



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ÇAY KAYNAKLI  
POLİFENOLLERİN FAZ I VE FAZ II ENZİM AKTİVİTELERİ İLE HÜCRE  
ÖLÜM MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİ

AYŞE MİNE YILMAZ  
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. A. Süha YALÇIN  
İSTANBUL-2016





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ÇAY KAYNAKLI  
POLİFENOLLERİN FAZ I VE FAZ II ENZİM AKTİVİTELERİ İLE  
HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI ÜZERİNE ETKİSİ

AYŞE MİNE YILMAZ  
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. A. Süha YALÇIN  
İSTANBUL-2016

## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Doktora  
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya  
Tez Sahibi : Ayşe Mine YILMAZ  
Tez Başlığı : Meme kanseri hücre hatlarında çay kaynaklı polifenollerin faz I ve faz II enzim aktiviteleri ile hücre ölüm mekanizmaları üzerine etkisi  
Sınav Yeri : Tıbbi Biyokimya  
Sınav Tarihi : 11/1/2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. A. Suha YALÇIN	Marmara Üniversitesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER	Marmara Üniversitesi	
Prof. Dr. Nazlı ARDA	İstanbul Üniversitesi	
Doç. Dr. Betül KARADEMİR	Marmara Üniversitesi	
Yrd. Doç. Dr. Pınar MEGA TİBER	Marmara Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 28.01.2014 tarih ve 60 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışım olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih

Ayşe Mine YILMAZ

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca, bu tezin hazırlanması ve tamamlanmasında destek olan başta tez danışmanım *Prof. Dr. A. Süha YALÇIN* olmak üzere değerli hocalarım *Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER'e, Prof. Dr. Goncagül HAKLAR'a, Prof. Dr. Önder ŞİRİKÇİ'ye, Doç. Dr. Betül KARADEMİR'e, Yard. Doç. Dr. Saime BATIREL'e, Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK'e, çalışma arkadaşım Ergül MUTLU ALTUNDAĞ'a, Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans ve doktora yapan tüm arkadaşlarıma, Betül Güngördü'ye, biricik Şenol Abi' me ve hayatım boyunca bana destek olup her zaman yanımda olan aileme...*

Teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (BAPKO) tarafından SAG-C-DRP-140115-0004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

<b>1. ÖZET .....</b>	<b>12</b>
<b>2. SUMMARY .....</b>	<b>13</b>
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>14</b>
<b>4. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>16</b>
4.1. Meme Kanseri .....	16
4.1.1. Meme kanseri ve polifenoller .....	16
4.2. Polifenoller.....	18
4.2.1. Flavonoidler .....	18
4.2.2. Fenolik asitler .....	27
4.2.3. Fenolik alkoller .....	29
4.2.4. Stilbenler.....	29
4.2.5. Lignans .....	29
4.3. Polifenollerin Biyoyararlanımı .....	30
4.3.1. Barsak emilimi .....	31
4.3.2. Konjugasyon mekanizması ve plazmada taşınma .....	32
4.3.3. Plazmadaki konsantrasyonları.....	33
4.3.4. Doku alımı .....	33
4.3.5. Boşaltım .....	34
4.4. Hücre Ölüm Yolakları.....	35
4.4.1. Apoptozis .....	35
4.3.2. Apoptozis Mekanizması.....	38
4.3.3. Nekrotozis .....	40
4.3.4. Otofajik Hücre Ölümü .....	45
4.3.5. Pyroptozis .....	49
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>51</b>
5.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	51
5.1.1. Kullanılan Cihazlar .....	51
5.1.2. Kullanılan Kimyasallar .....	52
5.2. Yöntemler.....	53
5.2.1. Yeşil ve siyah çay ekstralarının hazırlanması .....	53
5.2.2. LC/MS-MS Analizleri .....	53
5.2.3. Hücrelerin Çözülmesi .....	54

5.2.4.Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılmaları .....	54
5.2.5.Hücrelerin Sayılması.....	55
5.2.6.Hücre Canlılığının Belirlenmesi .....	55
5.2.7.Akış Sitometrisinde Apoptoz ve Nekroz Tayini .....	56
5.2.8.Akış Sitometrisinde ROS Miktarının Ölçülmesi.....	57
5.2.9.Akış Sitometrisinde Hücre Döngüsü Analizi.....	57
5.2.10.Faz I ve Faz II Enzim Deneyleri .....	58
5.2.11.Kullanılan İstatistik Yöntemler.....	59
<b>6.BULGULAR.....</b>	<b>60</b>
6.1.Yeşil ve Siyah Çay Ekstreleri .....	60
6.2.Polifenol Ekstrelerinin LC/MS-MS ile Analizi.....	60
6.2.1.Manual-tuning.....	60
6.2.2.MRM ve sch MRM çalışması .....	60
6.2.3.Validasyon çalışmaları.....	64
6.3.Hücre Kültürü Çalışmaları .....	66
6.3.1.Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması .....	66
6.3.2.Polifenollerin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi .....	66
6.3.3. Akış Sitometrisinde Annexin-V/PI ile Apoptoz Analizi.....	69
6.3.4.Polifenollerin ROS olan etkisinin incelenmesi .....	75
6.3.5.Polifenollerin hücre döngüsüne etkilerinin incelenmesi .....	78
6.3.7.Polifenollerin kinon redüktaz üzerine etkilerinin incelenmesi.....	84
6.3.6.Polifenollerin glutatyon transferaz üzerine etkilerinin incelenmesi.....	86
<b>8.KAYNAKLAR.....</b>	<b>97</b>
<b>9. EKLER.....</b>	<b>97</b>

## **KISALTMALAR**

EGCG:	Epigallokateşingallat
CDKi:	Siklin bağımsız kinaz inhibitörü
ARE:	Antioksidan yanıt elemanı
Nrf2:	Transkripsiyon benzeri-eritroit-2-salıcı factor
Cyt-c:	Sitokrom c
ROS:	Reaktif oksijen türleri
MAPK:	Mitojen aktive protein kinaz
NF- $\kappa$ B:	Nüklear faktör- kapa beta
DOX:	Doksorubisin
AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
DISC:	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
IMM:	İç mitokondrial membran
MPTP:	Mitokondri permabil geçiş porları
IMS:	İç mitokondial alan
CAD:	Kaspaz- aktive DNase
MMP:	Mitokondri membran permeabilizasyonu
RIPK:	Reseptör –ilişkili serin/trieonin kinaz
CICD:	Kaspaz bağımsız hücre ölümü

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4. 1. Polifenollerin sınıflandırılması. ....	18
Şekil 4. 2. Kuersetin yapısı. ....	19
Şekil 4. 3. İzoflavonların genel yapısı.....	21
Şekil 4. 4. Kateşinlerin genel yapısı.....	22
Şekil 4. 5. Gallokateşin, epigallokateşin, epigallokateşingallat genel yapısı. ....	24
Şekil 4. 6. Teaflavin ve tearubigin kimyasal yapısı. ....	26
Şekil 4. 7. Hidroksisinnamik asit. ....	27
Şekil 4. 8. Nekroptozis mekanizması (Stephan ve ark., 2014). ....	43
Şekil 4. 9. Otofajik hücre ölüm mekanizması (Stephen ve ark., 2014).....	46
Şekil 4. 10. Otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki (Stephan ve ark., 2014). ....	49
Şekil 6. 1. Sch Negatif MRM taraması. ....	63
Şekil 6. 2. Sch Pozitif MRM taraması. ....	63
Şekil 6. 3. Epigallokateşin galat standart grafiği.....	63
Şekil 6. 4. MCF-7 Hücrelerinde yeşil çayın canlılığa etkileri.....	66
Şekil 6. 5. MCF-7 hücrelerinde siyah çayın canlılığa etkileri.....	66
Şekil 6. 6. MDA MB-231 hücrelerinde yeşil çayın canlılığa etkileri. ....	67
Şekil 6. 7. MDA MB-231 hücrelerinde siyah çayın canlılığa etkileri.....	67
Şekil 6. 8. MCF-7 hücrelerinde Annexin-V/PI analizi. ....	70
Şekil 6. 9. MCF-7 hücrelerinde yeşil çay polifenollerinin apoptotik etkileri. ....	71
Şekil 6. 10. MCF-7 hücrelerinde siyah çay polifenollerinin apoptotik etkileri.....	71
Şekil 6. 11. MDA MB-231 hücrelerinde Annexin-V/PI analizi. ....	73
Şekil 6. 12. MDA MB-231 hücrelerinde yeşil çay apoptoz sonuçları. ....	74
Şekil 6. 13. MDA MB-231 hücrelerinde siyah çay apoptoz sonuçları. ....	74
Şekil 6. 14. MCF-7 hücrelerinde ROS analizi. ....	76
Şekil 6. 15. MCF-7 hücrelerinde yeşil çay polifenollerinin ROS'a olan etkisi. ....	77
Şekil 6. 16. MCF-7 hücrelerinde siyah çay polifenollerinin ROS'a etkisi. ....	77
Şekil 6. 17. MCF-7 hücre döngüsü analizi.....	79
Şekil 6. 18. MCF-7 hücre döngüsüne yeşil çay etkileri. ....	80
Şekil 6. 19. MCF-7 hücre döngüsüne siyah çay etkileri. ....	80
Şekil 6. 20. MDA MB-231 hücre döngüsü analizi.....	82
Şekil 6. 21. MDA MB-231 hücre döngüsüne yeşil çay etkileri.....	83
Şekil 6. 22. MDA MB-231 hücre döngüsüne siyah çay etkileri. ....	83
Şekil 6. 23. MCF-7 hücrelerinde QR aktivitesi. ....	84
Şekil 6. 24. MDA MB-231 hücrelerinde QR aktivitesi. ....	85
Şekil 6. 25. MCF-7 hücrelerinde GST aktivitesi. ....	86
Şekil 6. 26. MDA MB-231 hücrelerinde GST aktivitesi. ....	87

## **TABLULARIN LİSTESİ**

Tablo 6. 1.Manual-tunnig ve MRM çalışmaları. ....	61
Tablo 6. 2. Standartların LOD, LOQ ve RT değerleri. ....	61
Tablo 6. 3.Standart grafiklerin R <sup>2</sup> değerleri ve denklemleri.....	61
Tablo 6. 4. Validasyon çalışmalarının sonuçları.....	64
Tablo 6. 5. Yeşil ve siyah çayın polifenol içeriği (µg/mL).....	65

**Tezin adı: Meme kanseri hücre hatlarında çay kaynaklı polifenollerin faz I ve faz II enzim aktiviteleri ile hücre ölüm mekanizmaları üzerine etkisi.**

**Öğrenci: Ayşe Mine Yılmaz**

**Danışman: Prof. Dr. A. Suha Yalçın**

**Anabilim Dalı: Tıbbi Biyokimya**

## **1. ÖZET**

**Amaç:** Çalışmamızda siyah ve yeşil çay polifenollerinin meme kanser hatları üzerine antiproliferatif etkisi incelenmiştir. Siyah ve yeşil çay ekstralarının etkileri faz I, faz II enzimleri üzerinden değerlendirilmiş, ayrıca bu polifenollerin hücre döngüsü ile apoptoz ölüm mekanizmasına olan etkileri de incelenmiştir.

**Gereç ve yöntem:** Çay örneklerinden ekstrakte edilen polifenoller püskürtmeli kurutucu yardımı ile toz haline getirilmiş ve LC-MS-MS yöntemi kullanılarak polifenol içerikleri belirlenmiştir. Elde edilen polifenol ekstralarının meme kanser (MCF-7 ve MDA MB-231) hücrelerinde canlılık, apoptoz ve hücre döngüsü üzerine olan etkileri akış sitometri yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca, kinon redüktaz (QR) ve glutasyon transferaz (GST) aktivitelerinin ölçümü yapılmıştır.

**Bulgular:** MCF-7 hücrelerinde çay polifenollerinin apoptoz ve nekrozu birlikte anlamlı bir şekilde arttırırken MDA MB-231 hücrelerinde bu etki gözlenmemiştir. MCF-7 hücrelerinde çay polifenollerinin kinon redüktaz aktivitesini arttırırken, MDA MB-231 hücrelerinde kontrol grubuna göre bir değişiklik görülmemiştir. MCF-7 hücrelerinde yeşil çay uygulaması ile glutasyon transferaz aktivitesinin arttığı tespit edilirken, siyah çay uygulandığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. MDA MB-231 hücrelerine çay polifenollerinin uygulaması ile GST aktivitesi azalmıştır.

**Sonuç:** Polifenollerin meme kanseri hücre hatlarının moleküler özelliklerine bağlı olarak farklı yolları aktive ettiği gösterilmiştir. MCF-7 hücreleri polifenol etkilerine karşı MDA MB-231 hücrelerinden daha hassastır. Polifenoller MCF-7 hücrelerinde apoptotik bir ölümü desteklemekte, MDA MB-231 hücrelerinde ise farklı ölüm yollarını aktive etmektedir. Polifenollerin meme kanser hücrelerindeki faz I ve faz II enzim aktivitesini farklı bir şekilde etkilediği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler: Meme kanseri, Polifenoller, Hücre ölümü, Hücre döngüsü, Enzim aktivitesi.**

**Thesis name: Effect of tea polyphenols on phase I and phase II enzyme activities and cell death mechanism in breast cancer cells.**

**Student: Ayşe Mine Yılmaz**

**Supervisor: Prof. Dr. A. Suha Yalçın**

**Department: Biochemistry**

## **1. SUMMARY**

**Purpose:** In this study the antiproliferative effect of green and black tea polyphenols on breast cancer lines was investigated. The effects of polyphenol extracts on phase I and phase II enzymes were evaluated. Also, the effects of these polyphenols on apoptotic cell death mechanisms were investigated.

**Materials and methods:** Polyphenols extracted from tea samples were transferred into powder form with spray drying and their polyphenol contents were determined using LC-MS-MS method. Extracts were then applied to breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA MB-231) and their effects on cell viability, apoptosis and cell cycle were investigated by flow cytometry. Additionally activities quinone reductase (QR), glutathione transferase (GST) were determined.

**Results:** Tea polyphenols increased apoptosis and necrosis in MCF-7 cells. This effect was not observed in MDA MB-231 cells. Tea polyphenols increased quinone reductase activity in MCF-7 cells but for MDA MB-231 cells almost no change in activity was observed compared to the control group. When glutathione transferase activity was examined in MCF-7 cells, only increased activity was observed for green tea. In MDA MB-231 cells GST activity was decreased after tea polyphenols application.

**Conclusion:** Polyphenols have been shown to effect different pathways depending on the molecular properties of breast cancer cell lines. MCF-7 cells were more sensitive to the effects of polyphenols than MDA MB-231 cells. Polyphenols induced apoptotic cell death in MCF-7 cells, whereas in MDA MB-231 cells different death pathways were activated. Polyphenols are thought to effect phase I and phase II enzyme activities of breast cancer cells in different ways.

**Keywords: Breast cancer, Polyphenols, Cell death, Cell cycle, Enzyme activities.**

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Polifenoller, kateşinleri de içeren bitki kimyasallarının büyük bir grubu olup, geneksel tıpta kullanılan bitkilerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin büyük bir kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Cabrerave ark.,2006). Kanserden kimyasal korunmada kullanılan doğal veya sentetik bileşikler kanser başlangıcı ve gelişimini geri çevirme, karsinojen etkiyi ortadan kaldırma ya da baskılamada kullanılmıştır. Kimyasal korunmada etkili bir strateji de karsinojenlerin sebep olduğu DNA hasarının önlenmesine yöneliktir. Reaktif karsinojen maddeler Faz I ve Faz II enzimleri yardımıyla redükte formlara dönüştürülerek zarar en aza indirgenmeye çalışılmaktadır. Faz I enzimleri baskın olarak sitokrom P-450 sistemi tarafından işlenen ksenobiyotik metabolizmasıyla ve/veya faz II enzimleri yardımıyla detoksifiye edilerek ara reaktiflere dönüştürülür (Patel ve ark.,2008).

Farklı diyet içeriklerinde bulunması açısından çay polifenollerinin karsinojen metabolizmaya olan etkileri bir kaç ön-klinik çalışmanın konusu olmuştur (Chen ve ark.,2005). Ancak bu konuda yapılmış çalışmaların çoğu yeşil çay polifenollerini üzerine yoğunlaşmıştır. Siyah çay, yeşil çay polifenollerinin yanı sıra bunların kimyasal olarak benzeri olan heterojen farklı polimerleride içermektedir. Krishnan ve ark.'nın yaptığı çalışmada siyah çay polifenollerinin fare deri ve kolorektal kanser türlerinde DNA'yı koruyucu etkisi gösterilmiştir (Patel ve ark.,2008). Buna bağlı olarak siyah çay polifenollerinin Faz II detoksifikasyon enzimleri üzerine etkisi incelenmiştir. Faz II enzimleri ortak düzenleyici bölge olan antioksidan-yanıt elemanına (ARE) bağlı olarak düzenlenmektedir (Hayes ve ark.,2001). Faz II enzimlerinin düzenlenmesi transkripsiyon benzeri-eritroit-2-salıcı faktör (Nrf2) aracılığıyla gerçekleşmektedir, bu nükleer faktör basit lösin fermuar yapılı transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir (Chen ve ark.,2005). Nrf2 aktivasyonu farklı transkripsiyonel ve post transkripsiyonel modifikasyonlarla sağlanmaktadır (Huang ve ark.,2002). Çay polifenollerinin indüklediği ARE aktivasyonunun Nrf2 ekspresyonu ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Huang ve ark., 2002).

