  cevabı oluşturarak ve bu değeri %100 kabul ederek karşılaştırmalı olarak hesaplanmıştır. Agonist uyarımlı  $Ca^{+2}$  cevabı en çok  $10^{-4}$ M

carbachol ile uyarıldığında gözlenmiş olup elde edilen floresan ölçüm değeri %100 kabul edilmiştir. Ortalama sayısal değerler  $\pm$  standart sapma şeklinde sunulmuştur. 3 bağımsız deney kendi içerisinde 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

	$10^{-4}M$ Carbachol ile uyarılmış	100 $\mu M$ DMSO	100 $\mu M$ Biochanin A
	% Ortalama $Ca^{+2}$ Miktarı $\pm$ Standart sapma		
48 saat	100	75,0 $\pm$ 8,1	62,7 $\pm$ 1,9



Şekil 4.10 Çizelge 4.3'deki verilerin grafik halinde sunulması. Çizelge 4.3'nin başlığında yapılan tüm açıklamalar bu grafik için de geçerlidir. Ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

## 5.TARTIŞMA

Kanser kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize edilen, vücudun diğer bölgelerine yayılma potansiyeli olan bir hastalıktır. Kanser oluşumunun yaklaşık %90-95 oranında sigara, alkol tüketimi, obezite, diyet, fiziksel hareketsizlik gibi yaşam tarzı faktörlerinden kaynaklandığı ve geri kalan %5-10'nin ise kalıtsal genlerden olduğu düşünülmektedir[97]. Geleneksel kanser tedavi yöntemleri arasında antitümör ilaçları, cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyasyon gibi tedaviler yer almaktadır ancak bu tedaviler yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden yenilikçi tedavi araştırmaları alternatif bir yol olarak doğal bileşiklere yönelmiştir. Özellikle Asya ülkelerinde alternatif tedavi yöntemleri olarak otların ve diyet ajanlarının birçok kanser hastasında hücresel sinyali etkilediği bulunmuştur. Literatürde, fitokimyasalların alt grubu olan flavonoidlerin antioksidan, antienflamatuvar, antialerjik ve enzim modülasyonu dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik işlevleri olduğu bulunmuştur. Flavonoidler, antosiyaninler, flavonoller, izoflavonlar v.b. alt gruplara ayrılmaktadır[98]. Son yıllarda, nörolojik hastalıklar, enflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi çeşitli hastalıklarla bağlantılı olan endoplazmik retikulum (ER) stresinin doğal bileşikler ile tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Yanlış protein katlanması sonucunda ortaya çıkan ER stresi kanserde hücre çoğalması ve sağkalımı için önemli olmakla beraber flavonoidler gibi doğal bileşiklerin hem kronik ER stresini indükleyerek hem de ER stresini azaltarak etkilerini gösterebileceği bulunmuştur[99]. Bu tezin amacı bir metoksi izoflavonu olan Biochanin A uygulamasının T98G glioma hücrelerinde meydana getirdiği ER stresi etkisini araştırmaktır. Tez kapsamında, toksik olmayan doz miktarları, MTT (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3.) deney sonuçları ile belirlenmiş ve 100 µM Biochanin A'nın 48 saatte daha etkin olduğu kanısına varılmıştır. Uygun dozun tespit edilmesinin ardından Biochanin A'nın T98G hücreleri üzerindeki etkisi farklı deneyler ile incelenmiştir. Biochanin A'nın etkisi bazı ER stress genlerinin ifade seviyelerinde, hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarlarında ve son olarak hücrelerin apoptoz evrelerinde incelenmiştir.

Çalışmalarda T98G glioma hücrelerine uygulanan Biochanin A miktarı 48 saatte 100 µM olarak karar verilmiştir. Vilas Desai ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada temozolomide ve Biochanin A kombinasyon tedavisi U87 ve T98G hücrelerine

uygulanmıştır. Sitotoksitite deneyi sonucunda uygulama için doz miktarı 70 µM olarak belirlenmiştir ve 72 saat uygulama yapılmıştır. Çalışma sonucu kombinasyon tedavisi T98G hücreleri üzerinde metabolik fenotip değişikliği göstermese de yapılan deneyler ile Biochanin A'nın temozolomidin sitotoksitesini önemli ölçüde desteklediği kanısına varılmıştır[100]. Aditi Jain ve arkadaşlarının, C6 glioma hücreleri ve bEnd.3 beyin endotel hücre hatlarında yaptığı başka bir çalışmada Biochanin A sitotoksitite değerleri için süre 72 saat ve doz miktarlarını 5,35 ve 70 µmol/L olarak belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlar sonucu kontrol ile karşılaştırıldığında Biochanin A uygulaması her iki hücre hattında canlılıkta azalma gözlenmiştir[101]. Dong ve arkadaşlarının U251 glioma hücrelerinde yaptığı Biochanin A çalışmalarında 24, 48 ve 72 saat uygulama sonrası hücre canlılığının konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldığı görülmüştür[102]. Guo ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise orta serebral arter tıkanıklığı ve reperfüzyon (MCAO/R) yaralanması olan sıçanlara, yaralanma gerçekleşmeden önce 14 gün boyunca 10, 20 veya 40 mg/kg miktarlarında Biochanin A enjekte edilmiştir. Placebo uygulanan grupta herhangi bir nörolojik bozukluk gözlenmezken, MCAO/R yaralanması olan sıçanlarda önemli nörolojik eksiklikler gözlenmiştir. Biochanin A tedavisi ile nörolojik eksikliklerin doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir[103]. Yaptığımız MTT çalışmalarında Biochanin A uygulama süresi 48 saat olarak belirlenmiştir.

Literatür araştırmaları, izoflavonların kanser hücresi farklılaşmasını ve apoptozu indüklemesiyle beraber aynı zamanda kanser ilaçlarıyla sinerjik bir etkiye sahip olduğunu desteklemiştir. Kanser hücrelerinde apoptozunun izoflavonlar tarafından indüklenmesi üzerine yapılan çalışmalarda lösemi hücrelerinde izoflavonların G1/G2 fazı hücre döngüsünü bloke ettiği görülmüştür. Yan Li ve arkadaşlarının A549 ve 95D akciğer kanseri hücre hatlarında yaptığı çalışmalarda annexin V-FITC ve propidyum iyodür boyama ile Biochanin A'nın apoptoz üzerindeki etkilerini incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Biochanin A ile 48 saat tedavi edilen grupta apoptozun erken ve geç evrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla doza bağlı bir artış gözlemlenmiştir[104]. Başka bir çalışmada ise Dong ve arkadaşları, Biochanin A uygulamasının U251 glioma hücrelerinin proliferasyonunun apoptozla ilişkisi incelenmiştir. 48 saat 0, 50 ve 100 mmol/L miktarlarında Biochanin A uygulaması sonucunda kontrol grubuna göre apoptozu arttırdığı gözlemlenmiştir[102]. Tez kapsamında apoptoza giren hücreleri belirlemek adına yapılan annexin V-FITC ve propidyum iyodür boyaması sonuçlarında beklenildiği

gibi kontrol örneğine göre 48 saat için Biochanin A ve DMSO örneklerinde erken ve geç apoptozda artış gözlemlenmiştir. T98G hücrelerinin yüzde ortalama apoptoz ve nekroz oranlarına incelendiğinde bölgelere göre hücre dağılım yüzdeleri beklenildiği gibidir (Şekil 4.5). 48 saat için kontrol olarak kullanılan DMSO 100 µM konsantrasyonunun erken ve geç apoptoz miktarlarının beklenildiği gibi Biochanin A 100 µM erken ve geç apoptoz miktarlarından daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bununla beraber nekroz seviyeleri yüksek çıkmıştır. Kimyasal uygulaması yapılmayan hücrelerde ise nekroz seviyeleri düşük çıkmıştır. Elde edilen sonuçlar kimyasal uygulanan hücrelerdeki nekroz seviyelerinin hücre kültüründen toplanırken veya prosedür sırasında zarar verilmediğini göstermiştir. Aynı zamanda nekroz seviyelerinde kimyasal uygulamasına bağlı olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Annexin V-FITC ve propidyum iyodür boyaması ile beklenildiği gibi Biochanin A 100 µM grubu kontrol gruplarına göre apoptozu daha fazla teşvik etmiştir. 48 saat verileri için DMSO 100 µM ve Biochanin A 100 µM konsantrasyonları geç apoptoz oranı yüzdeleri kimyasal uygulaması yapılmayan normal T98G hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı veriler elde edilmiştir. Ancak burada Biochanin A'yı hazırlamak için kullanılan DMSO etkisinin düşünülmesi gerekmektedir.

Kanser hücreleri, tümörjenik sinyal yollarını aktive edebilmek ve aynı zamanda hücre tümör baskılayıcı mekanizmalarını kontrol edebilmek için çeşitli metabolik modifikasyonlara uğrar ve yüksek seviyede protein sentezi yapar. Bu modifikasyonların çoğu ER'da gerçekleşmektedir ve ER'da katlanmış protein birikimi ER stresinin indüklenmesine sebep olmaktadır[105]. Çalışma kapsamında kantitatif real-time PCR (qPCR) ile *GRP78*, *eIF2S1*, *ATF4*, *XBPI* ER stress genlerinin 100 µM Biochanin A uygulaması ile ifade seviyelerine bakılmıştır. Kolon, yumurtalık, beyin gibi kanser hücrelerinde *GRP78*'in aşırı ifade gösterdiği bilinmektedir. Yüksek *GRP78* ifadesi çeşitli kanserlerde daha yüksek patolojik dereceye sahip olunmasına, nüks riskine ve zayıf hasta sağkalımına sebep olmaktadır [106]. Litaretürde, Gantenbein ve arkadaşlarının küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastaları ile yaptıkları çalışmada yüksek *eIF2S1* gen ifade seviyelerine sahip olan hastalarda genel sağkalım oranlarının önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur[107].