Çay polifenollerinin farklı kanser hücre hatlarında, hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda anti tümör etkisi çalışılmıştır. Mesela 20 farklı tümör hattında çalışılan EGCG'nin anti tümör etkisi ve büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Akciğer, deri, özafagus, karaciğer kanseri başta olmak üzere farklı hayvan modellerinde çayın karsinogenezisi inhibe edici etkisi gösterilmiştir. Bunun yanı sıra yeşil çay polifenollerinin tümör büyümesi, metastas ve angiogenesis ile ilişkili matriks metalloproteinaz (MMP)-2, MMP-9 ve CD-31 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca farelere topikal olarak uygulanan polifenollerin, DMBA indüklü deri tümörü oluşumunu %32-60 azalttığı, tümör odaklarının ise %49-63 oranında azaldığı gösterilmiş aynı çalışmada tümör hacminin %73-90 arasında küçüldüğü tespit edilmiştir (Katiyar ve ark., 1997). Kafeini uzaklaştırılmış ekstraktlar kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise N-nitrozometilbenzamin-indüklü özafagus kanser modelinde sıçanlarda tümör insidansı ve odağı yaklaşık %70 oranında azalmıştır (Wang ve ark.,1995).

Farklı grupların yayınladığı çalışmalara göre, (-)-EGCG servikal kanserlerde büyümenin inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesinde kritik rol oynayan bir ajandır. Servikal kanserlerde görülen bu etkiyi telomeraz aktivitesindeki inhibisyona bağlı olarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Noguchi ve ark.,2006). Ayrıca bu kanser türünde ilaç direncinin baskılanmasında da önemli olduğu bildirilmiştir (Spinella F ve ark.,2006). Meme kanser hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde yapılan bir çalışmada EGCG, resveratrol ve gamma-tokaferol kombinasyonun hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Hseih ve ark.,2008). Başka bir çalışmada da EGCG'nin viral kaynaklı fare meme kanser modelinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

Çalışmamızda diyetimizin bir parçası olan çay polifenollerinin meme kanser hatları üzerine etkisi incelenecek, ekstraktlardan elde edilecek olan polifenollerin etkileri faz I ve faz II enzimleri üzerinden değerlendirilecektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Meme Kanseri**

Meme kanserinin kadınlar için geniş bir popülasyonda ve giderek artan oranda tehlike oluşturması nedeni ile hastalığın önlem, tanı, izlem ve tedavisini içeren birçok araştırma yapılmıştır. Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümörlerden biri olup kadınlarda görülen tüm kanserlerin %30'undan fazlasını oluşturmaktadır (Andersdon ve ark., 2007). Günümüzde mamografi, meme kanseri tarama yöntemi olarak önerilmekte ve 40 yaşından itibaren her kadın için hastalığı saptamakta en önemli silah olarak yerini korumaktadır. Risk faktörüne bağlı olarak değişmekle birlikte 40-50 yaş arası hastalarda 1-2 yılda bir, 50 yaşından sonra ise yılda bir yapılmasının üzerinde durulmaktadır. Hastaların hemen tamamını erken evrede yakalayabilmek için tarama mamografisinin yanı sıra çok daha kolay, uygulanabilir ve ucuz olan yöntem; tüm kadınların puberteden sonra ayda bir kendini muayene etmesidir. Ayrıca, 30 yaşından itibaren yılda bir doktor veya eğitilmiş kişiler tarafından klinik muayene de önerilmektedir. Kanseri, hücrenin normal döngüsünü kaybederek, hücre ölüm yolaklarına duyarsızlaşması ve kontrolsüz şekilde bölünmesidir. Hücre bölünmesinin her aşamasında genetik kontrol mekanizmaları görev alır. Hücreler davranışlarını düzenlemek için kontrol olarak görev yapan ve nasıl davranmaları gerektiğini anlatan karmaşık sinyaller alır, gönderir ve yorumlarlar. Bunun sonucunda her hücre aldığı sinyaller doğrultusunda gerekli zamanda bölünür, farklılaşır, değişimini durdurur veya ölür. Bir mutasyon sonrasında kontrol mekanizmalarındaki bir aksaklık söz konusu ise daha hızlı bölünebilen kontrolsüz bir hücre meydana gelebilir.

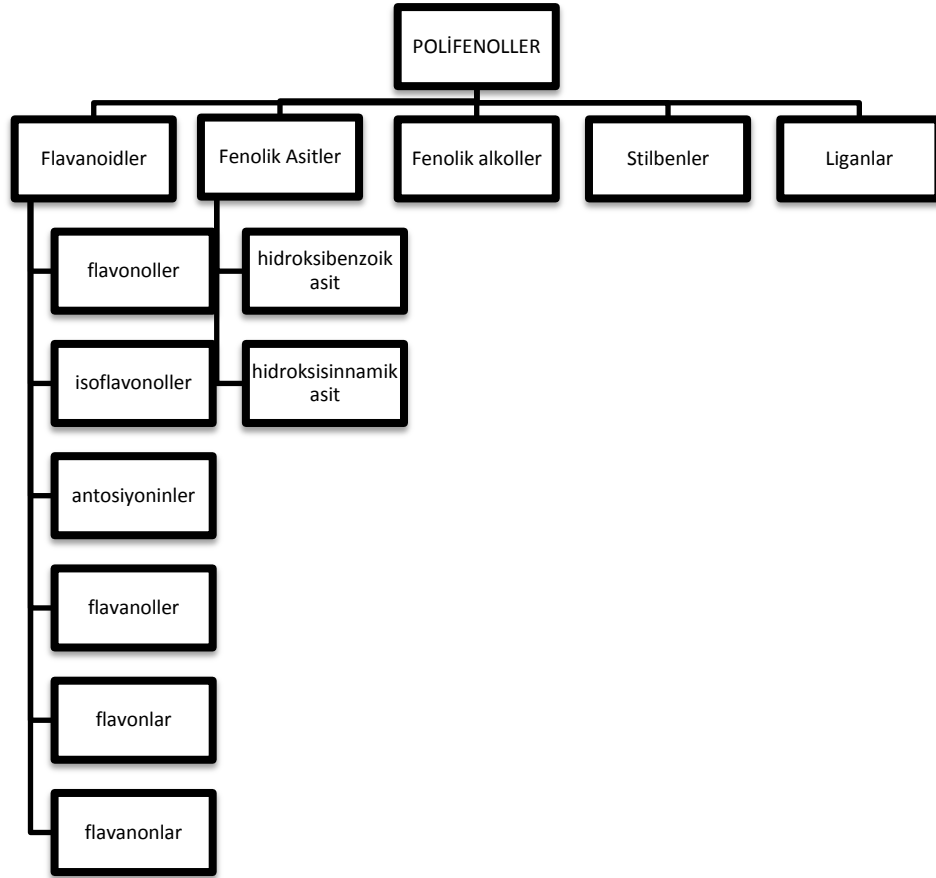
#### **4.1.1. Meme kanseri ve polifenoller**

Polifenoller, kateşinleri de içeren bitki kimyasallarının büyük bir gurubu olup, genetik tıpta kullanılan bitkilerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin büyük bir kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Cabrea ve ark., 2006). Kanserden kimyasal korunmada kullanılan doğal veya sentetik bileşikler kanser başlangıcı ve gelişimini geri çevirme, karsinojen etkiyi ortadan kaldırma ya da baskılamada kullanılmıştır. Kimyasal korunmada etkili bir strateji de karsinojenlerin sebep olduğu DNA hasarının önlenmesine yöneliktir. Reaktif karsinojen maddeler faz I ve faz II

enzimleri yardımıyla redükte formlara dönüştürülerek zarar en aza indirgenmeye çalışılmaktadır. Faz I enzimleri baskın olarak sitokrom P-450 sistemi tarafından işlenen ksenobiyotik metabolizmasıyla ve/veya Faz II enzimleri yardımıyla detoksifiye edilerek ara reaktiflere dönüştürülür (Patel ve ark., 2008). Farklı diyet içeriklerinde bulunması açısından çay polifenollerinin karsinojen metabolizmaya olan etkileri bir kaç ön-klinik çalışmanın konusu olmuştur (Chen ve ark., 2005). Çay polifenollerinin indüklediği ARE aktivasyonun Nrf2 ekspresyonu ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Patel ve ark., 2008). Kanseri gelişiminin başlangıcı sayılan genetik materyalin değişimi DNA'ya baz eklenmesi, baz silinmesi ve/veya çerçeve kayması gibi basit mutasyonları içerir (Pitot ve ark 1993). Bununla birlikte genetik materyaldeki değişiklikler gen fonsiyonlarının değişmesi, histon modifikasyonları, transkripsiyonal aktivitenin değişmesi ve DNA metilasyonlarını içermektedir (Baylin ve ark., 2006). Kanserdeki ikinci aşama ise gen aracılı promoter-reseptör interaksyonlarında geri dönüşümsüz değişikliklerin meydana gelmesidir. Son aşama ise karyotipik instabilite ile karakterizedir, buna bağlı olarak genetik hatanın tekrarı ve devamını içeren hücrelerin malignant büyümeye sebep olduğu görülmektedir (Pitot ve ark., 1991). Kimyasal korunmada amaç doğal ve yapay bileşiklerle kansere sebep olabilecek değişiklikleri önlemektir (Khan ve ark., 2006). Farklı birçok çalışma da bu kimyasal korumanın çay polifenollerini ile sağlandığı gösterilmiştir (Spinella ve ark., 2006). Diyetle alınan bileşikler karsinojenik prosede önemli hücre sinyal yollarını düzenleyerek kimyasal koruyucu etkilerini gösterirler (Umemura ve ark., 2003). Bunu yanı sıra farklı çalışmalarda diyet kaynaklı bileşiklerin kanser oluşum sürecini uzattıkları gösterilmiştir (Khan ve ark., 2006). Mesela yeşil çay polifenollerinin karsinogenesiste önemli biyolojik yolları farklı şekilde etkilediği gösterilmiştir. Bu etki genel olarak yeşil çay içeriğinde bulunan epigallo kateşin gallat (EGCG) aracılığı ile sağlanmaktadır. Bu maddenin sentetik analogları da birçok çalışmada ön-ilaç olarak kullanılmış ve moleküler hedeflerinin bir kısmı aydınlatılmıştır. Çay polifenollerinin farklı kanser hücre hatlarında, hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda anti tümör etkisi çalışılmıştır. Mesela 20 farklı tümör hattında çalışılan (-) EGCG'nin anti tümör etkisi ve büyümeyi inhibe edici gösterilmiştir. Akciğer, deri, özafagus, karaciğer kanseri başta olmak üzere farklı hayvan modellerinde çayın karsinogenesisi inhibe edici etkisi gösterilmiştir.

## 4.2. Polifenoller

Diyetlerimizde en fazla bulunana antioksidan maddeler olan polifenoller, başlıca sebze, meyve, bitkilerin kökleri, çikolata, kahve, çay ve şarapta bulunmaktadır (D'Archivio ve ark.,2007). Tüm polifenoller aromatik halka sayıları ve yapılarındaki elementlere bağlı olarak sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre; flavanoidler, fenolik asitler, fenolik alkoller, stilbenler ve liganlar olmak üzere beş ana gruba ayrılır (Şekil 4.1.) (D'Archivio ve ark., 2007).



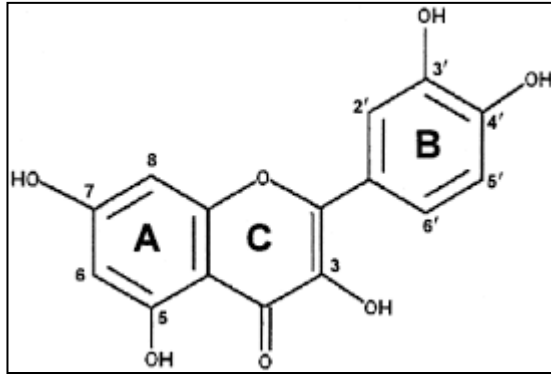
Şekil 4. 1. Polifenollerin sınıflandırılması.

### 4.2.1. Flavanoidler

Flavanoidler polifenolelerin en büyük grubu olup, flavonoller, isoflavonlar, antosiyaninler, flavanoller, flavonlar ve flavanonlar olmak üzere altı sınıfa ayrılır. Flavonoid grubuna ait olan maddeler yapılarında iki benzen halkası ve bunları birbirine bağlayan üç karbonlu bir zincir içermektedir. Difenil propan yapısındaki bileşiklerdir.

#### 4.2.1.1. Flavonoller

Kuersetin (3,3',4',5,7-penta hidroksi flavon) yiyeceklerde en fazla bulunan flavonoldür. Turpgiller, gebre otu, üzüm, soğan, elma, domates, yaban mersini, çay ve kırmızı şarap başta olmak üzere birçok besinde değişik miktarlarda bulunmaktadır (Kelly, 2011). Kuersetin ve glikozillenmiş formları ortalama bir diyetin yaklaşık %60-75'ni oluşturmaktadır (Bouktaib ve ark., 2002). Kuersetin yapısındaki üç önemli ve fonksiyonel grup bulunmaktadır, bu grupların antioksidan aktiviteden sorumlu oldukları düşünülmektedir. Bu gruplar 4-okso grubunun 2,3-alken ile konjugasyonu, 3 ve 5-hidroksil grupları ile B halkasındaki o-dihidroksil grubudur (Bors ve ark., 1990).



Şekil 4. 2. Kuersetin yapısı.

Kuersetinin antioksidan özelliklerinden serbest radikal süpürücü etkisi  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  gibi geçiş metal iyonları ile şelat oluşturabilmesine dayanmaktadır. Kuersetinin farmakolojik özellikleri, inflamasyon (Chirumbolo, 2010), ateroskleroz (Ishizawa ve ark.,2011), hipertansiyon (Perez-Vizcaino ve ark., 2009), nörodejenerasyon (Kelsey ve ark., 2010) dahil olmak üzere birçok hastalıkta incelenmiştir. Sıçanlarda geliştirilen nörotoksin indüklü Parkinson modelinde kuersetinin, ETC kompleks I inhibitörü olan rotenon antidodu gibi çalıştığı ve normal ve hasar görmüş dopaminerjik nöronlarda kompleks aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Kuersetin ile ön-tedavi sonrasında rotenon-indüklü OH- oluşumu azalmış, endogenous antioksidan enzim (CAT-SOD) aktivitesi artmıştır (Karuppagounder ve ark.,2013).

Düşük konsantrasyonlar da kuersetinin, non-steroid anti inflamatuvar ilaçların (aspirin, indometasin, diclofenac, piroksikam, ibuprofen vb.) etkisiyle mitokondri kompleks I'in inhibisyonunu önlediği sıçan duodenum epiteli ve Caco-2 hücrelerinde

gösterilmiştir. Bu koruyucu etki koenzim-Q taklit eden, elektronların elektron transport zinciri boyunca akışını sağlayan yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir (Sandoval-Acuña ve ark.,2012). Hepatik mitokondrilerde, kronik alkol alımından önce kuersetin alınımıyla lipit infiltrasyonun ve membran kopmalarının azaldığı, ethanol-indüklü ROS üretiminin hafiflediği görülmüştür. Ayrıca lipid peroksidasyonun azaldığı, GSH tükenmesi ve Mn-SOD inaktivasyonun geri çevrildiği tespit edilmiştir. Ethanolle beslenen farelerde, kuersetinin oksidatif stresi azatlığı, mitokondri membran potansiyelini normalize ettiği gösterilmiştir (Tang ve ark.,2012). Bir kardio-protektif ajan olarak olarak kuersetin ve  $\alpha$ -takoferolün kullanıldığı, isoprotrenol indüklü miyokard-enfaktüs modelinde sıçanlarda, kalp dokusunun korunması, normal mitokondrial fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. Kuersetin ve  $\alpha$ -takoferolün kalp miyokard hasarında koruyucu etkileri radikal süpürücü etkilerine bağlı olarak, mitokondri lipit peroksidasyonunu önlemeleri ile ilişkilendirilmiştir. Her iki ajanın uygulandığı sıçanlarda GSH-bağımlı enzim aktivitesi ve GSH seviyeleri normale dönmüştür. Kalsiyum seviyelerine bağlı olarak, ATP seviyeleri, mitokondrial membran fonksiyonları ve yapısı korunmuş, iyonik gradientin azalması önlenmiştir (Punithavathi ve Stanely Mainzen Prince, 2010).

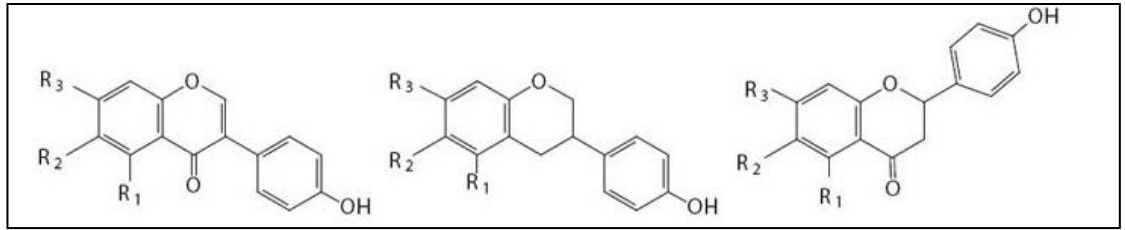
Kuersetinin bu yararlı etkilerine ek olarak farklı kanser hatlarında apoptozisi aktive ettiği bildirilmiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, hücre proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği ve NF- $\kappa$ B (Youn ve ark., 2013) down-regülasyonu ile apoptotik hücre popülasyonunu arttırdığı servikal kanserlerde gösterilmiştir (Vidya Priyadarsini ve ark., 2010). Aynı hücre hatlarında kuersetin etkisiyle pro-apoptotik Bax proteini ekspresyonu artarken, sitozolik cyt-c, Apaf-1, p53, kaspas-9 ve -3 ayrıca kesilmiş poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) miktarları artmıştır. Buna karşılık olarak anti-apoptotik AKT, Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 ekspresyonları azalmıştır (Bishayee ve ark., 2013). Kuersetin uygulanan fare nöroblastoma hücrelerinde uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak Bax protein ekspresyonu, kaspas-3 ve-9 aktivasyonu, artmıştır.Hücre döngüsü düzenleyici proteini olan p53 mRNA seviyeleri anlamlı derecede artmıştır (Sugantha Priya ve ark., 2014).

Pro-apoptotik etkilerine ek olarak kuersetin kritik hücre döngüsü düzenleyicileri (siklin D1 ve siklin B1) üzerindeki etkisi ve PPAR aktivasyonu, prenoplastik

hepatositlerde çalışılmış hücre proliferasyonunu durdurduğu ve karaciğer lezyonlarını azalttığı bildirilmiştir (Casella ve ark., 2014). Kuersetin, hücre büyümesini inhibe ederek epidermoid karsinomlarda mitokondrial yolağı kullanarak, apoptosisi indükler (Zhang ve ark., 2013).

#### 4.2.1.2. İzoflavonlar

İzoflavonların ana kaynağı soyadır ve üç farklı molekül içerir. Baklagillerde bolca bulunurlar. Basit yapıları flavon çekirdek ve iki benzen halkasında oluşup, heterosiklik piren halkalarının genel adıdır.



Şekil 4. 3. İzoflavonların genel yapısı.

Genistein olarak bilinen izoflavon, yapı ve aktivite itibari ile 17-β estradiole benzediğinden, fitoöstrojen olarak bilinir (Banerjee ve ark., 2008). Farmakolojik olarak güvenli bir molekül olması sayesinde son yıllarda genistein üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Literatürde meme kanseri (Messina ve Wood, 2008;), prostat kanseri (Dixon ve Ferreira, 2002), kardiyovasküler hastalıklar (Wenzel ve ark., 2008), obezite (Orgaard ve Jensen, 2008) ve osteoporosise (Ma ve ark., 2008) karşı koruyucu etkilerine ait makalelere ulaşmak mümkündür.

Genistein koruyucu etkisi farklı bozuklukların düzeltilmesi ile ortaya çıkar, bunlar oksidatif stresin düzenlenmesi, farklı antioksidan sinyal yollarının aktivasyonu ve apoptotik yolların aktivasyonu şeklindedir. Örneğin, genel genistein koruma mekanizmalarından biri AKT yaşam yolağının düzenlenmesini içerir, prostat, meme ve pankreatik kanserlerde bu yolağın inhibisyonu ile apoptotik yolağın aktivasyonu gerçekleşir (Banerjee ve ark., 2007).

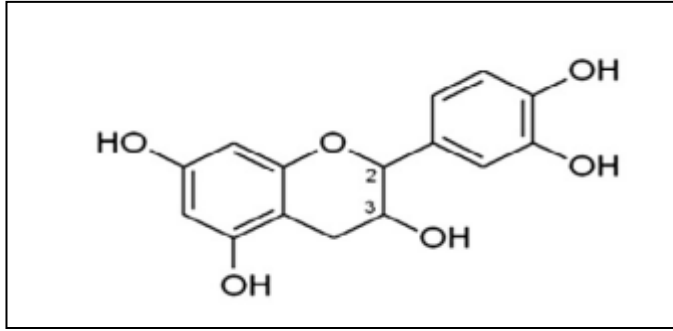
#### 4.2.1.3 Flavanoller

Flavanoller flavanoidlerin diğer sınıflarından farklı olarak, yiyeceklerde glikozillenmiş formlarda bulunmazlar. Bu grubun asıl temsilcileri olarak görülen

epikaşin ve kateşin özellikle meyze, sebze ve çayda bulunur, antioksidan özellikleri yüksektir (Scalbert ve William-son, 2000).

#### 4.2.1.3.1 Kateşin

Kateşinler özellikle meyvelerin çekirdek ve kabuklarında bulunmaktadır, ilk keşfedilen kateşinlermeyveden izole edilmiştir (Renaud ve de Lorgeril, 1992). Kateşinler iki benzen halkası ve bir dihidropiran halkası içeren üçüncü karbonunda ise bir OH grubu bulunduran yapılardır.



Şekil 4. 4. Kateşinlerin genel yapısı.

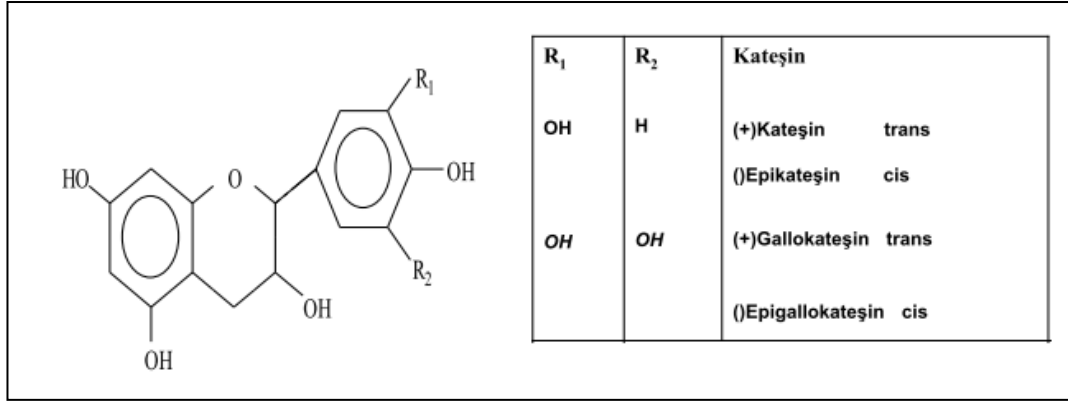
Güçlü anti-oksidan ve anti-kanser etkilerine sahip olduklarından, son yıllarda kateşinler üzerine yapılan çalışmaların sayısı oldukça artmıştır (Siddiqui ve ark., 2008). Kateşinlerin fare karaciğerini tamoksifen-indüklü oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi, lipid peroksidasyonu, protein karbonilasyonu, süperoksit üretimi, azaltıp, antioksidanların miktarınıartırarak, ROS kaynaklı hastalıklara karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (Tabassum ve ark., 2007).

Kateşinlerin etki mekanizmaları aydınlatmak amacı ile sıçan karaciğer hücrelerinde yapılan bir çalışmada, kateşinlerin hücreleri kuersetin gibi apoptoza götürdüğünü ancak kuersetinden farklı olarak mitokondri ATP seviyeleri üzerine etki yapmadığını göstermiştir (Dorta ve ark., 2005). N-metil-N-nitrozüre uygulanarak indüklenen katarakt modelinde, lens epitelial hücrelerine kateşin uygulandığında, Bax/Bcl-2 oranındaartış ve kaspaz-3 ekspresyonunda ise baskılanma ile apoptozda azalma gösterilmiştir (Lee ve ark., 2010). Benzeretkiler dokstrubisin (DOX)-indüklü toksisite modelinde sıçan kalp hücreleri olan H9C2 hücrelerinde de rastlanmıştır. Bu hücrelere kateşin uygulandığında, DOX-indüklü ROS birikimi azalmış, apoptotik hücre sayısı düşmüş, DNA'nın fragmentasyonu azalmış, apoptotik sinyal inhibe olurken, artan Bax/Bcl-2 oranı baskılanarak, kaspaz-3 ve -9 aktivasyonlarının inhibe

olduğu gösterilmiştir (Du ve Lou, 2008). İnsan karaciğer hücrelerine (HepG2) kateşin uygulaması yapılan başka bir çalışmada ise karaciğeri koruyucu etkisi ve anti kanser etkilerine vurgu yapılmıştır (Jain ve ark.,2013). Kaspaz aktivasyonun etkisinden korunma kısmen kaspaz-3 ve kaspaz-8 üzerinden gerçekleşmektedir, bu etki pimer sıçan serebral kortikal nöronlarında (Ban ve ark., 2006) ve fare sinir büyüme faktörü kullanılarak farklılaştırılmış PC12 hücrelerinde gösterilmiştir (Lin ve ark., 2009).

#### **4.2.1.3.2 Gallokateşin, epigallokateşin ve epigallokateşingallat**

ay gallokateşin, epigallokateşin (EGC) ve epigallokateşingallat (EGCG) gibi flavanollerin en fazla içeren kaynaklardan biridir. (-)-Epigallokateşin-3-gallat bir EGC (flavan-3-ol, galat residesi isomerik trans pozisyonunda) esteri olup, gallik asitle (bir u-hidroksibenzoik asit) birlikte EGCG yapısını oluşturur (Yao ve ark., 2008). Yeşil ay polifenolleri toksik olmayan ve geniş organ çeşitliliği üzerine olan etkileri ile dünya çapında kanserden korunmada kullanılan besin maddelerinden biridir (Lee ve ark., 2010). Yeşil ay sahip olduğu bu koruyucu etkiyi, gcl antioksidan etkisi ve radikal süpürücü özelliklerine sahip olan yüksek konsantrasyonda, polimerize olmamış kateşin ve gallatlı formlarına borçludur. Bunlardan hakkında en fazla araştırma bulunan EGCG'nin en fazla bulunduğu besin maddesinde yeşil aydır (Yao ve ark., 2008). Bu bağlamda araştırmalar incelendiğinde mitokondri fonksiyonelitesinin bozulduğu hastalıklarda, EGCG etkisinin incelendiği birçok araştırma görülmektedir. İzo-proterenol-indüklü kalp rahatsızlığı geçiren sıçanlarda yapılan araştırma sonuçlarına göre, EGCG uygulaması ile mitokondrial hasarın, lipid perokidasyon ürünlerinin azalması ve TCA, ETC gibi metabolik yolaklardaki antioksidan enzimlerin artmasıyla önlendiği belirtilmiştir (Yao ve ark., 2008). EGCG n uygulaması ile  $Ca^{+2}$  seviyesinin artmasına,  $Na^{+}/K^{+}$ -ATPaz etkisinin azalmasına ve ATP konsantrasyonunun azalmasına neden olmuştur (Devika ve Stanely Mainzen Prince, 2008).



**Şekil 4. 5.** Gallokateşin, epigallokateşin, epigallokateşingallat genel yapısı.

EGCG'nin yaşlanmaya karşı etkisi diploid insan fibroblastlarında (Meng ve ark., 2008) ve sıçan beyinde araştırılmış (Srividhya ve ark., 2009), mitokondrial bütünlüğün korunması, antioksidan sistemin düzenlenmesi, TCA enzimleri ve ETC komplekslerinin aktivitelerinin artışı gözlenmiştir.

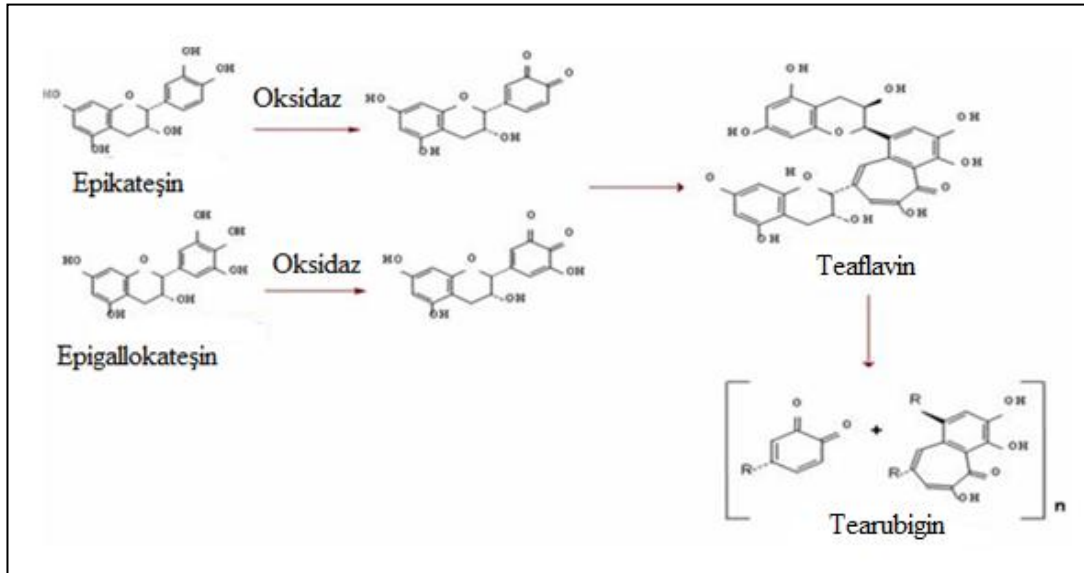
EGCG antioksidan etkileri ise CYP2E1-bağımlı toksisite modelinde HepG2 hücrelerinde (Jimenez-Lopez ve Cederbaum,2004), kadminyum-indüklü sıçan beyin mitokondri hasarı modelinde gösterilmiştir (Abib ve ark., 2011). Her iki modeldede membran potansiyelinin azalması, lipit peroksidasyonun önlenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

EGCG'nin anti-karsinogenik, anti-tümör etkileri, in-vitro ve in-vivo olarak çeşitli modeller ve farklı kanser türlerinde gösterilmiş, değişik hücrel apoptotik yolların aktive olduğu belirtilmiştir. EGCG'nin prostat karsinoma hücreleri üzerine apoptozu indüklediği ve hücre büyümesini baskıladığı, bu etkileride (i) pro-apoptotik proteinleri (Bax, Bak) ve anti-apoptotik proteinleri (Bcl-2, Bcl-XL) azalttığı (Siddiqui ve ark., 2008), (ii) NF-k $\beta$  yolağını inhibe ettiği (Adhami ve ark., 2007), (iii) IAP seviyelerini azalttığı sonuç olarak kaspaz-3 ve -6 aktivasyonunu arttırdığı (Siddiqui ve ark., 2008) değişik çalışmalarla gösterilmiştir. Benzer sonuçlar insan melanoma hücrelerindedede elde edilmiştir (Nihal ve ark., 2005). Pankreatik kanserlerde EGCG indüklü hücre ölümünde, Bax miktarı artarken, XIAP seviyeleri azalmakta ve JNK sinyal yolağı uyarılmaktadır (Qanungo ve ark.,2005). MAPK yolağının, p38 aktivasyonu ve JNK sinyalinin aktivasyonuda HeLa hücrelerinde (Chen ve ark, 2000), kondrasarkoma hücrelerinde (Yang ve ark., 2011) ve kolorektal HT-29 hücrelerinde (Chen ve ark., 2013) gösterilmiş, bu mekanizmanın EGCG'nin

kemopreventif fonksiyonunda önemli olabileceği belirtilmiştir. İnsan astrositom U373MG hücrelerinde ise, EGCG tedavisi inflamatuvar yanıtın IL-1b+β-amiloid (25-35) fragmentasyonun indüklenmesine ve p38 ile birlikte JNK sinyal yolağının, NF-kβ transkripsiyon faktörünün inhibisyonuna sebep olduğu bildirilmektedir (Kim ve ark., 2007). Yani hücre türüne bağlı olarak EGCG farklı sinyal yollarının aktivasyonunda rol oynamaktadır. JB6 fare epidermal hücre hattında, H-ras geni transfekte edildiğinde yine benzer etkilere sebep olmaktadır, ERK protein seviyeleri EGCG etkisiyle sürekli ve hızlıca azalırken, MAPK1/2-ERK sinyal yolağında inhibe olmaktadır (Chung ve ark., 2001). Farklı birçok çalışmada EGCG'nin apoptotik ölüm yolağını farklı sinyal mekanizmaları üzerinden aktive ettiğini göstermektedir. Bu çalışmalardan biri malignant B hücrelerinde ve Burkitt tipi lenfoma hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada EGCG koruyucu etkisini cyt-c ve Smac/DIABLO'nun mitokondriden sitozole salınımını düzenleyerek gerçekleştirmiştir (Nakazato ve ark., 2005). Epidermoid karsinoma hücreleri (Lee ve ark., 2010) ve kronik miyeloid lösemi hücrelerinde (Iwasaki ve ark., 2009), benzer sonuçlar gösterilmiştir, bu çalışmalarda kaspaz-bağımsız yolak aracılığı ile AIF ve Endo G nin mitokondriden sitozole salınımı ile apoptozisin indüklendiği bildirilmiştir. EGCG'nin Ultraviole B-indüklü PI3K aktivasyonu fare epidermal hücreleri olan JB6C141 hücrelerinde gösterilmiş; EGCG ile ön-uygulamasının PI3K/AKT aktivasyonunu inhibe ederek, karsinoetik yolağın baskılanmasında yararlı etkilerinin bulunduğu bahsedilmiştir (Nomura ve ark., 2001) . EGCG ile apoptozisin düzenlenmesinde sadece intrinsik apoptotik yolak göz önünde bulundurulmamalı, ekstrinsik yolağın etkileride incelenmelidir. İnsan monositik lösemi hücreleri olan U937 üzerine EGCG etkisinin incelendiği bir çalışmada, EGCG'nin Fas sistemine bağlanarak, Fas aracılı apoptozisi indüklediği ve kanser hücrelerini bu yolağı kullanarak öldürdüğü belirlenmiştir (Hayakawa ve ark., 2001). Fare hepatoma hücreleri, sıçan miyoblastoma hücreleri (Murase ve ark., 2009), fare preadiposit hücreleri (Murase ve ark.,2009) ve insan kolon kanser hücrelerinde (Hwang ve ark., 2007) yapılan araştırmalara göre EGCG tedavisi ile aktive olan AMPK ve sonucunda apoptozisin inhibisyonu, EGCG'nin anti-kanser özelliğinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmalara benzer sonuçlar in-vivoda BALB/c farelerde de gözlenmiştir (Murase ve ark., 2009).