Tez çalışması kapsamında Biochanin A 100 µM konsantrasyonunda 48 saatte *ATF4* için anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Literatür çalışmalarında yüksek *ATF4* ifadesi olan

glioma hastalarının sağkalım süreleri kısaltmakla beraber tümör proliferasyonunu ve anjiyogenezi indüklemek için *SLC7A11*( $\text{Na}^{+2}$  bağımlı membran sistein-glutamat taşıyıcısı)'in ifadesini düzenleyerek glioma hücrelerinin ferroptozunu (demir bağımlı lipid peroksit birikiminden kaynaklanan hücre ölümü) inhibe edebileceği bilinmektedir. Aynı zamanda glioma hücrelerinde TMZ tedavisinin *ATF4* ifadesinde artışına sebep olduğu bilinmektedir. *ATF4* aşırı ifadesi glioma hücrelerinin TMZ'ye olan direncini arttırabilmektedir[108,109]. Bunlarla beraber, Tang ve arkadaşlarının biyoaktif bir bileşik olan Withaferin A (WA) ile yaptıkları çalışmalarda WA'nın *ATF4*'ün ifadesini arttırarak ATF3 ve CHOP aktivasyonu ile ER stressini indüklediği ve GBM hücrelerinde apoptoza sebep olduğu bulunmuştur[110]. Hem annexin V-FITC hem de qPCR deney sonuçları için 48 saat verileri istatistiksel olarak daha anlamlıdır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.8). Bununla beraber Biochanin A 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonu için *ATF4* gen ifadesindeki artışının hücre ölümünü indüklediği gözlemlenmektedir.

Kalsiyum ( $\text{Ca}^{+2}$ ), hücrelerde proliferasyon, göç ve hücre farklılaşması dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel işlevleri kontrol eden ikincil bir habercidir[111]. Hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonunun yüksek olması hücreyi olumsuz etkilerken,  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonunun sabit kalması veya kısa zamanlı artışı nöroprotektif sinyalleri aktive etmektedir[112]. Normal hücrelerde  $\text{Ca}^{+2}$  salınımı rejeneratif dalgalar halinde ve kısa süreli pikler olarak gerçekleşmektedir.  $\text{Ca}^{+2}$  sinyal yollarının yeniden düzenlenmesi, oluşan kanserli hücrenin, antikanser mekanizmalarından korunmasını sağlamaktadır [113]. Varlamova ve arkadaşlarının A172 insan glioma hücrelerinde hücre içi sinyal düzenleyicileri olan selenoproteinler ile yaptıkları çalışmada ER'daki  $\text{Ca}^{+2}$  kapasitesinin artması, pro-apoptotik genlerin ekspresyonunun artışı ve apoptozun başlatılmasını teşvik ettiği gözlemlenmiştir[114]. Çalışma kapsamında Biochanin A uygulamasının hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  salınımına olan etkisini inceleyebilmek için calcium flux assay ölçümü yapılmıştır.  $\text{Ca}^{+2}$  değerlerinin hesaplanabilmesi için ilk olarak  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ve 0 M konsantrasyonlarında agonist aracılı kalsiyum salınımının indüklenmesi için kimyasal uygulaması yapılmamış hücreler Carbachol ile uyarılmıştır. 48 saat içinde en yüksek  $\text{Ca}^{+2}$  salınımı en fazla  $10^{-4}$  M konsantrasyonunda gözlemlenmiştir.  $10^{-4}$  M konsantrasyonu %100 kabul edilerek kimyasal uygulaması yapılmış olan hücrelerin  $\text{Ca}^{+2}$  salınım miktarı hesaplanmıştır. 48 saat  $\text{Ca}^{+2}$  salınım ortalama miktar hesaplamaları ve grafiğine göre (Şekil 4.10 ve Çizelge 4.3) Biochanin A 100  $\mu\text{M}$  ve DMSO 100  $\mu\text{M}$

konsantrasyonlarının  $Ca^{+2}$  salınımı zamana bağı olarak artmıştır. 48 saat verilerinde  $Ca^{+2}$  salınımı için istatistiksel olarak anlamlı bir değer bulunamamıştır.

Biyoaktif bir izoflavon olan Biochanin A, glioblastoma, meme kanseri, prostat kanseri ve ağız kanseri hücrelerine karşı kemopreventif ve antikanser potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir[115]. Yapılan çalışmalar Biochanin A'nın Genistein'den daha az mutajenik olduğunu göstermiştir ve aynı zamanda Genistein'den daha zayıf tirozin kinaz inhibitör özelliklere sahiptir. *In vitro*'da meme, kolon ve prostat hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir[115]. Glioblastoma Multiform Grade IV, MSS tümörü olarak en yaygın ve kötü huylu tümörlerden biridir. Cerrahi yaklaşımlar, radyoterapi ve kemoterapi tedavileri gibi multimodal terapötik tedavi yöntemlerine rağmen GBM hastalarının sağkalımı için en uzun süre 13.5 aydır[116]. Kullanılan ilaçların kan beyin bariyerinden geçememesi ve kullanılan kimyasal ajanlara karşı oluşturduğu direnç GBM hastalarının tedavisini zorlaştırmaktadır. Doğal bileşikler KBB'den geçebilecek kadar küçük olmaları ve geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılan kimyasal ajanlardan daha az toksik olmaları nedeniyle güncel tedavi yöntemi olarak araştırılmaktadır [116].