#### 4.2.1.3.3. Teaflavinler ve tearubiginler

Yüzlerce flavanol arasından, siyah çayda bolca bulunan teaflavinler (TF) ve tearubiginler (TR), dünyada siyah çayın çok fazla tüketilmesinden dolayı, özel bir ilgiyi hak ederler (Bhattacharya ve ark., 2009). Fermantasyon işlemi sırasında, çay kateşinlerinin (EGC ve EGCG), polifenol oksidaz enzimi (bu enzim çay yapraklarının katlanması ile salınır) yardımıyla polimerizasyonu sonucunda oluşurlar (Halder ve ark., 2008). Siyah çay polifenolleri, antioksidan aktiviteleri, apoptozisi indüklemeleri, hücre döngüsünü inhibe etmeleri, hücre büyümesini inhibe etmeleri, karsinogen metabolizmasını düzenlemelerinde içeren bazı biyokimyasal ve farmakolojik özellikleri gösterirler (Kalra ve ark., 2005). E.coli model sistemi kullanılarak TF'in, doz bağımlı bir şekilde çift etki gösterdiği yayınlarda belirtilmiştir. Yüksek dozdaki TF'ler bakterial ATP-az veya kompleks I inhibisyonu gösterirken, düşük dozlarda antioksidan özellik gösterirler. Bu özellikleri sayesinde bakterial ATPaz veya kompleks I hedefli ilaçlar olarak bazı patojenler ve hastalıklara karşı kullanılabilir (Live ark., 2012). Kardiyoprotektif etkileri ise iskemi/reperfüzyon hasarı modelinde gösterilmiş, TF etkisi ile mitokondri membran K<sup>+</sup>ATP kanalları açılarak, mitokondri hasarını azalttığı gösterilmiştir (Ma ve ark., 2011). TF'in anti-karsinogenik etkileride geniş ölçüde araştırılmıştır.



Şekil 4. 6. Teaflavin ve tearubigin kimyasal yapısı.

İnsan meme (Lahiry ve ark., 2008), prostat epitelial (Prasad ve ark., 2007) hücrelerinde TF etkisi ile apoptozis indüklenirken, Bax, kaspase-3, kaspase-9 gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonu artmış, Bcl-2 protein miktarları ise azalmıştır.

Farklı bir meme kanser hattında ise, p53 mutant meme hattında, apoptosiz ve kaspas aktivitesi, Fas ölüm reseptör yolağı üzerinden aktive edilmiş, bu sırada yaşamı destekleyen PI3K/AKT yolağı ise inhibe olmuştur (Lahiry ve ark., 2010). İnsan modüler tiroid ve servikal kanserlerde PI3K/AKT yolağının düzenlenmesi TF'nin ana etkisi olarak belirtilirken, p38/MAPK sinyal kaskatının (Mazumdar ve ark., 2013) ve NF-κβ inaktivasyonun bu tabloya eşlik ettiği belirtilmiştir (Singh ve ark., 2013). TR etkilerinin TF içeriğinden daha fazla olduğu düşünülmesine rağmen bu madde hakkında literatürde daha az bilgi bulunmaktadır. İnsan malignan melanoma hücreleri olan A357 üzerinde TR etkisine bakıldığında, apoptozisin JNK ve p38 yolağı üzerinden, Bax/Bcl-2 oranını artırarak gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Halder ve ark., 2008; Bhattacharya ve ark., 2009).

#### 4.2.1.4. Proanthosiyanidinler

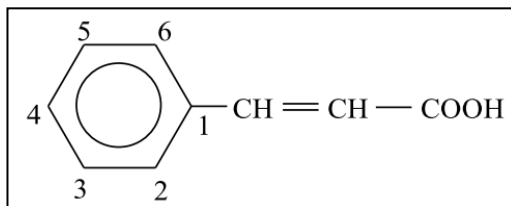
Proanthosiyanidinler (PA) ya da kondense taninler, yüksek molekül ağırlıklı polimerik flavonoidlerdir. Monomerik flavan-3-ol (kateşin ve epicateşin) ünitelerinin birleşmesi ile oluşurlar (Fine, 2000). PA'in tüketiminin kanser, oksidatif stres, inflamasyon ve kardiyovasküler rahatsızlıklarında içine alan geniş bir hastalık ve etkenlerinden koruyucu olduğu düşünölmektedir. PA'in yararlı etkileri antioksidan özellikleri ve gen ekspresyonu düzenleyebilmelerinden kaynaklanmaktadır.

#### 4.2.1.5. Flavonlar ve flavononlar

Doğada en nadir rastlanan flavonoidler olan flavononlar sadece kereviz ve maydonozda bulunurken, flavonlar narenciye, domates, bazı çilek türleri ve nanede bulunur, henüz etkileri hakkında yayınlar bulunmamaktadır.

#### 4.2.2. Fenolik asitler

Fenolik asitler iki gruptan oluşur, bir grup sinnamik asitten türevlenirken, diğeri benzoik asit türevidir. Hidrosinamik asit kumarik asit, kafeik asit ve ferrulik asiti içeren benzoik asiti gallik asit ve ellaiik asit türevi olan asitlerdir.



Şekil 4. 7. Hidroksisinnamik asit.

#### **4.2.2.1 Hidroksisinnamik asitler**

Kafeik asit (3,4,-dihidroksisinnamik asit yada CA) kahvede en çok bulunan fenolik asittir (Chang ve ark., 2010). 4- hidroksisinnamik asitten türeyen basit kateşol halkası içermektedir. CA anti oksidan etkili (Masudave ark., 2008), anti bakterial (Almeida et al., 2006), anti inflamatuvar ve anti alerjik etkili (Park ve ark., 2008) bir sinnamik asittir(Hsu ve ark., 2000). CA'nın antioksidan aktivitesi ile oksidatif hasarı önlediği farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Mitokondri disfonksiyonunda koruyucu etkisi ise isoproterenol indüklü mitokondri hasarı oluşturulan kalp hücrelerinde gösterilmiştir. Bu çalışmada serbest radikal miktarının azaldığı, multienzim aktivitelerinin arttığı, GSH seviyesinin azalıp, ATP seviyelerinin ve lipit, kalsiyum seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (Kumaran ve Prince, 2010).

CA uygulamasından sonra ETC komplekslerinin aktivasyon sevipleri düzenlenerek, lipit peroksidasyonun, nitrit konsantrasyonun azalması, SOD aktivitesi ve redoks oranın GSH ve CAT seviyeleri ile düzenlenmesi sonucunda, oksidatif savunma sağlanmıştır (Kumar ve ark., 2011).

Bu bilgilere rağmen günümüzde CA'nın apoptoz yolağını düzenlemesinde ki etkisi üzerine hala çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Örneğin servikal kanserlerde CA indüklü apoptozisin Bcl-2 seviyelerini inhibe ettiği, cty-c salınımı ile kaspaz-3'ü aktive ederek mitokondrial apoptozis yolağını aktive ettiği gösterilmiş bu özelliğinden dolayıda kemoterapilerde ajan olarak kullanılabilceğinden bahsedilmiştir (Chang ve ark., 2010). CA'nın çoklu ilaç direncine karşı etkilerinin denendiği başka bir çalışmada ise, önce insan meme kanser hücreleri olan MCF-7'lerde DOX'a karşı resistans geliştirilerek, CA uygulanmış ve hücrelerin kimyasal duyarlılıklarını artırdığı belirtilmiştir (Ahn ve ark., 1997). İnsan akciğer kanser hattıları olan A549 ve H1299'da yapılan bir çalışmada ise CA'nın paksitaksel-indüklü hücre ölümünden hücreleri koruduğu bildirilmiştir. Bu etki pro-survival etkiye sahip Bcl-2 up-regulasyonu ve NF- $\kappa$ B sinyal yolağının aktivasyonunu içermektedir, ayrıca bu yayında kanser hücrelerinin kemoresistanstan korunduğundan bahsedilmiştir (Lin ve ark., 2012).

#### **4.2.2.2. Hidrobenzoik asitler**

Ellajik asit (3,7,8-tetrahydroxy[1]-benzopirano[5,4,3-cde] [1] benzopyran-5,10-dione veya EA) bir polifenol türevi olup, çilek ve fındıkta bulunmaktadır.

Ellagitaniinler bağırsak florasındaki mikroorganizmalar yardımıyla metabolize edilirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu polifenollerin anti-mutajenik ve anti-inflamatuvar özelliklerinin yanında anti-karsinojenik ajan olarak kullanımını önermektedir (Hwang ve ark., 2010).

#### **4.2.3. Fenolik alkoller**

Temel fenolik alkoller tirozol (4-hidroksifeniletanol) ve hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol) olup, başlıca zeytin yağında bulunmaktadırlar (Cabrini ve ark., 2001). Tirozollerin diğer bir kaynağında bira, beyaz ve kırmızı şaraptır (Covas ve ark., 2003).

#### **4.2.4. Stilbenler**

Stilbenler diyetle düşük miktarda bulunurlar. Resveratrol (3,5,4-trihidroksistilben) (RV) en fazla bilinenlerden olup 70'den fazla bitkide bulunmaktadır (Ungvari ve ark.,2011). Yiyecekler arasında yerfıstığı, soya fasülyesi, nar ve şarapta yüksek miktarda resveratrol bulunmaktadır (Catalgol ve ark., 2012).

#### **4.2.5. Lignans**

Lignanlar iki fenolpropan ünitesinin oksidatif dimerizasyonu ile oluşur, genellikle serbest formda bulunur, nadiren glikozillenmiş formlarında rastlanır. Diyetle başlıca keten tohumunda bulunmaktadır (Adlercreutz ve Mazur, 1997).

### 4.3. Polifenollerin Biyoyararlanımı

Bir maddenin biyoyararlanımı birçok farklı yoldan belirlenebilir. Biyoyararlanımı basitçe tarif etmek gerekirse, besinlerin sindirilmesi, emilmesi ve metabolize edilmesini içeren işlemlerin tamamı düşünülmelidir genellikle bu işlemlerle orantı olarak biyoyararlanımın uyumlu bir şekilde arttığı düşünülmektedir. Bu yüzden besin denildiği zaman sadece özel bir yemek ya da diyet desteği değil aynı zamanda biyoyararlanımı önemli maddelerde düşünülmelidir (Srinivasan ve ark., 2002). Polifenollerin metabolizması hakkında birçok bilgi bulunmaktadır. Aglikon formundakiler ince bağırsaktan emilir, ancak birçok polifenol yiyeceklerde, ester, glikozit veya polimer formlarında bulunmaktadır ve doğal formları ile emilememektedirler. Emilimden önce bu bileşiklerin intestinal enzimler yardımıyla hidrolize edilmesi veya kolonik mikroflora enzimleri ile parçalanmaları gerekmektedir. Bu emilim esnasında polifenoller intestinal hücrelerde konjugasyon ya da karaciğerde metilasyon, sülfasyon ve/veya glukoronidasyon gibi oldukça farklı modifikasyonlar geçirmektedir. Sonuçta doku ya da kana ulaştıklarında besinlerde buldukları formdan farklı bir şekilde bulunmaktadırlar, bu özellikleri polifenollerin ve metabolitlerinin ve biyolojik aktivitelerinin tanımlanmasında zorlaştırmaktadır (Zhang ve ark., 2003). Biyoyararlanım çalışmalarının ana hedefi, emilen polifenollerin içinde aktif metaboliti ortaya çıkaran ya da biyolojik aktivite gösteren metabolitin hangi polifenolden kaynaklandığını tespit edebilmektir. Bu aşamada emilim oranının ortaya çıkışında, polifenolün kimyasal yapısı, dolaşımında kanda bulunan konsantrasyonundan daha önemlidir. Sıklıkla diyetlerimizde çok bulunan polifenoller hedeflenen dokuda aktif metabolitlerini gördüklerimiz değildir. Polifenoller olarak zengin yiyeceklerin tüketilmesi, plazmadaki ve idrardaki antioksidan miktarının artmasında indirekt olarak sağlamaktadır (Young ve ark., 1999). Spesifik aktivite gösteren metabolitlerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi önemli bir araştırma alanıdır (Setchell ve ark., 2002). Ancak bu aktif metabolitlerin ortaya çıkması kolon mikroflorasına bağlı olarak değişmektedir (Setchell ve ark., 2002). İnsanlardaki metabolizması iyi bilinen örneklerden biri olan kuersetin konjugasyon sonrasında plazma ve idrardaki formları tanımlanmıştır. Örneğin kuersetin içeren besinler (soğan, karabuğday, çay ya da saf kuersetin-4-glukozidaz, kuersetin-3-glikozidaz gibi besin takviyeleri) ile beslenen gönüllüler üzerine yapılan bir çalışmada plazmada yapılan ölçümlerde kuersetin konjige formlarda bulunmuştur (Sesink aL ve ark., 2001).

#### 4.3.1. Barsak Emilimi

Yiyeceklerde flavanoller hariç tüm flavanoidler glikozillenmiş halde bulunurlar. Glikozillenmiş bir maddenin midedeki akibeti hakkında yeterince verimiz yoktur. Ancak genelde maddelerin glikozillenmiş formları midedeki asit hidrolizine karşı direnç göstererek barsağa ulaşır (Gee ve ark., 1998), burada glikozidazlar ve aglikonlar emilir. Sıçan çalışmalarının sonuçlarına göre kuersetin gibi, bazı flavonoidler için gastrik seviyede emilim söz konusudur, ancak bunların glikozidatları için aynı sonuçlar geçerli değildir (Crespy ve ark., 2002). Yapılan çalışmalara göre fare ve sıçanlarda antosiyaninler mideden emilmektedir (Passamonti ve ark. 2005). Ancak birçok polifenol yiyeceklerde ester, glikozillenmiş ya da polimer formunda bulunur. Bu yüzden intestinden emilebilmeleri için önce b-glikozidaz, laktaz-florozin hidrolaz ya da mikroflora tarafından hidroliz edilmeleri gerekmektedir (Nemeth K ve ark., 2003). Glikolizasyon emilimi etkileyebilir ancak, dolaşımdaki doğal metabolitleri etkilemez. Kuersetin, daidzain ve genisteinin yoğun bir şekilde glikozilasyonu plazma yada idrardaki metabolitlerinin üzerine etkisi yoktur (Setchell ve ark., 2002). Glikolizasyon konusunda antosiyanidinler farklılık gösterir, yoğun glikolizasyon ile dolaşımdaki formları artar, bu etki antosiyanodinlerin aglikon formlarının stabilitesinin az olması ve emilim için farklı mekanizmalara ihtiyaçları olduğunu göstermektedir (Wu X ve ark., 2002). Felgines ve ark (Felgines ve ark., 2003) çalışmasında idrarda glukorinillenmiş ve sülfatlanmış antosiyanodinler tanımlanmıştır. Resveratrol glikolizasyona uğradığında oksidatif yıkımdan korunduğu bilinmektedir, bu yüzden glikozillenmiş resveratrol daha stabil, daha kolay çözünen ve insan gastrointestinal sisteminde daha kolay absorblanan bir yapıya sahiptir (regev-Shoshani Gve ark., 2003). Diğer taraftan kuersetin glikolizasyonunda emilemi kolaylaştırır, aglikon formuna göre daha fazla kuersetinin emildiği gösterilmiştir (Morand ve ark., 2000). Sodyum-bağımlı glikoz taşıyıcıları ile hücre içine alınan glukozidazlar, sitozolik b-glikozidaz ile hidroliz edilmektedir (Nemeth ve ark., 2003). Ancak glikolizasyonun isoflavonlar üzerindeki etkisi kuersetindeki emilimi üzerine olan etkisinden daha az aydınlatılmıştır (Manach ve ark., 2004). Proanthosiyanidinler yüksek molekül ağırlıkları ve doğal polimerik yapıları ile diğer bitki polifenollerinden ayrılırlar. Bu özellikleri emilimleri için bir sınır oluşturur doğal formları ince barsakatan emilmekle birlikte trimer yapıdan daha büyük olan oligomerlerin emiliminde boyut önemli bir sınırlayıcı faktördür. Hidroksisinnamik asit serbest formları ve konjuge flavonoidlerin ince barsaktan

emilimini karşılaştıran çalışmada serbest formların hızlıca emildiği bildirilmiştir (Clifford ve ark., 2000). Ancak doğal olarak esterifikasyona uğramış olan bitki ürünlerinin intestinal mukozadan emilimini, karaciğer ve plazma geçişlerini bozduğu, bunların kolojenik asit hidrolizini engellediği, kolonik mikrofloraya bağlı olarak hidroliz edilebildiği görülmüştür. İnce barsaktan kolona ulaşabilen ve bu sırada glikozidaz hidroliziyle aglikon forma ulaşan polifenoller farklı aromatik asitlerle metabolize edilirler. Aglikon heterosiklik halka farklı noktalardan kırılarak, farklı bezoik asit türevlerine dönüşür. İntestinal floraizoflavon glikozidaz metabolizmasında aglikon formların aktif metabolitlere dönüşümünde etkilidir.