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminin projesi (FHD-2022-19959) tarafından finanse edilen Glioblastoma kanser hücrelerinde Biochanin A kullanımının Endoplazmik Retikulum Stresi üzerine etkisinin daha iyi anlaşılması kapsamında elde edilen sonuçlar yayına çevrilerek literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.



## 6.KAYNAKLAR

- [1]. World, Cancer, Who.int. (2022). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [2]. R.L. Siegel, K.A. Miller, H.E. Fuchs, A. Jemal, *Cancer statistics, 2022*, 72 (2022) 7–33.
- [3]. H.J. Burstein, Lada Krilov, J.B. Aragon-Ching, N.N. Baxter, E. Gabriela Chiorean, W. Chow, John de Groot, S.M. Devine, S.G. DuBois, W.S. El-Deiry, A.J. Epstein, J.V. Heymach, J. Jones, D.K. Mayer, R.A. Miksad, N.A. Pennell, M.S. Sabel, R.L. Schilsky, L.M. Schuchter, N. Tung, *Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology*, 35 (2017) 1341–1367
- [4]. Henrica M.J. Werner, G.B. Mills, P.T. Ram, *Cancer Systems Biology: a peek into the future of patient care?*, 11 (2014) 167–176.
- [5]. H. Khan, H. Ullah, Antoni Sureda, Susana Esteban Valdes, Tarun Belwal, S. Tejada, Antoni Sureda, Mohammad Amjad Kamal, *Flavonoids nanoparticles in cancer: Treatment, prevention and clinical prospects*, 69 (2021) 200–211.
- [6]. Cristiana Libardi Miranda-Furtado, M. Claudia, S. Santos, Gilvan Pessoa Furtado, O. de, C. Pessoa, *Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment*, 14 (2019) 1164–1176.
- [7]. W. Jiang, T. Xia, C. Liu, J. Li, W.-F. Zhang, C. Sun, *Remodeling the Epigenetic Landscape of Cancer—Application Potential of Flavonoids in the Prevention and Treatment of Cancer*, 11 (2021).
- [8]. D. Lin, M. Wang, Y. Chen, J. Gong, L. Chen, X. Shi, F. Lan, Z.-L. Chen, T. Xiong, H. Sun, Shu Wen Wan, *Trends in Intracranial Glioma Incidence and Mortality in the United States, 1975-2018*, 11 (2021).
- [9]. K. Zhai, A. Mazurakova, Lenka Koklesova, Dietrich Büsselberg, Dietrich Büsselberg, *Flavonoids Synergistically Enhance the Anti-Glioblastoma Effects of Chemotherapeutic Drugs*, 11 (2021) 1841–1841.
- [10]. List of Classifications – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans, Who.int. (2023).
- [11]. N. Parsa, *Environmental factors inducing human cancers*, *Iranian Journal of Public Health*. 41 (2012) 1–9.
- [12]. D. Hanahan, R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*, 100 (2000) 57–70.
- [13]. D. Hanahan, R.A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*, 144 (2011) 646–674
- [14]. D. Hanahan, *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*, 12 (2022) 31–46.
- [15]. H.K. Matthews, C. Bertoli, Robertus, *Cell cycle control in cancer*, 23 (2021) 74–88.
- [16]. S. Ray, S. Panda, S. Nayak, Sudeshna Behera, S.S. Bhanja, V. Acharya, *A Review on Cell Cycle Checkpoints in Relation to Cancer*, *The Journal of Medical Sciences*. (2019).

- [17]. J.C. Limas, J. Cook, Preparation for DNA replication: the key to a successful S phase, 593 (2019) 2853–2867.
- [18]. D.R. Nelson, X. Ye, C. Hall, H. Santos, M. Tianlin, G. Kao, T.J. Yen, J. Wade Harper, P. Adams, Coupling of DNA Synthesis and Histone Synthesis in S Phase Independent of Cyclin/cdk2 Activity, 22 (2002) 7459–7472.
- [19]. Z. Wang, Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling, 10 (2021) 3327–3327.
- [20]. S. Santaguida, A. Musacchio, The life and miracles of kinetochores, 28 (2009) 2511–2531.
- [21]. C.J. Norbury, P. Nurse, ANIMAL CELL CYCLES AND THEIR CONTROL, 61 (1992) 441–468.
- [22]. Lucía Carolina Leal-Esteban, Lluís Fajas, Cell cycle regulators in cancer cell metabolism, 1866 (2020) 165715–165715.
- [23]. D. Santamaría, C. Barriere, A. Cerqueira, S.E. Hunt, C. Tardy, K.A. Newton, J.F. Cáceres, P. Dubus, M. Malumbres, M. Barbacid, Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle, 448 (2007) 811–815.
- [24]. G.R. Williams, K. Stoeber, The cell cycle and cancer, 226 (2011) 352–364.
- [25]. S. Zaman, R. Wang, V. Gandhi, Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies, 55 (2014) 1980–1992.
- [26]. M. Hassan, H. Watari, A.H. Abu-Almaaty, Yusuke Ohba, Noriaki Sakuragi, Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer, 2014 (2014) 1–23.
- [27]. C.M. Pfeffer, Amareshwar T.K. Singh, Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy, 19 (2018) 448–448.
- [28]. S. Goldar, Mahmoud Shekari Khaniani, Sima Mansoori Derakhshan, Behzad Baradaran, Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment, 16 (2015) 2129–2144.
- [29]. H. Liu, D. Su, J. Zhang, S. Ge, Y. Li, F. Wang, M. Gravel, A. Roulston, Q. Song, W. Xu, J. Liang, G.C. Shore, X. Wang, P. Liang, Improvement of Pharmacokinetic Profile of TRAIL via Trimer-Tag Enhances its Antitumor Activity in vivo, 7 (2017).
- [30]. Okezie Obasi Kanu, A.I. Mehta, C. Di, N. Lin, K. Bortoff, D.D. Bigner, H. Yan, D. Adamson, Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets, 13 (2009) 701–718.
- [31]. CBTRUS Fact Sheet 2022 - CBTRUS, CBTRUS. (2022). <https://cbtrus.org/cbtrus-fact-sheet-2022>
- [32]. Md. Sahab Uddin, Abdullah Al Mamun, B.S. Alghamdi, D. Tewari, Philippe Jeandet, Md. Shahid Sarwar, Ghulam Md Ashraf, Epigenetics of glioblastoma multiforme: From molecular mechanisms to therapeutic approaches, 83 (2022) 100–120.
- [33]. G. Marquet, O. Dameron, S. Saikali, J. Mosser, A. Burgun, Grading glioma tumors using OWL-DL and NCI Thesaurus, AMIA ... Annual Symposium Proceedings. AMIA Symposium. 2007 (2007) 508–12.
- [34]. Dong Ho Lee, Do Hyun Ryu, H.-S. Won, So Young Kwon, Advances in epigenetic glioblastoma therapy, 8 (2017) 18577–18589.

- [35]. E. KESKİN, Ö. ELMAS, H.A. AYDİN, K. ŞİMŞEK, E. GÜN, M. KALAYCI, Epidemiology, Treatment Options and Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme: A Retrospective Single Center Study, *Batı Karadeniz Tıp Dergisi*. 5 (2021) 248–255.
- [36]. M.C. Davis, Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment, 20 (2016) S2–S8.
- [37]. A. Mehmet, A. Üniversitesi, T. Fakültesi, N. Dalı, T. İstanbul, Y. Adresi, Koray, Ö. Koray, *Türk Nöroşir Derg* 29(3):305-334, 2019 Derleme, n.d.
- [38]. M. Yao, S. Li, X. Wu, S. Diao, G. Zhang, H. He, L. Bian, Y. Lu, Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy, 15 (2018) 737–739. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.159>.
- [39]. Roel G.W. Verhaak, K.A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M.D. Wilkerson, C.A. Miller, L. Ding, T.R. Golub, J.P. Mesirov, G. Alexe, M.S. Lawrence, M.E. O’Kelly, P. Tamayo, B.A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, Lakshmi Jakkula, H.S. Feiler, Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1, 17 (2010) 98–110.
- [40]. W. Wu, J.L. Klockow, M.Q. Zhang, F. Lafortune, E. Chang, L. Jin, Yang Chang Wu, H.E. Daldrop-Link, Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance, 171 (2021) 105780–105780.
- [41]. F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, Saima Mahmood Malhi, Shabana Usman Simjee, Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment, 18 (2017) 3–9.
- [42]. R. Holliday, Epigenetics: A Historical Overview, 1 (2006) 76–80.
- [43]. Jorge Alejandro Alegría-Torres, A.A. Baccarelli, V. Bollati, Epigenetics and lifestyle, 3 (2011) 267–277.
- [44]. Beran YOKUŞ, EPİGENOM ve EPİGENETİK, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. (2013) 5–13.
- [45]. Armstrong, L. Epigenetics .1st Edition, Garland Science, Chapter 5, 2014.
- [46]. S. Virani, J.A. Colacino, Jung Hyun Kim, L.S. Rozek, Cancer Epigenetics: A Brief Review, 53 (2012) 359–369.
- [47]. J.E. Audia, R.M. Campbell, Histone Modifications and Cancer, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 8 (2016) a019521–a019521.
- [48]. M.F. Fraga, E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, Gunnar Schotta, T. Bonaldi, C.E. Haydon, S. Roperro, K. Petrie, N. Gopalakrishna Iyer, A. Pérez-Rosado, E. Calvo, Juan Antonio Lopez, A. Cano, María José Calasanz, D. Colomer, M.A. Piris, N.G. Ahn, A. Imhof, Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer, *Nature Genetics*. 37 (2005) 391–400.
- [49]. Y. Lu, Y.T. Chan, H.Y. Tan, S. Li, N. Wang, Y. Feng, Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy, 19 (2020).
- [50]. Y. Kondo, K. Shinjo, Keisuke Katsushima, Long non-coding RNA s as an epigenetic regulator in human cancers, 108 (2017) 1927–1933.