#### **4.3.2. Konjugasyon mekanizması ve plazmada taşınma**

Polifenoller bir kere emildikten sonra konjugasyona uğrarlar, bu işlemler temelde metilasyon, sülfatlanma ve glikoridasyonu içeren, metabolik detoksifikasyondur. Genellikle ksebiyotik metabolizmasında karşımıza çıkan detoksifikasyon işlemi, maddenin hidrofilik özelliklerini artırarak atılmasını kolaylaştırır. Kateşol-o-metil transferaz katalizinde S-adenozil-L-methioninden metil grubu transferi gerçekleştirilir. Metilasyon genellikle polifenolün 3' pozisyonundaki karbon atomu üzerinde gerçekleşse de, 4' pozisyonuna bağlanması ile oluşan 4'-metilepigallokateşinde sindirimden sonra insanlarda plazmada tespit edilmiştir. Kateşol-o-metil transferaz aktivitesinin en yüksek olduğu organlar karaciğer ve böbrektir, ancak farklı dokularda da bu enzime rastlamak mümkündür. Sülfato transferaz katalaz ise 3'-fosfoadenozin-5'fosfo sülfattan kopardığı sülfatu polifenollerde bulunan farklı pozisyonlardaki hidroksil gruplarına transfer eder. Sülfatlanma karaciğerde gerçekleşir ancak polifenollerin hangi hidroksil gruplarından sülfatlandığı henüz açıklık kazanamamıştır.

UDP-glikoronoziltransferaz birçok dokuda endoplazmik retikulum membranına bağlı bir enzimdir, UDP-glukoronik asitte bulunan glukoronik asit grubunu polifenollere transfer eder. Glukoronidasyon ince barsak ve karaciğerde gerçekleşir ve genellikle C3-pozisyonunda gerçekleştirilir. Bu üç tip konjugasyonun önemi görece olarak substratın yapısına ve dozajına bağlı olarak değişir. Polifenollerin sülfatlanması ve glikorinasyonu arasındaki denge türlere ve cinsiyete göre değişmektedir. Konjugasyon mekanizması genellikle serbest aglikagon formların yokluğunda ve maddenin düşük konsantrasyonlarında oldukça etkilidir. Bu kuralın bozulduğu ayrıcalıklı bir örnek olarak yeşil çay kateşinleri aglikon formları total

plazmada oldukça yüksek seviyelerde (%77'den fazlası epigallokateşin galat) olduğunda da çalışır. Dolaşımdaki metabolitlerin, polifenol yapısında konjuge olan grupların doğal pozisyonlarının tanımlanması önemlidir. Ancak çok farklı tiplerde gerçekleşebilen konjigasyonların sadece çok az bir kısmı plazmada tanımlanabilmiştir. Dolaşımdaki polifenol metabolitlerinin kan proteinlerine, protein taşınmasından sorumlu albümine kısmen bağlanabildiği gösterilmiştir. Polifenolün albümine olan ilgisi kimyasal yapısı ile ilişkili olarak değişmektedir. Albumine bağlanma doku ve hücrelere iletim sonucunda metabolitlerin klarensi artmaktadır. Ancak bu metabolitlerin hücresel alınımına, bağlanmamış olan polifenollerinde katkısı olduğu unutulmamalıdır. Sonuç olarak polifenollerin serbest veya albümine bağlı olarak taşınan formlarının biyolojik aktiviteleri henüz kesinlik kazanmamıştır.

#### **4.3.3. Plazmadaki konsantrasyonları**

Polifenollerin plazma konsantrasyonları yiyecek kaynağına bağlı olarak değişen doğal polifenol yapısı ile doğrudan ilişkilidir. Plazma konsantrasyonun, bozulmamış flavonoidler tüketilmesiyle 1 µM sınırını aştığı ancak bu konsantrasyonun sürekli tüketim ile mümkün olduğu bildirilmiştir. Plazmada maksimum konsantrasyona polifenol tüketiminden 1-2 saat sonra ulaşıldığı ancak bu durumun polifenollerin emilim öncesi ön yıkıma ihtiyaç duyulmaması halinde gerçekleştiği gösterilmiştir.

#### **4.3.4. Doku alımı**

Polifenoller kısmen metabolize oldukları barsak ve karaciğer dokusuna penetre olarak dokuya girerler. Polifenollerin biyoyararlanımının belirlenmesinde dokudaki metabolitlerinin tanımlanmasından çok plazmadaki konsantrasyonları önem taşımaktadır. Ancak bu konudaki az sayıda araştırmadan dolayı hala insan dokularındaki konsantrasyonlar hakkında yeterli bilgiye sahip değiliz. Yapılan iki çalışmadan biri fitoestrogenleri ve çay polifenollerinin insan prostat dokularındaki etkisini incelemektedir. İlk çalışma erkeklere verilen genisteinin normal ve benign prostatik hiperplazi içeren prostat dokularındaki dağılımı üzerine gerçekleştirilmiştir. Normal dokuya göre benign hiperplazi bulunan erkeklerin prostatalarında anlamlı olarak daha yüksek seviyede genisteine rastlanmıştır. İkinci çalışmada ise günlük 1.42L yeşil çay yada siyah çayı beş gün boyunca tüketen erkeklerde prostat dokularında epigallokateşin, epikateşin, epigallokateşin galat konsantrasyonları incelenmiştir. Bu dokularda değerler 21-107 pmol/gdoku aralığında bulunmuştur. Kolorektal dokularda kurkumin sistemik biyoyararlanımı

araştırmak üzere 20 hasta üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise kolorektal kanser tanısı almış hastalara günlük 0.45, 1.8 ve 3.6g olmak üzere 7 gün boyunca oral yoldan kurkumin verilmiş. Ameliyat sonrasında doku kurkumin seviyeleri incelenen hastalarda normal dokuda  $12.7 \pm 5.7$  nmol/gdoku olarak belirlenirken, malignant kolorektal kanser tanısı alanlarda bu değer  $7.7 \pm 1.8$  nmol/gdoku olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise eşit miktarda isoflavon alan kadınlarda meme dokularında serumdan daha yüksek miktarda bulunana ve serumda meme dokusundan daha fazla bulunan izoflavonlar açısından karşılaştırılmıştır. Bu kadınlardan serumlarında genistein, daidzeinin serumda daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu grlmştir. Bu birkaç çalışmada polifenollerin plazmadaki konsantrasyonları ile doku konsantrasyonları arasında direkt bir korelasyon görülmediğinin altını çizmektedir. Ancak kan ve doku arasındaki dağılım polifenol çeşitlerine göre değişmektedir.

#### **4.3.5. Boşaltım**

Polifenoller ve türevlerinin ana eliminasyonu idrar ve safra aracılığı ile gerçekleşir. İleri konjuge edilmiş metabolitler safra ile uzaklaştırılırken, monosülfat gibi daha küçük konjugatlar ise idrar ile atılır. İdrarda atılan total metabolit miktarı, plazmadaki maksimum konsantrasyon miktarı ile korele olarak artmaktadır. İdrardaki atılım yüzdesi olarak oldukça büyük bir yüzdeyi narenciye flavanonları oluşturmaktadır (%4-30), izoflavonlar (%16-66 daidzein,% 20-24 genistein), flavonoller ise % 0.3-1.4 oranındadır. İdrardan geri emilim oranları karşılaştırıldığında ise çay kateşinleri %0.5-6, %2-10 kırmızı şarap kateşinleri, kakao kateşinleri ise %30 dan fazla olduğu tespit edilmiştir.

#### **4.4. Hücre Ölüm Yolakları**

Programlanmış hücre ölümü, embriyogenesis, immünite gibi farklı biyolojik işlemlerde anahtar rol oynayan bir mekanizmadır. Bu yüzden hücre ölümünün çok az ya da çok fazla olması kanser, otoimmünite, nörodejenerasyon gibi farklı patolojik durumlara sebep olur. Genellikle bahsi geçen hücre ölümü pasif yoldan meydana geldiyse-hücreler dış kaynaklar etkisiyle (kesilme, çarpma vb.) öldüyse bir hasara sebep olurken, aktif yoldan meydana gelen ölümlerde-hücre kendi ölümüne kendisi katkı yapar. Programlı hücre ölüm yolağı olarakta bilinen apoptozis tartışmasız en iyi karakterize edilmiş ve evulasyon sırasında en iyi korunmuş hücre ölüm yolağıdır. Hücrelerin hızlıca kontrollü olarak ölmesini sağlayan apoptozis kaspaz proteaz aktivasyonu gerektirir, kendisine özgü morfolojik değişiklikleri ve diğer ölüm yolaklarından ayrılmasını sağlayan biyokimyasal işaretleri içerir (Parrish ve ark., 2013).

Büyümekte olan hücrelerin sonunda üç farklı mekanizma ile öldükleri görülmüştür; otofaji (programlı hücre ölümü II), onkozis (programlı hücre ölümü III veya nekrozis) ve apoptozis (programlı hücre ölümü I). Otofaji kaspaz-bağımsız bir yolak olup ölümün erken aşamalarında organel yıkımı gösterirken, ölümün son aşamasına kadar sitoiskeloton yapısı korunur. Diğer taraftan onkozis hücrenin şişmesi ve hücre membranının patlamasıyla etrafa saçılan hücre içeriği ile inflamatuvar bir yanıtın oluşmasına sebep olur (Lockshin ve Zakeri, 2004). Otofaji ve onkozisin tersine, apoptozis morfolojik ve biyokimyasal olarak apoptozise özgü karakterizasyon gösteren, farklı mekanizmaların aktive olmasıyla gerçekleşir. Bu mekanizmalar ROS seviyelerinin artışı, kaspazların aktivasyonu, apoptotik cisimciklerin oluşması, kromatin kondenzasyonu ve nükleus degradasyonunu içermektedir (Simon ve ark., 2000).

##### **4.4.1. Apoptozis**

Apoptotik ölüme aşırı ROS üretimi, bazı apoptotik faktörlerin salınımlarında etkilidir. Bu faktörlere cyt-c, apoptoz-indükleyici faktör AIF ve kaspazlar örnek gösterilebilir (Qian ve ark., 2012). Kaspazlar sistein-proteaz ailesi üyelerinden olup, apoptozun düzenlenmesinde merkezi rol oynarlar (Lin ve ark., 2012). Sistein residüsü içeren aktif bölgeleri substratı olan kaspazı aspartat residüsünden keserek, aktive olmasını sağlar (Kalimuthu ve Se-Kwon, 2013). Kaspazlar programlı hücre ölümünde apoptotik sinyalin aktarılacak apoptotik ölüm için esansiyel olan sinyal

kaskatının oluşmasını sağlar (Bantseev ve Youn, 2006). Hücrelerde kaspazlar inaktif pro-enzim formunda eksprese edilir, bir kere aktive olunca substratı olan pro-aktif formdaki diğer kaspazın aktivasyonunu sağlar, aktive olan kaspaz bir proteaz kaskatının başlamasını sağlar. Bu süreç sayesinde aktive olan apoptotik sinyal yolağı hücrenin hızlıca ölümüne sebep olur. Kaspazlar fonksiyonlarına göre üç gruba ayrılır; başlangıç kaspazları (kaspaz-2,-8,-9,-10), efektör kaspazlar (kaspaz-3,-6,-7) ve inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1,-4,-5)(Kalimuthu ve Se-Kwon, 2013).

Apoptozis iki farklı mekanizma ile aktive olabilir. Bu mekanizmalardan ilki reseptör-aracılı olarak gerçekleşir ve ekstrinsik yol olarak isimlendirilir, diğeri ise mitokondri-aracılı olarak gerçekleşir ve intrinsik apoptotik yolak olarak tanımlanır (Yao ve ark., 2008). Ekstrinsik apoptotik sinyal yolağı, hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörler aracılığı (ölüm reseptörleri) ile aktivasyon gerçekleşir, spesifik ligantların bağlanmasıyla ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) aktivasyonu gerçekleşir (Essack ve ark.,2011). İntrinsik yolakta ise mitokondrial membran potansiyelinin değişmesi ile karakterize, pro-apoptotik faktörlerin salınması ve apoptotik sinyallerin aktivasyonu ile ortaya çıkan bir tablo görülmektedir (Kalimuthu ve Se-Kwon, 2013). Apoptozis hiper-prolifere hücrelerin ortadan kaldırılmasında en önemli mekanizmalardan biri olduğundan (Halder ve ark., 2008), özellikle kanser hücrelerinin öldürülmesinde kullanılan kemoterapi stratejilerinden biridir, ayrıca yeni kemoterapik ajanların geliştirilmesinde bu özelliği taşıyan ajanlar seçilmektedir (Taraphdar ve ark., 2001).

#### **4.4.1.1 Ölüm reseptörü ya da ekstrinsik apoptotik yolak**

Ekstrinsik apoptotik yolak protein yapısında birçok üyesi bulunmaktadır. Bunlara tümör nekrosis faktör reseptörleri (TNFR), Fas kompleksi, membrana bağlı Fas ligantları (FasL), Fas-ilişkili ölüm domainleri (FADD), bu reseptörlerin aktivasyonu ile aktive olan başlangıç kaspazları kaspaz-8 ve kaspaz-10 gibi örnekler verilebilir (Kalimuthu ve Se-Kwon, 2013). Fas sisteminin ölüm-ilişkili fonksiyonu ana görev olarak, farklı proliferasyon aşamalarındaki hücrelerde belirlenmiştir ancak inflamatuvar sinyal yollarına olan etkileri açık değildir (Krammer, 2000). FasL ile uyarılan Fas reseptörleri FADD adaptör proteinini içermekte ve DISC aktivasyonunu ardından kaspaz-8 ve -10 aktivasyonunu içermektedir. DISC oluşumu sonrasında kaspaz aktivasyonu ile kaspaz-3 aktivasyonun gerçekleştiği bilinmektedir. Bazı hücrelerde kaspaz-8 aktivasyonu direkt olarak hücrenin ölümüne sebep olan yolağı

aktive ederken, bazılarında ise kaspaz-8 aracılığı ile intrinsik apoptotik yolak aktivasyonunda gerçekleşmektedir. Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid proteini kesilerek tBid oluşumu sonucunda mitokondriden cyt-c salınımı gerçekleştiği belirlenmiştir (Krammer, 2000).

Ekstrinsik yolağın malignant değişimesebep olabildiği görülmüştür. Hematolojik malignansilerin bir kısmında Fas genlerinde ortaya çıkan bir mutasyon ya da delesyon sonucunda hücre ölümünün gerçekleşemediği gözlenmiştir (Landowski ve ark., 1997). Ekstrinsik apoptotik yolağın ortadan kaldırıldığı birçok mekanizmada, inhibitör apoptotik protein (IAP) upregülasyonu, ya da X-ilişkili apoptoz inhibitör protein (XIAP) modellerinde olduğu gibi hücre proliferasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Yolağın diğer inhibitörleri fibroblast aktivasyon protein-1, FADD protein (interlökin-1) gibi tanımlanmıştır, FasL etkisine antagonistik etki gösteren, farklı inhibitörler mevcuttur (Kalimuthu ve Se-Kwon, 2013).

#### **4.4.1.2. Mitokondrial ve ya intrinsik apoptotik yolak**

İntrinsik mitokondrial apoptotik yolak radyasyon, ilaç, toksinler, hipoksi, hipertemi, virüs ve serbest radikal gibi değişik faktörler etkisiyle reseptörden bağımsız olarak başlar ve mitokondri fonksiyon kaybı ile apoptozise neden olur (Kalimuthu ve Se-Kwon, 2013; Cavaliere ve ark.,2013). Tüm bu uyarılar iç mitokondri membranında (IMM) değişikliklere sebep olur ve mitokondri permabilite geçiş porlarının (MPTP) açılmasını sağlar ve iç mitokondrial alandan (IMS) sitozole pro-apoptotik proteinlerin salınmasına neden olur (Saelens ve ark., 2004). Mitokondriden salınan proteinler iki grup olarak tanımlanmıştır.

Bu gruplardan ilki cyt-c içerir, mitokondri-türevli ikincil haberci olarak tanımlanan bu protein, kaspaz (Smac)/ direkt-IAP-binding protein ve serin proteaz HtrA2/Omi aktivatörüdür (Kalimuthu ve Se-Kwon, 2013). Cyt-c bir multi protein kompleksi olan ve apoptozom adı verilen yapının oluşmasını sağlar. Apoptozom cyt-c, apoptotik proteaz aktive faktör-1 (APAF-1) ile sitozolde birleşerek kaspaz-9 aktivasyonunu sağlar. Apoptozom kompleksi ile gerçekleşen bu aktivasyon ATP gerektirir. Aktif kaspaz-9'un substratı kaspaz-3 tür buda apoptozis için gerekli kaspaz kaskatının başlaması demektir (Verhagen ve ark., 2000). Mitokondriden apoptozis sırasında salınan ikinci grup proteinler ise, apoptoz indükleyici faktör (AIF), endo nukleaz G (endoG) ve kaspaz-aktive DNase (CAD) olarak belirlenmiştir.

AIF, mitokondride bulunan bir flavaprotein olup, apoptozis sırasında kromatin kondenzyonunu ve DNA degradasyonunu destekler (Susin ve ark., 1999). Apoptozisin başlangıcında AIF'in nükleusa transloke olması sonucunda oluşan nükleer kondenzyon, basamak I olarak belirlenmiştir. (Daugas ve ark., 2000). Diğer bir mitokondrial enzim olan EndoG'nin nükleusa translokasyonu nükleer kromatinlerin kesilip, oligozomal DNA fragmentlerinin oluşumunu sağlar (Li ve ark., 2001). Her iki faktöründe mitokondriden nükleusa geçişi kaspazlardan bağımsız olarak gerçekleşir. Bir endonükleaz olan CAD, EndoG gibi oligonükleozomal DNA fragmentasyonu için gereklidir (Enari ve ark.,1998). Bu aşamadan sonra apoptoziste basamak II'ye geçilmiştir (Daugas ve ark., 2000).

İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollarda kaspaz-3 kaspaz-aktive deoksiribo nükleazların aktivasyonunu sağlar, bu yüzden nükleer apoptozisin gerçekleşmesi için gereklidir. Kaspaz indüklü parçalanmanın durdurulması: (i) sitoskeleton proteinleri, protein kinazlar, DNA tamir proteinleri, (ii) endonükleazların inhibitör alt-üniteleri ve (iii) hücrenin yıkılması ile ortadan kaldırılabılır (Kalimuthu ve Se-Kwon, 2013). Kaspazlar hücre döngüsünün düzenlenmesi, sitoskeleton yapısı ve sinyal yollarını etkileyerek morfolojik değişikliklere ve apoptozisin tipik morfolojisinin ortaya çıkmasına yardım ederler (Mancini ve ark.,1998).

### **4.3.2. Apoptozis Mekanizması**

#### **4.1.3.2.1. Membran potansiyelinin çöküşü**

Devamlı ya da kalıcı  $\Delta\Psi_m$  bozulması sıklıkla intrinsik apoptotik yolak aktivasyonu ile hücre ölümüne neden olur (Kim ve ark., 2012).  $\Delta\Psi_m$  kaybı voltaj bağımlı kanalların açılmasına, kaspazlarla aktive olan Bax, Bak ve tBid gibi çeşitli proteinlerin sitozole salınmasına neden olur (Kroemer ve ark., 2007).  $\Delta\Psi_m$  azalmasıyla AIF ve EndoG sekresyonu artarken, bu proteinler kaspazlardan bağımsız şekilde, mitokondrial membran permabilizasyonu (MMP) ilişkili ölüme öncülük eder (Kuo ve ark., 2009). Birçok yayında apoptoza yol açan bu kademeli değişiklikler, dönüşü olmayan yol olarak isimlendirilmiştir (Green ve Kroemer, 2004). MMP, mitokondri aracılı kaspaz aktivatörü olarak tanımlanan cytochrome c salınımı ile karakterizedir, bu olayı ROS birikimi takip etmektedir (Kroemer ve ark., 2007).

Farklı MMP modellerinde,  $\Delta\Psi_m$  enerji kaybının kaspazlardan bağımsız bir şekilde, OMM permabilizasyonu sonrasında aniden geliştiği bildirilmektedir

(Kroemer ve Martin, 2005). Bazı çalışmalarda ise  $\Delta\Psi_m$  kaspaz aktivasyonu gerektirmekte ancak IMM apoptozisin yıkım aşaması başlayana kadar bu değişiklikten etkilenmemektedir (Kroemer et al., 2007). OMM permabilitasyonu çözünür proteinlerin salınımına izin verirken, normalde bu proteinler IMS'te bulunur. Bu duruma (i) porları destekleyen mitokondrial lipidlerin pro-apoptotik sinyal ile desitabilizasyonları, (ii) sitozolden OMM'ye transloke olmaları, pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin (Bax ve Bak) konformasyonel değişiklik geçirerek MPTP'ye bağlanması, (iii)  $\Delta\Psi_m$  kaybına bağlı olarak anti-apoptotik intraksiyonların ortadan kalkması ve mitokondri membranının şişmesi (iv) pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin aktivasyonu ile IMS proteinlerinin salınımına izin vermesi gibi olaylar sebep olabilir (Lee ve ark., 2010). Bu yüzden MMP mekanizmasının iki farklı yoldan aktive olduğu düşünülmektedir. Bunlardan ilki Bax aracılı OMM permabilizasyonunu sağlarken, IMM üzerine herhangi bir etki göstermez. Diğer mekanizmada ise MPTP aracılı IMM permabilizasyonu söz konusudur. Her iki mekanizmada da permeabilize olan mitokondrial membranlar önderliğinde, pro-apoptotik proteinlerin salınımı söz konusudur ve mitokondri fonksiyonel olarak çöküp apoptozis gerçekleşir. Bu iki model birbirlerini dışlayan düzenlenmeler içermesede, kullanılan pro-apoptotik sinyal proteinleri farklıdır (Kroemer ve ark., 2007).

### **1.3.2.3. ROS-bağımlı mitokondriyal yolak**

Genellikle ROS üretimi ile indüklenen koruyucu  $\Delta\Psi_m$  kaybı, hızlıca antioksidan korunma mekanizması tarafından doyurularak, mitokondri fonksiyonlarındaki bozukluk ortadan kaldırılmaya çalışır. Bu mekanizma OXHOS ve MPTP'nin geri-beslemeli mekanizma yolu ile gerçekleştirilir. Bu yüzden mitokondriden ROS üretimi artmış, hücrede apoptozise gitmeden önce görülen erken pro-apoptotik kanıtlar ile karakterizedir (Kroemer ve ark., 2007).

Kanser hücrelerinde, ROS DNA replikasyonu sırasında hücrelerde transformasyona sebep olabilmektedir (Gackowski ve ark., 2002). Transforme olmuş hücrelerde ise ROS apoptozisin başlaması ve sonlanmasında kritik rol oynamaktadır. Bu yüzden hücrede antioksidan gibi davranan, anti-apoptotik proteinlerin çeşidi ve up-regülasyonu, Bcl-2 ailesi üyesi olan proteinler gibi, hücrenin apoptozisten kaçmasına sebep olabilmektedirler (Kurosu ve ark., 2003). Kanser hücrelerinde apoptozisin oluşmasında ROS ve antioksidan seviyeleri arasındaki denge kritik

önemdedir, antioksidan koruma sistemleri etkinliğini kaybettiğinde ROS üretimi hücreyi apoptoza götürebilir (Wenzel ve ark., 2005).

### **4.3.3. Nekroptozis**

Farklı uyarıcılar etkisiyle gerçekleşen apoptotik formda olmayan hücre ölümüne nekroptozis adı verilmektedir (Degterev ve ark., 2005). Morfolojik olarak nekroza benzesede, nekroptoziste düzenli aktif tipte bir hücre ölümü söz konusudur (Green ve ark., 2011). Aşağıda tartışıldığı gibi kaspaz inhibisyonu koşullarında gerçekleşen nekroptozise, apoptozisi tetikleyen birçok etken neden olabilmektedir. Burada hatırlanması gereken koşul kaspazların inaktive olduğu koşullarda nekroptozisin gerçekleşmesidir, yani nekroptozisin gerçekleşmesinde kaspazların rolü yoktur. Son yıllarda bu mekanizmanın merkezinde bulunan moleküllerin tanımlanması hakkında çalışmalar hızlanmıştır. Bunlardan biri olan protein kinaz reseptör-ilişkili serine/trieonin protein kinaz 3 (RIPK3) nekroptozis için gerekli proteinlerin başında gelmektedir (Galluzzi ve ark., 2012). Ancak RIPK3-bağımsız ölüm mekanizmalarında nekroptozis olarak adlandırılmaktadır.

#### **4.3.3.1. Nekroptozisin başlangıcı**

En iyi karakterize edilmiş nekroptozis indükleyicisi ölüm reseptör ligantı olarak bilinen tümör nekrosis faktördür (TNF). Nekrosis-indükleyici özelliğinden dolayı bu ismi almış olsada, TNF üzerine çalışan araştırmacılar daha çok onun pro-inflamatuvar ve apoptotik fonksiyonları üzerinde durmaktadırlar. Uzun yıllardan beri TNF in bazı hücrelerde apoptotik olmayan hücre ölümünü indüklediği bilinmektedir (Laster ve ark., 1988). Bu önemli farkı ortaya koyduktan sonra TNF dışındaki reseptörlere baktığımızda Fas reseptöründe kaspaz inhibisyon koşullarında nekroptozisi indüklediği görülmektedir (Matsumura ve ark., 2000). Son yıllarda yapılan çalışmalarda nekroptozis sinyalinin anahtar molekülü olarak iki tane protein kinaz tanımlanmıştır (Zhangve ark., 2009). Bunlardan biri olan RIPK3 TNF-indüklü nekroptozis için esansiyel bir molekül olarak tanımlanırken, RIPK1'in nekroptoziste bazı düzenlemeleri gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Moujalled ve ark., 2013; Upton ve ark., 2010). Nekroptozis dışında RIPK1, nuklear faktör k $\beta$  (NF-k $\beta$ ) aktivasyonu ve apoptoziste, aracı olarak bulunabilir(Ofengeim ve Yuan, 2013). Nekroptozisin başlangıcında TNF reseptör-ligant bağlanması için gerekli, TRADD adaptor proteini ise RIPK1 ve RIPK3 interaksyonu gerektirmektedir. Yani dolaylı olarak reseptör ligant ilişkisi RIPK1 ve RIPK3 proteinlerine bağlıdır (Moriwaki ve Chan, 2013).

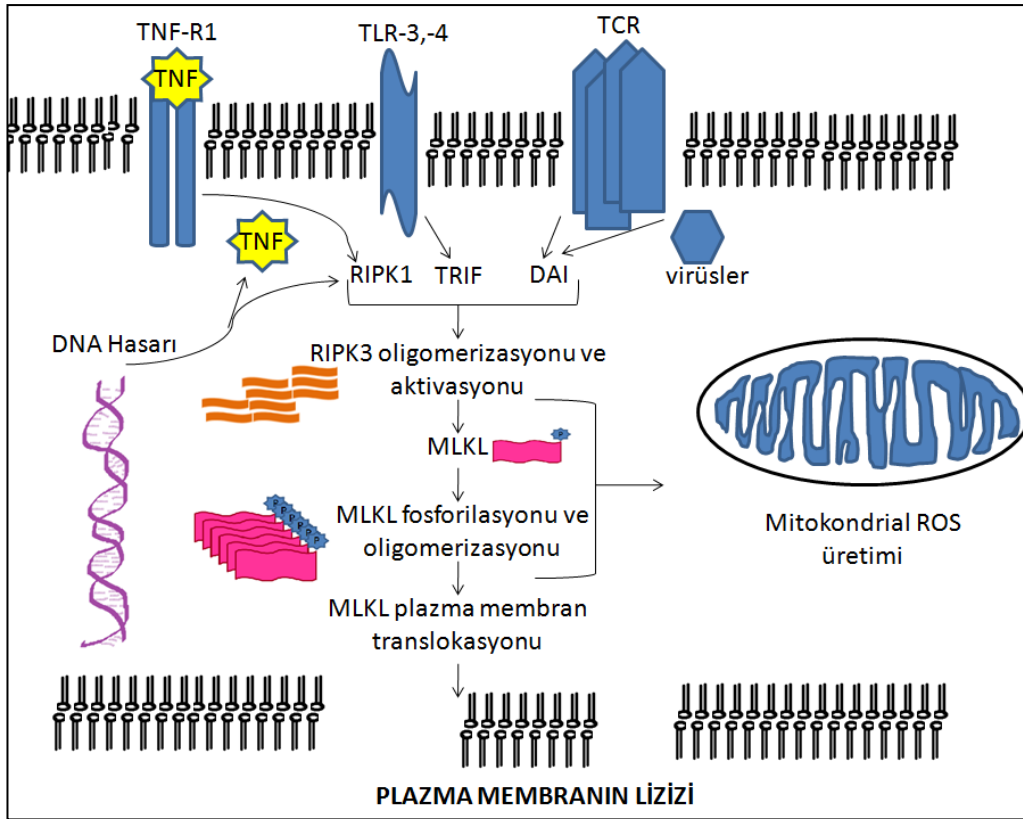
RIPK1 ve RIPK3 proteinlerinin her ikisinde reseptör-ilişkili protein (RIP) homotipik interaksiyon bölgeleri içermektedir. Bu protein sekansları sayesinde RIPK1 ve RIPK3 aktivasyonu ve nekrozome adı verilen kompleks yapılar meydana gelmektedir. Nekrozom oluşumunun düzenlenmesi yüksek oranda ubiquitinasyona bağlı olarak gerçekleşir (Geserick ve ark., 2009). Ayrıca ölüm reseptörü ligantları, RIPK3-bağımlı nekrozis uyarıcıları nekrozu direkt (adaptörler yoluyla) ya da indirekt olarak (mesela TNF ekspresyonunu arttırarak) uyarabilir. Viral enfeksiyonlarda Toll like reseptör TLR-3 ve -4 ile T hücre ligasyonu bu konuya örnek olarak verilebilir (He ve ark., 2011; Tenev ve ark., 2011). TLRler RHIM-domaini içeren proteinler olan TIRFlar ile köprü kurarak RIPK3 aktivasyonu sağlarlar budurum fare sitomegalovirüs enfeksiyonlarında DNA'ya bağlanan RHIM içeren DAI proteini varlığında RIPK3 aktivasyonu sağlar ve sonuçta nekroz gerçekleşir (He ve ark., 2011; Upton ve ark., 2012). RIPK3 aktivasyonu hedefindeki nekrozis, DNA hasarını tabiken meydana gelir. Bu yüzden RIPK3 aktivasyonun düzenlenmesinde ripoptozom adı verilen multi-protein komplekslerinin RIPK1'e bağlı olarak rol oynadıkları bildirilmiştir (Feoktistova ve ark., 2011; Tenev ve ark., 2011). DNA hasarı sonucunda gerçekleşen hücre ölümü TNF üretimi ile ilişkilide olabilir TNF-bağımsızda gerçekleşebilir.

#### **4.3.3.2. Nekroptozisin işlenmesi-devam etmesi**

Başlangıçta gerçekleşen RIPK1-RIPK3 kompleks aktivasyonundan sonra nekroptozisin devam etmesi geniş/uzun iplikli yapıların oluşmasıyla,  $\beta$ -amiloid oluşumunun biyofiksel özelliklerine benzemektedir (Li et al., 2012). Amiloid yapılarının oluşumun, RHIM domaini içeren proteinlerin artmasına bağlıdır. Buradaki önemli nokta simültane bir şekilde artan RIPK3 aktivitesinin amiloid yapısı ile uzamasıyla nekrozis arasındaki sağlam bağlantıdır. Potansiyel olarak, uzamış amiloid oluşumu (RIPK3 aktivasyonu) ile düzenlenen daha öncede belirtildiği gibi RIPK3'ün ön öldürücü tipine ya da inflamasyondaki rolü gibi öldürücü olmayan tipine sebep olmaktadır. Burada henüz kesinleşmemiş olan konu ise amiloid yapısının oluşumunun (ve gerekliliğinin), TLR vb. uyarıcılar varlığında gerçekleşen nekrozis ile ilişkisidir. Ancak bu proteinli yapının sağladığı stabilite RIPK3 aktivitesi yokluğunda hücrel toksisitenin devam ettirilmesi açısından önemli olabilir. Aslında bu hücre ölüm mekanizması RIPK3 kinaz aktivitesi kontrolünde olduğu ölüm gerçekleşene kadar anlaşılammıştır. Pseödokinaz karışık kinaz benzeri

domainleri(MLKL) RPIK3 bağımlı nekroptoziste anahtar rolü oynayan başlatıcı faktörler olarak tanımlanmış, bu tanımlama genomlarından MLKL çıkarılan hücrelerin RIPK3-bağımlı nekrozise direnç göstermeleri ile tanımlanmıştır (Murphy ve ark., 2013; Wu ve ark., 2013;). MLKL nekrosome oluşumunu düzenlemez ancak RIPK3'ün hücreleri öldürmesinde gereklidir. Mutant MLKL'lerin normal MLKL'leri taklit ederek RIPK3 fosforilasyonlarını gerçekleştirmesi hatta RIPK3 genin kusurlu olduğu hatlarda dahi bunu yapabilmesi, MLKL leri RIPK3 aktivasyonunda önemli bir yere koymaktadır (Murphy ve ark., 2013). Nekroptosizin nasıl çalıştığı hakkında farklı görüşlere rastlamak mümkündür, farklı çalışmalar ROS miktarının ya da hızlı ATP tüketiminin nekroptosisin gerçekleşmesinde etkileri olduğundan bahsetmektedir (Zhang ve ark., 2009). Mitokondri fonksiyonun ortadan kalkması nekroptotik ölüm için önemli bir parametredir. Bu görüşü destekleyen biçimde RIPK3 ve MLKL içeren nekrozome oluşumunu takiben edoplazmik retikulum (ER) membranları (MAMs) ile ilişkili olarak mitokondrial translokasyonlara rastlanmıştır, ancak bunların nekroptosis oluşumu için gerekli olduğu hala kesinlik kazanmamıştır (Chen ve ark., 2013). Nekroptosis düzenlenmesinde bahsi geçen iki mitokondrial proteinden biri olan PGAM5, bir mitokondrial fosfataz olarak bilinmektedir. Diğeri ise Drp-1 proteini olup, mitokondrial füzyonda gerekli proteinlerden biri olarak tanımlanmış, genellikle DNM1L olarak bilinmektedir (Wang ve ark., 2012). RIPK3–bağımlı fosforilasyon sonrasında, PGAM5'in kısa izoformlarından birisi, Drp-1 aktivasyonu ile mitokondrial füzyon önderliğinde, ROS üretimi ve nekroptosisize sebep olur (Wang ve ark., 2012). Ancak ROS'un nekroptozisteki rolünün tartışmalı olduğu hatırlanmalıdır; farklı çalışmalarda ROS süpürücü etki gösteren maddelerin beklenen koruyucu etkileri göstermediği, ya da bu maddelerin koruyucu-etkilerinin içerisine nekroptosisin girmediği belirtilmiştir. Bu konudaki son çalışmalardan biride mitokondrinin nekroptosis üzerine rolünün araştırılması hakkında olup, mitokondri hasarı olan hücrelerde gerçekleştirilmiştir (Tait ve ark., 2013). Burada parkin-aracılı mitofaji mitokondri hasarı ile incelenmiş, şaşırtıcı olarakta, mitokondri depletionına rağmen ROS ilişkili nekroptozisten hücrelerin korunduğu gözlenmiştir. Direkt RIPK3 aktivasyonu sağlayan TNF indüklü nekroptosisi tetikleyen herhangi bir kinetiğe rastlanmamıştır. Mitokondrinin nekroptosis için anahtar rol oynadığına karşı güçlü bir görüştür. Mitokondri-bağımsız mekanizmaya destek olarak, MLKL'nin plazma membranını permabilize edebildiği hakkında ki yayındır (Cai ve ark., 2014; Chen ve ark.,2014). RIPK3-aracılı fosforilasyonu izleyen zamanlarda

oluşan MLKL oligomerleri plazma membranına transloke olarak membran kırılmasına öncülük etmektedir. MLKL oligomerlerinin plazma membranının permabilitesini nasıl parçaladıkları tam olarak aydınlatılamasada, katyonik kanallar (TRPM7 gibi) aracılığı ile katyon akışına izin verdiklerini bildiren çalışmalara rastlamak mümkündür (Cai ve ark., 2014). Burada akılda tutulması gereken asıl soru, nekroptosis genel oluşum mekanizmasının, farklı uyaranlar ile farklı hücrelerde korunmuş olan kısımlarının neler olduğudur. Ancak nekroptosis-ROS ilişkisi nekroptosis için gerekli midir sorusunun cevabı ve immün sistem reaktanları etkisiyle görülen nekroptotik ölümün ROS'tan nasıl etkilendiği, hangi koşullarda apoptozu hangi koşullarda nekroptozisi tetiklediği hakkındaki sorular hala yanıt beklemektedir (Kazama ve ark., 2008).