- [51]. C. Busch, M. Burkard, C. Leischner, U.M. Lauer, J. Frank, S. Venturelli, Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer, *Clinical Epigenetics*. 7 (2015).
- [52]. D. Carlo, M. Choi, H.-U. Shin, H. Kim, Sung Wan Kim, Friend or Foe: Paradoxical Roles of Autophagy in Gliomagenesis, 10 (2021) 1411–1411.
- [53]. M. Vidak, D. Rozman, Radovan Komel, Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on Glial and Glioblastoma Multiforme Cells, 20 (2015) 19406–19432.
- [54]. A. Atiq, I.S. Parhar, Anti-neoplastic Potential of Flavonoids and Polysaccharide Phytochemicals in Glioblastoma, 25 (2020) 4895–4895.
- [55]. Aik Kia Khaw, J. Wei, Guruprasad Kalthur, M. Prakash Hande, Genistein induces growth arrest and suppresses telomerase activity in brain tumor cells, 51 (2012) 961–974.
- [56]. X. Liu, Q. Wang, B. Liu, X. Zheng, P. Li, T. Zhao, X. Jin, F. Ye, P. Zhang, W. Chen, Q. Li, Genistein inhibits radiation-induced invasion and migration of glioblastoma cells by blocking the DNA-PKcs/Akt2/Rac1 signaling pathway, 155 (2021) 93–104.
- [57]. Shilpa Puli, A. Jain, James, A. Bhushan, Effect of combination treatment of rapamycin and isoflavones on mTOR pathway in human glioblastoma (U87) cells., (2010).
- [58]. G. Williamson, The role of polyphenols in modern nutrition, 42 (2017) 226–235.
- [59]. D. Vattem, V. Maitin, FUNCTIONAL FOODS, NUTRACEUTICALS AND NATURAL PRODUCTS CONCEPTS AND APPLICATIONS, n.d. Chapter 15, 2016
- [60]. X. Han, T. Shen, H. Lou, Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, *International Journal of Molecular Sciences*. 8 (2007) 950–988.
- [61]. R. Tsao, Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, 2 (2010) 1231–1246.
- [62]. S.J. Maleki, J.F. Crespo, B. Cabanillas, Anti-inflammatory effects of flavonoids, 299 (2019) 125124–125124.
- [63]. Haneen Amawi, C.R. Ashby, A.K. Tiwari, Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what’s limiting?, 36 (2017).
- [64]. M. Daglia, Polyphenols as antimicrobial agents, 23 (2012) 174–181.
- [65]. A. Sundaresan, Thangaiyan Radhiga, B. Deivasigamani, Biological Activity of Biochanin A: A Review, 4 (2018) 1–5.
- [66]. A. Sarfraz, M. Javeed, Muhammad Raza Shah, G. Hussain, N. Shafiq, I. Sarfraz, A. Riaz, A. Sadiqa, R. Zara, S. Zafar, L. Kanwal, S.D. Sarker, A. Rasul, Biochanin A: A novel bioactive multifunctional compound from nature, 722 (2020) 137907–137907.
- [67]. S. Zhang, K. Sagawa, R.D. Arnold, E.E. Tseng, X. Wang, M.E. Morris, Interactions between the flavonoid biochanin A and P-glycoprotein substrates in rats: In vitro and in vivo, 99 (2010) 430–441.