Şekil 4. 8. Nekroptosis mekanizması (Stephan ve ark., 2014).

#### 4.3.3.3. Apoptosis ve Nekroptosis arasındaki bağlantılar

Apoptosis ve nekrosis arasındaki derin ilişki, bazı apoptosis indükleyici uyaranlar tarafından kaspazlar inaktive olduğu zaman nekroptozisi uyarılabilir. Apoptosis ve nekroptosis arasındaki ilişkiyi en iyi açıklayan örnek TNF'tir. TNF'in bu apoptosis ve nekroptozisi uyarılabifonksiyonel etkisi, direkt olarak kaspaz aktivitesi ile

ilişkilidir. Aktif kaspazların, RIPK1, RIPK3 ve CYLD gibi nekroptosis substratlarını baskılayarak apoptozisi aktive ettikleri farklı çalışmalarda gösterilmiştir (O'Donnell ve ark., 2011). Kaspaz inhibisyonu koşullarında (kimyasal ya da genetik yolla) ise TNF'in hedefi RIPK3-ilişkili nekroptozistir. İn vivo modellerde embriyonik hücrelerin kaspaze-8 ve FADD, RIPK3 yokluğunda apoptozisi desteklediği gösterilmiştir (Dillon ve ark., 2012; Kaiser ve ark., 2011). Biyokimyasal ve in-vivo olarak- FLIP heterodimerizasyonuna bağlı olarak-katalitik inaktif formdaki kaspaz-8 kullanılan bu çalışmaların sonuçlarına göre kaspaz-8'in nekroptozisi inhibe ettiğini göstermiştir (Oberst ve ark., 2011). Kaspaz-8 homodimerleri ilişkili apoptozis aktive ederken, kaspaz-8-FLIP heterodimerleri nekroptozisi baskılar. Farklı aktiveteler gösteren kaspaz-8 homodimerleri ve kaspaz-8-FLIP heterodimerlerinin nasıl düzenlendiği henüz netlik kazanmamış olsada, farklı spesifik bölgelerde meydana gelen kesilmeler hücre içi lokalizasyonu ve aktivasyonu değiştiriyor olabilir (Oberst ve Green, 2011). Ayrıca TNF etkisi, kaspaz-8 ve FLIP seviyeleri üzerinde anahtar rol oynayarak nekroptozisin düzenlenmesi için TLR ligasyonu ile DNA hasarının oluşması ayrı bir uyarıcı sinyaldir (Tenev ve ark., 2011). Son ortaya çıkan bilgiler, RIPK3 aktivitesinde hangi hücrelerin apoptozis hangi hücrelerin nekroptozise gideceği konusunda belirleyici olduğunu göstermektedir. İlginç olarak, RIPK3 gen eksikliği bulunan farelerde, kinaz olarak inaktif formda RIPK3 oluşumu sonucunda embriyonik ölüm görülmüştür (Newton ve ark., 2014). Bu öldürücülük kendiliğinden ortaya çıkan knock-out kaspaz-8 ve RIPK1 sinyali ile tersine çevrilmiştir, kinaz inaktif RIPK3'e karşı RIPK1 ve kaspaz-8 siyalleri ile hücreler apoptozise götürülmüştür. Bu bilgide önemli olan nokta nekroptozisin aktive olabilmesi için RIPK3 aktivitesinin gerekliliğidir. Buradan da anlaşılacağı gibi, RIPK3 apoptozisi baskılayarak, nekroptozisi aktive etmektedir, ancak bu mekanizma tam olarak açıklanamamıştır ve RIPK3 inhibitörlerinin terapötik uygulamaları açısından önemlidir.

#### **4.3.3.4. Nekroptozisin in vivo fonksiyonları**

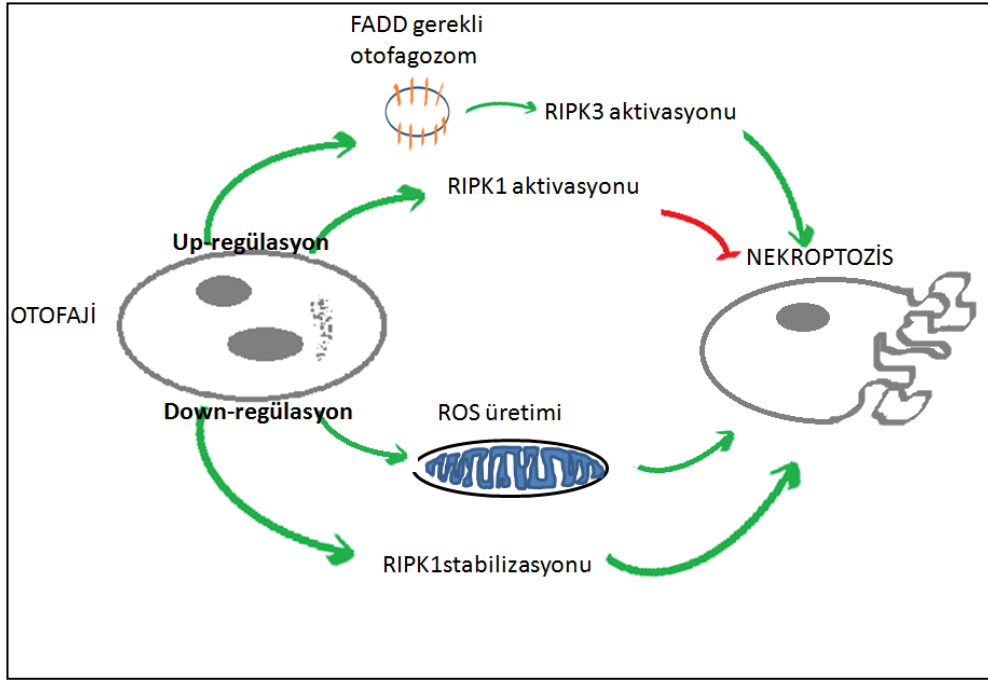
Nekroptozisin fizyolojik rolü nedir? RIPK3 ve MLKL eksikliği olan fareler bu farklı fenotipik olarak göstermezler ancak bir in vivo inflamasyon modeli olan kimyasal indüklü pankreatite karşı korunurlar (Wu ve ark., 2013). Son zamanlarda yapılan çalışmalar RIPK3'ün embriyogenesis sırasında yaşamsal önemi olduğunu ortaya çıkarmıştır, ancak bu etki kaspaz-8 ve FADD yokluğunda ortaya çıkmaktadır.

Yetişkin farelerin deri ve barsaklarında, kaspaz-8 inhibisyonun ortadan kaldırılmasıyla belirli organların başı çektiği RIPK3 ilişkili inflamasyon ve nekrozis tespit edilmiştir (Weinlich ve ark., 2013). Son yıllardaki çalışmalar RIPK3 indüklü inflamasyona rağmen hücre ölümü görülmeyen durumların RIPK3 bağımlı nekroptosis prosesi arasındaki direkt etkileşimi üzerinedir (Kang ve ark., 2013). Bu çalışmalarda RIPK3'ün inflamasyon-bağımlı interlökin (IL)-1b üretimini aktive ettiği ve MLKL ve PGAM5 gibi nekroptosisi aşağı yönde baskılayıcı araçlara gereksinimi bulunmuştur (Kang ve ark., 2013). Patolojik durumun çeşidine bağlı olarak, RIPK3 ve nekroptosis ilişkisi, hasar gören organ çeşidine göre farklı roller üstlenmektedir (Linkermann ve ark., 2013). Bu in vivo viral enfeksiyonlar sırasında nekroptosisin düzenleyici rolüne bir kanıt olabilir. RIPK3- geni olmayan farelerde, normal farelerin tersine virüs aşısı ile enfekte edildiklerinde ani ölümler görülmektedir (Cho ve ark., 2009). Virus ve immüitenin birlikte evrimi, virüs ve immün sistem arasında bir silahlanma yarışı olarak tanımlanabilir. Birçok virüs genomu kısmi olarak geniş çift zincirli bölgeler içerir (dsDNA), virüs aşılarda bu yapıları taşıyabilirler ve virüs genomu genelde apoptozis inhibitörlerini kodlar (Smith ve ark., 2013). Sonuç olarak viral olarak enfekte olmuş hücrelerde nekroptosis hücre ölümünü tetikleyen konak tarafından geri döndürülen bir mekanizma olabilir. Alternatif olarak, viral uyarılı nekroptosis virüsün konak hücre inflamatuvar yanıtını kapatan ve virüs gelişimine yardımcı olan bir mekanizmada olabilir. Bu sayede kaspaz-8 düzenlenmesi ile hem apoptozis hem de nekrozis üzerine kontrol sağlamaktadır (Oberst ve ark., 2011). Viral proteinlerin içerdiği RHIM domainleri, nekroptosisi direkt inhibe edebilmektedir, virüs proteinleri arasındaki RHIM-RHIM interaksiyonları zarar gördüğünde, nekroptosisin gerçekleştiği görülmüştür (Upton ve ark., 2012).

#### **4.3.4. Otofajik Hücre Ölümü**

Makrotofaji (bundan sonra metinde otofaji olarak geçecektir) lizozomlara bağlı bir işlemdir farklı taşıyıcıların, çeşitlimoleküller ve organellerin yıkımını içerir (Mizushima, 2011). Otofaji sırasında, sitoplazma membran formlarının izolasyonu, sitozolik taşıyıcıların oluşturduğu otofagozomları oluşturur. Olgun otofagozomlar lizozomlar ile birleşerek, makromoleküllerin yıkılmasını sağlar. Otofaji kompleks bir işlem olup, özel bazı proteinler (ATG proteinleri) aracılığı ile gerçekleşir. Organizmanın seviyesine göre otofaji birçok proste yaşamsal önem taşır, bunlar gelişim, immünite, yaşlanma gibi farklı durumları içermektedir (Choi ve ark., 2013).

Otofaji uzun hücre ölümü ile bağlantısından dolayı, otofajik veya tip II hücre ölümünde denmektedir (Das ve ark., 2012). Ancak bu durumla ilgili bazı istisnalar bulunmaktadır, otofaji hücre ölümü ile ilişkili olmak yerine hücre ölümünün sebebi gibi gözükmektedir. Ancak genellikle hücrede strese yanıt olarak pro-survival ilk etkilerden biri olarak otofaji tanımlanmaktadır, mesela açlık koşulları gibi. Sadece belirli koşullar altında uzamış bir otofaji yanıtı hücre ölümünü desteklemektedir (Kroemer ve Levine, 2008). Bu koşullar farklı raporlarda belirtildiğinde, otofajik hücre ölümü için gerekli noktalar olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4. 9. Otofajik hücre ölüm mekanizması (Stephen ve ark., 2014).

#### 4.3.4.1. Yüksek ökaryotlarda otofajik hücre ölümü

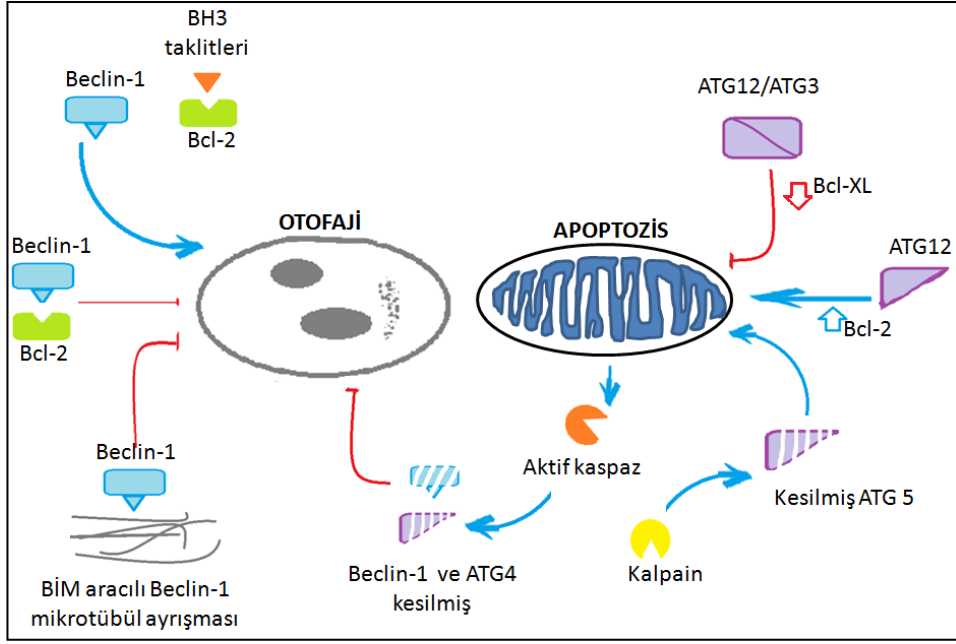
İn vivo kanıtlar eksik olsada, yüksek ökaryotlarda in vitroda hücre ölümünün otofaji bağımlı bir şekilde kontrol edildiğine dair birçok kanıt bulunmuştur. Otofajik hücre ölümü sadece apoptotik yolağın yokluğunda ortaya çıkmaktadır. Mesala, Bax yada Bak (genellikle Bak1) eksikliği olan hücrelerde, mitokondri bağımlı apoptotik yolağın aktivasyonu gerçekleşemediğinden, otofajik proteinler olan Beclin-1 ve ATG5 düzenlenemesine bağlı olarak hücre ölümü yönetilir (Shimizu ve ark., 2004). L929 hücrelerinde kaspaz-8 inhibisyonuna yanıt olarak, Beclin-1 ve ATG7 düzenlenemesine bağlı olarak otofajik ölüm görüldüğü bildirilmiştir. Ancak direkt olarak ölümü yürütmek yerine kaspaz inhibisyonunu takiben, artan ROS miktarının sitotoksik seviyelere yükselmesiyle otofajinin gerçekleştiği görülmüştür (Yu et al.,

2006). Olası klinik önemi olan başka bir çalışmada ise, benzer miyoloma hatlarında kaspaz-10 inhibisyonu ile otofaji-bağımlı hücre ölümünün tespit edilmiş olmasıdır (Lamy ve ark., 2013). Bazı kanıtlar yoğun bir apoptozisin varlığına bağlı olarak otofajininde aktive olduğu yönündedir. Beclin-1 aşırı ekspresyonun otofaji bağımlı olarak hücreleri öldürmesi, ATG5 knock-down hücrelerde ise bu yolun bloklanması kanıt olarak gösterilmiştir (Pattingre ve ark., 2005). Son yıllarda yapılan araştırmalarda hücre permabilitesini sağlayan belcin-1 ile ilişkili proteinlerden bazılarının hücre ölümünde indüklediği gösterilmiş, bu ölüm çeşidi otolizis olarak isimlendirilirken- otofajiji bağımlı bir apoptoz olduğu ancak nekroz ile ilişkili olmadığı için bu isim verilmiştir (Liu ve ark., 2013). Bu hücre ölümünde tümör baskılayıcı p53 proteinine bezer şekilde ancak p53 bağımlı bir yoldan, lizozomal protein DRAM upregülasyonu görülmektedir (Crighton ve ark., 2006). Ancak DRAM proteini çok az tespit edilmekte (Beclin-1 up-regülasyonunu takiben arttığı düşünülmektedir) hücrelerde apoptozisi başlatmak için az miktarda otofajiye ihtiyaç duyulmaktadır. Enterasan bir bulguda bazı araştırmalarda onkogenik H-Ras-V12 geninde otofajik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir, aslında bu ölümün apoptozis işaretlerini baskıladığı ve apoptotik sinyal yollarını basılayarak hücreyi otofajik olarak öldürdüğü tespit edilmiştir (Elgendy ve ark., 2011). Farklı otofajik elemanlara ait genlerin susturulduğu çalışmalarda, klonojenik canlılığın artışı ve gerçek anlamda otofajik bir ölüm tespit edilmiştir.