- [68]. T Greg Peterson, J. Guo-Ping, J. Guo-Ping, K. Marion, C. Lori, N Falany Charles, B. Stephen, Metabolism of the isoflavones genistein and biochanin A in human breast cancer cell lines, 68 (1998) 1505S1511S.
- [69]. G. Peterson, S. Barnes, Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation, 22 (1993) 335–345.
- [70]. C. Yu, P. Zhang, L. Lou, Y. Wang, Perspectives Regarding the Role of Biochanin A in Humans, 10 (2019).
- [71]. G. Peterson, S. Barnes, Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 179 (1991) 661–667.
- [72]. T. Sehm, Z. Fan, R. Weiss, M. Schwarz, T. Engelhorn, N. Hore, A. Doerfler, M. Buchfelder, I.Y. Eyupoglu, N.E. Savaskan, The impact of dietary isoflavonoids on malignant brain tumors, *Cancer Medicine*. 3 (2014) 865–877.
- [73]. Y.N. Hsu, H.W. Shyu, T.W. Hu, J.P. Yeh, Y.W. Lin, L.Y. Lee, Y.T. Yeh, H. Dai, D.S. Perng, Shih Bin Su, Y.H. Huang, S.J. Su, Anti-proliferative activity of biochanin A in human osteosarcoma cells via mitochondrial-involved apoptosis, *Food and Chemical Toxicology*. 112 (2018) 194–204.
- [74]. G.K. Voeltz, M.M. Rolls, T.A. Rapoport, Structural organization of the endoplasmic reticulum, 3 (2002) 944–950.
- [75]. Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*. 6th Edition, Garland Science, Taylor and Francis Group, New York, Chapter 12, 2015.
- [76]. D.S. Schwarz, M.D. Blower, The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling, 73 (2015) 79–94.
- [77]. Lieberman M, Peet Alisa . Marks’ Tıbbi Biyokimyanın Esasları “Klinik Yaklaşım”. 1. Baskı, İstanbul : İstanbul tıp kitabevleri Yayınları, 2017.
- [78]. Özerol E. Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri. *Journal of Turgut Özal Medical Center*. 1996;3(3):257-275.
- [79]. Anken, E., & Sitia, R. 2016. The Endoplasmic Reticulum. *Encyclopedia of Cell Biology*, 156–167. Volume 2, 2016.
- [80]. D. Ron, P. Walter, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, 8 (2007) 519–529.
- [81]. Z. Sun, J.L. Brodsky, Protein quality control in the secretory pathway, 218 (2019) 3171–3187.
- [82]. Raj Kumar Yadav, S.-W. Chae, H.-R. Kim, H.-J. Chae, Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer, 19 (2014) 75–88.
- [83]. S.A. Oakes, Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells, 190 (2020) 934–946.
- [84]. M. Cnop, Fabienne Fougelle, L.A. Velloso, Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes, 18 (2012) 59–68.
- [85]. Sümeyra Çetinkaya, Hatice Gül Dursun, Endoplazmik Retikulum Stresinde Hücre Sağkalım ve Ölüm Kararı, *Sakarya Tıp Dergisi*. 6 (2016).
- [86]. P. Walter, D. Ron, The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation, 334 (2011) 1081–1086.

- [87]. S.-Y. Wang, R.J. Kaufman, The impact of the unfolded protein response on human disease, 197 (2012) 857–867.
- [88]. Raffaella Iurlaro, C. Muñoz-Pinedo, Cell death induced by endoplasmic reticulum stress, 283 (2015) 2640–2652.
- [89]. G.H. Stein, T98G: An anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro, 99 (1979) 43–54.
- [90]. Kiseleva LN;Kartashev AV;Vartanyan NL;Pinevich AA;Samoilovich MP, CHARACTERISTICS OF A172 AND T98G CELL LINES, Tsitologiya. 58 (2016).
- [91]. Orhan Tokur, A. Aksoy, In Vitro Sitotoksikite Testleri, 6 (2017) 112–118.
- [92]. Y. He, Q. Zhu, M. Chen, Q. Huang, W. Wang, Q.X. Li, Y. Huang, W. Di, The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer, 7 (2016) 70803–70821.
- [93]. B. Pläsier, D. Lloyd, G.C. Paul, C. Thomas, M. Al-Rubeai, Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay, 229 (1999) 81–95.
- [94]. Fluo-8 Calcium Flux Assay Kit - No Wash (ab112129) | Abcam, Abcam.com. (2023). <https://www.abcam.com/products/assay-kits/fluo-8-calcium-fluxassay-kit-no-wash-ab112129.html>
- [95]. C.W. White, J. Graham McGeown, Carbachol triggers RyR-dependent Ca<sup>2+</sup> release via activation of IP<sub>3</sub> receptors in isolated rat gastric myocytes, 542 (2002) 725–733.
- [96]. C.H. Dunphy, Applications of Flow Cytometry and Immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology, 128 (2004) 1004–1022.
- [97]. M. Imran, A. Rauf, Tareq Abu-Izneid, M. Nadeem, Mohammad Ali Shariati, I. Khan, M. Imran, Ilkay Erdogan Orhan, M. Rizwan, Muhammad Atif, Tanweer Aslam Gondal, M.S. Mubarak, Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review, 112 (2019) 108612–108612.
- [98]. H. Kikuchi, B. Yuan, X. Hu, M. Okazaki, Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents, American Journal of Cancer Research. 9 (2019) 1517–1535.
- [99]. S. Martucciello, M. Masullo, A. Cerulli, S. Piacente, Natural Products Targeting ER Stress, and the Functional Link to Mitochondria, 21 (2020) 1905–1905.
- [100]. V. Desai, A. Jain, Hoora Shaghghi, R. Summer, James, A. Bhushan, Combination of Biochanin A and Temozolomide Impairs Tumor Growth by Modulating Cell Metabolism in Glioblastoma Multiforme, 39 (2018) 57–66.
- [101]. A. Jain, James, A. Bhushan, Biochanin A inhibits endothelial cell functions and proangiogenic pathways, 26 (2015) 323–330.
- [102]. Q. Dong, Q. Li, L. Duan, H. Yin, X. Wang, Y. Liu, B. Wang, K. Li, X. Yao, G. Yuan, Y. Pan, Biochanin A Inhibits Glioblastoma Growth via Restricting Glycolysis and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation, Frontiers in Oncology. 11 (2021).
- [103]. M. Guo, S. Qu, H. Lu, W. Wang, M.-L. He, J.-L. Su, J. Chen, Y. Wang, Biochanin A Alleviates Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury by Suppressing Endoplasmic

- Reticulum Stress-Induced Apoptosis and p38MAPK Signaling Pathway In Vivo and In Vitro, *Frontiers in Endocrinology*. 12 (2021).
- [104]. Y. Li, H. Yu, F. Han, M. Wang, Y. Luo, J. Xie, Biochanin A Induces S Phase Arrest and Apoptosis in Lung Cancer Cells, 2018 (2018) 1–12.
- [105]. M. Markouli, Dimitrios Strepkos, A.G. Papavassiliou, C. Piperi, Targeting of endoplasmic reticulum (ER) stress in gliomas, 157 (2020) 104823–104823.
- [106]. Raj Kumar Yadav, S.-W. Chae, H.-R. Kim, H.-J. Chae, Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer, 19 (2014) 75–88.
- [107]. N. Gantenbein, E. Bernhart, I. Anders, N. Golob-Schwarzl, S. Krassnig, C. Wodlej, Luka Brcic, Joerg Lindenmann, N. Fink-Neuboeck, Franz Gollowitsch, E. Stacher-Priehse, M. Asslaber, M. Gogg-Kamerer, J. Rolff, J. Hoffmann, A. Silvestri, C. Regenbrecht, C. Reinhard, Anna-Maria Pehserl, M. Pichler, Influence of eukaryotic translation initiation factor 6 on non-small cell lung cancer development and progression, *European Journal of Cancer*. 101 (2018) 165–180.
- [108]. C. Chen, Z. Zhang, C. Liu, B.-Q. Wang, P. Liu, S. Fang, F. Yang, Y. You, X. Li, ATF4-dependent fructolysis fuels growth of glioblastoma multiforme, 13 (2022).
- [109]. Gülşah Evyapan, G. Ay, Gamze Cömertpay, H. Ümit Lüleyap, Tümörögenезisde endoplazmik retikulum stres cevabının rolü, 44 (2019) 241–248.
- [110]. Q. Tang, L. Ren, J. Liu, L. Wan, X. Zheng, J. Wang, G. Du, Withaferin A triggers G2/M arrest and intrinsic apoptosis in glioblastoma cells via ATF4-ATF3-CHOP axis, *Cell Proliferation*. 53 (2019). <https://doi.org/10.1111/cpr.12706>.
- [111]. Valérie Coronas, Elodie Terrié, N. Déliot, P. Arnault, B. Constantin, Calcium Channels in Adult Brain Neural Stem Cells and in Glioblastoma Stem Cells, 14 (2020).
- [112]. Nihal ÇİFTÇİ, Hücre İçi Kalsiyum Sinyali, Apoptoz ve Kanser Progresyonunda Kalsiyum Kanallarının (Voc, Trp ve Soc Kanalları) Rolü, *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 4 (2017) 1021–1027.
- [113]. J. Parkash, Kamlesh Asotra, Calcium wave signaling in cancer cells, 87 (2010) 587–595.
- [114]. E.G. Varlamova, M.V. Goltyaev, E.A. Turovsky, The Role of Selenoproteins SELENOM and SELENOT in the Regulation of Apoptosis, ER Stress, and Calcium Homeostasis in the A-172 Human Glioblastoma Cell Line, *Biology*. 11 (2022) 811–811.
- [115]. V. Desai, A. Bhushan, Natural Bioactive Compounds: Alternative Approach to the Treatment of Glioblastoma Multiforme, *BioMed Research International*. 2017 (2017) 1–10.
- [116]. Raghupathy Vengoji, M.A. Macha, S.K. Batra, N. Shonka, Natural products: a hope for glioblastoma patients, *Oncotarget*. 9 (2018) 22194–22219.

## **EKLER**

### **EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler**

1) Uluslararası Katılımlı Beslenme ve Metabolizma Sempozyumu / 16.12.22-17.12.22  
/Poster Sunumu

THE EFFECT OF BIACHONIN A, AN ISOFLAVONE, ON APOPTOSIS IN T98G  
GLIOMA CELLS Ezel Demir, Elif Merve Avcu, Beril Erdem Tunçdemir, Emel Sağlar  
Özer

2)34. Ulusal Biyokimya Kongresi/ 29.10.23-1.11.23 /Sözlü Bildiri

DETERMINATION THE EFFECT OF BIOCHANIN A ON T98G CELLS THROUGH  
THE CHANGE OF INTRACELLULAR CALCIUM LEVEL  
Ezel Demir, Beril Erdem Tuncdemir, Emel Saglar Ozer