#### **4.3.4.2. Otofaji diğer hücre ölüm yolları arasındaki etkileşim**

Nekroziste olduğu gibi otofaji ile diğer hücre ölüm yolları arasında birçok etkileşim bulunmaktadır. Daha öncede tartışıldığı gibi kaspaz aktivitesi nekroptozisi baskılamaktadır. Ancak otofaji söz konusu olduğunda nekroptozis direkt olarak RIPK1 inhibisyonu aracılı olarak inhibe edilmektedir (Bray ve ark., 2012). Kimyasal madde uygulaması ile indüklenen otofajide RIPK1 ve RIPK3 bağımlı nekroptozis tamamen inhibe edilmiştir. Ayrıca otofaji başlangıcında görülen RIPK1 degradasyonun, nekroptosis için gerekli, mitokondrial ROS oluşumunda inhibe ettiği gözlenmiştir. Son yapılan çalışmalarda ise Bcl-2 inhibitörü olan obatoclaksın (GX15-070 olarak bilinir) nekroptozis için gerekli otofajiyi indüklediği tespit edilmiştir (Basit ve ark., 2013). Obatoclaks'ın otofajiyi nasıl uyardığı tam olarak açıklanamamış, ancak obatoclaks'ın hedef dışı etkilerinin pro-otofajik fonksiyonlarında Bcl-2 antagonizmine rastlanmıştır. Obatoclaks-indüklü nekroptozis

otofagozomal bir düzenlenme ve FADD gerektirmektedir, RIPK1 aktivasyonu önderliğinde gerçekleşen RIPK3 aktivasyonu nekroptozise sebep olmaktadır. Henüz test edilmemiş bir başka olası mekanizmada FADD üzerinden, otofagozomal membranların ATG5 aracılığı ile aktive oldukları düşünülmektedir (Pyo ve ark., 2005). Anti apoptotik proteinler olarak bilinen Bcl-2 ailesi üyeleri, belcin-1 bağlanması ile otofajiyi direkt olarak inhibe edebilir. Anti apoptotik Bcl-2 proteinlerine yapısındaki BH3 domainleri aracılığı ile bağlanır. Bu bilgi bize Bcl-2 ailesi üyelerinin otofajiyi inhibe etme yeteneğini, ayrıca belcin-1'in ise Bcl-2 anti-apoptotik etkilerinin tümünü inhibe edemediğini gösterir (Ciechomska ve ark., 2009). Bu durum tam olarak aydınlatılmış olmasada, belcin-1'in Bcl-2 ailesi üyelerine olan afinitesi BH3- içeren proteinlere olan afinitesinden düşüktür. Bcl-2 proteinlerinin anti-otofajik rollerini destekleyen diğer bir bilgede; BH-3-içeren protein ya da taklitlerinin (bunlara BH-3 mimikleri denmektedir) otofajiyi indükleyebildiğidir (Maiuri ve ark., 2007). BH3-içeren protein Bim'in belcin-1 etkisini nötralize ederek, mikrotübülleri ayırdığı bildirilmiştir (Luo ve ark., 2012). Otofaji ya da otofaji proteinleri apoptozisi etkileyebilir. Ubiquitin benzeri protein ATG12, ATG3 ün non-kononikal konjugasyonla, anti apoptotik Bcl-XL proteinini upregüle ederek, apoptozisi inhibe ettiği görülmüştür (Radoshevich ve ark., 2010). Dahası aynı makalede unkonjuge formdaki ATG12 lerin BH3-içeren proeinleri taklit ederek anti-apoptotik Bcl-2 proteini fonksiyonlarını nötralize ettiğide bildirilmiştir (Radoshevich ve ark., 2010). Kalpain-aracılı ATG5 kesiminin önderliğinde gerçekleşen pro-apoptotic kesim ürünlerinde, BH3-protein-benzeri özelliklere rastlanmamıştır (Yousefi ve ark., 2006). Apoptozis fazlarının degradasyonu sırasında, farklı otofajik proteinler (belcin-1, ATG4 gibi) rol oynamakta ve kaspazlar tarafından düzenlenmektedirler (Betin ve Lane, 2009; Luo ve Rubinsztein, 2010). Sonuç olarak otofaji baskılandığında hücre apoptozise gitmektedir. Hücrelerin ölüp, ölmeyeceği bir kesinlik içermesede, otofajinin durdurulmasıyla, immün sistemdeki gibi hücrelerin ölmesine yol açması olasıdır.



Şekil 4. 10. Otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki (Stephan ve ark., 2014).

#### 4.3.5. Pyroptosis

Pyroptosis apoptozisten farklı özelliklere sahip, kaspaz-bağımlı hücre ölüm yollarından birisidir. Apoptozisten farklı olarak, kaspaz-1 (Miao ve ark., 2010) ve kaspaz-11 (insanlarda kaspaz-5) aktivasyonuna bağlı bir şekilde gerçekleşir (Kayagaki ve ark., 2011). Bu isim inflamasyon özellikleri taşıyan bir hücre ölüm tipi olduğu için verilmiştir.

Kaspaz-1 mature inflamatuvar sitokinlerde inaktif IL-1 $\beta$  ve IL-18 üretimini sağlar. Kaspaz-1 sitokin maturasyonu ile hedef hücrelerin ölümünden sorumludur (Bergsbaken ve ark., 2009). Pyroptosisin moleküler temeli ve in vivo'daki olası etkileri açıklanmaya çalışılacaktır.

##### 4.3.5.1. Pyroptosisin başlangıcı ve hücre ölümü

Pyroptosis ile ölen bir hücre apoptozisten farklı biyokimyasal ve morfolojik değişimler geçirir. Kaspaz-1 pro-inflamatuvar kaspaz olarak tanımlanan ilk kaspazdır ve apoptozisin gerçekleşmesi için aktivasyonu gerekli kaspazlardan biri değildir. Kaspaz-1 apoptozisin başında görülsede, tipik kaspazlar gibi diğer kaspazların ve sonuçta PARP1 ve ICAD (DFFA olarakta bilir) aktivasyonlarını gerçekleştirmez. Ayrıca apoptoziste tipik olarak görülen mitokondrial permabilizasyon, pyroptosis sırasında meydana gelmez. Onun yerine pyroptoziste hücre şişer ve aniden plazma membran permabilizasyonu gerçekleşir. Bakterial enfeksiyonlarda toksin etkisiyle,

plazma membran porları kaspaz-1 bağımlı olarak şişer ve osmatik liziz meydana gelir (Fink ve Cookson, 2006). Apoptozise benzer bir şekilde uzun nükleer DNA fragmentasyonu gerçekleşir, pyroptosis sırasında meydana gelen DNA fragmentasyon mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsada, apoptoziste bu mekanizma ile ilişki olan CAD ve DNase aktivasyonu görülmez (Bergsbaken ve Cookson, 2007). Kaspaz-1 pro-inflamatuar veya pro-ölüm etkilerinden hangisi görülürse görülsün, kaspaz-1 aktivasyonu kompleks inflamazom adı verilen bakterial toksin yada viral DNA içeren yapılarla sonlanır (Hena-Mejia ve ark., 2012). İnflamazomlar kaspaz-1 dimerizasyonu aktive eder. Ancak aktif kaspaz-1'lerin hücreleri nasıl öldürdüğü tam olarak açıklanamamıştır, bu kaspazların substratları ve hücreyi aniden nasıl öldürdükleri henüz tanımlanmamıştır. Bu konudaki teorilerden biri bakterial ve viral patojenlerin kaspaz-1 aracılı IL-1b ve IL-18 oluşumuna neden oldukları ve konak hücrede inflamasyon yanıtını başlatarak, enfeksiyona sebep oldukları yönündedir (Bergsbaken ve ark., 2009). Ancak bu konudaki spekülasyonlardan biride, konak stratejisini çözebilmek için bu yolağı virüs ve bakterilerin aktive ettiği yönündedir. Başlangıçta konak makrofajlarının pro-inflamatuar sitokinler ile uyarılarak pyroptosis ile öldürülmesi ve aktive makrofajların ortadan kaldırılması şeklindedir. Bu mekanizmalarla aktif kaspaz-1 inflamasyon ve ölüm ile ilişkilendirilmektedir. Sonuç olarak, kaspaz-1'in IL-1b ve IL-18 maturasyonu üzerindeki rolü açısından bakıldığında pyroptosis proinflamasyonla daha fazla ilişkili olabilir. Belkide pyroptosisin ana fonksiyonu basit enfeksiyonların, konak hücreyi ortadan kaldırarak, kontrol altında tutulmasıdır. Alternatif olarak salınan inflamatuvar sitokinlerin maturasyonları için gerekli olabilir.

#### **4.3.5.2. Kaspaz-bağımsız hücre ölümü**

Pro-apoptotik hedefler mitokondrial dış membran permabilizasyonu (MOMP) ile ilişkili olduklarında gerçekleşen hücre ölümünde kaspaz aktivitesi yoktur, dolayısıyla kaspaz-bağımsız hücre ölümü olarak isimlendirilmektedir (Tait ve Green, 2008). Mitokondrial permeabilizasyon genellikle dönüşü olmayan bir nokta olarak görülür. Kaspaz bağımsız hücre ölümü (CICD) apoptozis ile benzerlikler içersede, morfolojik, biyokimyasal ve kinetik açıdan farklılıklar görülmektedir. Ayrıca CICD, kanonikal mitokondri bağımlı apoptozise göre farklı hücrelerde çok farklı yollardan gerçekleşebilmektedir.

## **5.GEREÇ VE YÖNTEM**

### **5.1. Kullanılan Araç ve Gereçler**

#### **5.1.1. Kullanılan Cihazlar**

- Püskürtmeli kurutucu
- Ultra saf su cihazı
- LC MS/MS sistemi
- Akış sitometrisi
- Mikroplak okuyucu
- Manyetik karıştırıcı
- Laminar kabin
- İnkübatör
- Elektroforez sistemi
- Güç kaynağı
- Trans blot
- Görüntüleme cihaz
- -152°C SANYO
- -80°C SANYO
- Masaüstü soğutmalı tüp santrifüjü
- Masaüstü soğutmalı ependorf santrifüjü
- Faz-kontrast mikroskobu
- İnvirt mikroskop
- Floresans mikroskobu
- Hassas Terazî
- pH Metre
- Vorteks
- Orbital shaker
- Otoklav

### **5.1.2. Kullanılan Kimyasallar**

- Penicilin/Streptomycin
- DMEM
- DMEM-F12
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- L-Glutamin
- Dimetilsülfoksit (DMSO)
- Tripan mavisi
- Tripsin/EDTA çözeltisi
- Fosfat tamponu (PBS)
- Hücre proliferasyon kiti (WST-1)
- Propidyum iyodür (PI)
- Annexin-V/PI Apoptosis kiti
- 2',7'-Diklorofloresein diasetat (DCFDA)

## **5.2 . Yöntemler**

### **5.2.1. Yeşil ve siyah çay ekstralarının hazırlanması**

Tez çalışmalarında kullanılan polifenoller yeşil ve siyah çaydan ekstrakte edildi. Ekstrakt hazırlanırken, 10 g kuru madde tartılarak 100 ml kaynamış distile suda 15 dakika beklendi. Maserasyon süresi sonunda süzülen çay yaprakları püskürtmeli kurutucu ile toz haline getirilir. Kullanılacağı zamana kadar nemden uzak tutularak saklanır.

### **5.2.2. LC/MS-MS Analizleri**

MS manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışmaktadır. Numune buharlaştırılıp, hızlı hareket eden elektronlarla bombardıman edilerek pozitif iyonlara dönüştürülür. Oluşan iyonlar, gaz akımından bir elektrik alanı ile tutulur ve kütle/yük oranına göre ayrılırlar. Uygun bir dedektör, farklı kütledeki partikülleri, niteliksel, niceliksel veya her iki şekilde tanımlar.

Manual tuning metodu ile ilk önce standartların cihaza tanıtılması gerçekleştirilir. MRM metodunda ana iyon ve bu iyondan oluşan fragment iyonların parçalanması için gerekli olan enerji miktarları tespit edilir. sch MRM çalışmaları, MRM çalışmalarının arkasından kolon kullanılarak gerçekleştirilir ve ayrıştırılan maddelerin kolondan ayrılma zamanları (retention time-RT) belirlemek için gerçekleştirilir.

#### **5.2.2.1. Standart stoklarının hazırlanması**

Yeşil ve siyah çaylarda miktar analizlerine bakılması planlanan standartlar kafein (CA), gallik asit (GA), epikateşin (EC), epigallokateşingallat (EGCG), epikateşingallat (ECG) ve epigallokateşin (EGC) olarak belirlendi. Standartlar 1000 ppm'lik birinci ve 1000 ppb'lik ikinci stoklar hazırlandı. Bu standartlar kullanılarak ara stoklar 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 400 ppb olarak hazırlandı.

#### **5.2.2.2. Manual Tuning Metodu**

Nötral moleküler ağırlıkları bilinen maddeleri cihaza tanıtmak amacıyla saf standartlar kullanılarak 5ppm'lik konsantrasyonlarda, 10 µl/dk akış hızında, enjeksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlanmış olan pompa yardımıyla hamilton şırıngasına çekilen standart cihaza verildi. Shimadzu LCABSCIEX 4000Q

TRAPLC/MS-MS hibrit sistemi kullanılarak standartlar cihaza tanıtıldı. Bu çalışma sırasında çalışılacak olan standartların moleküler ağırlıkları, molekülün enerji ile parçalanacak olan kısmı, m/z oranları belirlendi. Bu parçalanmanın gerçekleşmesi için gerekli olan Q1, Q2, DP, EP, CE ve CXP değerleri cihaz tarafından belirlendi.

### **5.2.2.3. MRM ve sch MRM çalışması**

Kolon ve mobil fazlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada ilgili standartların kolonda tutulma süreleri belirlendi. Madde optimizasyonu için ODS-3 $\mu$ m X 100 mm (GL-Science HPLC kolon) kolon kullanıldı. Mobil faz olarak distile su ve metanol karışımı kullanıldı. 20 $\mu$ l injeksiyon hacmi ve 500 $\mu$ l/dakika akışla ayarlanan cihaz, zaman programlaması da yapıldıktan sonra, her bir madde için pozitif ve negatif MRM modu kullanılarak taramalar gerçekleştirildi. Standart grafikler çizdirilerek, R<sup>2</sup> değerleri ve denklemler elde edildi. Özellikle m/z oranları birbirine yakın olan maddelerin ayrımı için kullanılan bu yöntemde birbirlerinden türeyen polifenollerin ayrıştırılması ve tanımlanmasında kullanıldı. Validasyon çalışmaları sırasında her madde için cihazın ve metodun sınırlandırmalarını anlamak üzere dedekte edilebilen en düşük madde miktarı ve miktarı belirlenebilen en düşük madde miktarı tespit edilmiştir. Maddelerin tümü için farklı günlerde ve gün içinde % tekrarlanabilirlik ve geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerin sonunda polifenol ekstraktlarındaki madde miktarları standart grafiklerden elde edilen denklemler kullanılarak, cihaz tarafından belirlenmiştir.

### **5.2.3. Hücrelerin Çözülmesi**

ATCC'den ticari olarak temin edilen MCF-7 ve MDA MB-231 hatlarında gerçekleştirilmiştir. Hücreler -152°C'den alınarak hızla çözünmesi sağlandı. Çözünen hücreler içerisinde 10ml besi yeri bulunan 15ml'lik tüplere alınarak 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernetant uzaklaştırıldıktan sonra pellet resüspanse edilerek, besi yeri içeren flasklara ekildi. Flasklar 37°C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakıldı, hücre çoğalması her gün takip edildi.

### **5.2.4. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılmaları**

Hücrelerin besi yeri değişimleri, pH değişimine bağlı olarak üç dört günde bir gerçekleştirildi. Pasaj yapmak için hücrelerin ekildikleri flaskları %70-80 oranında doldurmaları beklendi. Pasaj sırasında besi yeri flasklardan uzaklaştırıldı, PBS ile üç kez yıkanan hücreler, flaskın boyutuna göre eklenen tripsin-EDTA ile 37°C'de 5

1 dakika inkübe edildi. Tripsin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla eklenen besi yeri ile birlikte 15ml'lik tüplere toplanan hücreler 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üç dört pasajda bir hücreler kryoveller kullanılarak, %80 besi yeri, %10 FBS, %10 DMSO içeren ortamda dondurularak daha sonraki deneylerde kullanılacak stoklara hazırlandı. Dondurulan hücreler bir gece -80°C'de bırakıldıktan sonra ertesi gün -152°C'ye kaldırıldı.

#### **5.2.5. Hücrelerin Sayılması**

Flasklardaki besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra, pasajlamada anlatılan şekilde toplanan hücreler, pelletin miktarına göre besi yeri ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10µl alındı, 10µl tripan mavisi ile pipetaj yapılarak karıştırıldı. Thoma lamı ve lamel arasına boyanan hücrelerden 10µl konularak ters-faz ışık mikroskopunda 10X büyütmede hücreler sayıldı. Tripan mavisi ile boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak değerlendirildi ve aşağıdaki formüle göre ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

Hücre sayısı/ml= Ortalama sayım değeri X seyreltme faktörü X 10<sup>4</sup>

#### **5.2.6. Hücre Canlılığının Belirlenmesi**

Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan WST-1 stabil bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerde glikolitik yolda üretilen NAD(P)H'e bağımlı olarak indirgenir ve formazan kristallerinin oluşmasına sebep olur. Deney sonunda oluşan formazan kristali miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artar. Hücreler yukarıda anlatıldığı şekilde çoğaltılıp, sayıldıktan sonra 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 100µl besi yeri/kuyu içeren 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve 24 saat 37°C'de kuyulara tutunmaları için inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün yeşil ve siyah çay ekstraksiyonlarından hazırlanan ana stoklardan 10, 20, 40, 60, 80, 100 ve 150 µg/ml olacak şekilde etken maddeler uygulandı. Bu maddelerin hücre canlılığına olan etkileri zamana bağlı olarak incelenmek üzere, ilaç uygulamasından 6, 12 ve 24 saatin sonunda WST-1 dan 10µl eklendi. 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında formazan kristelleri sayesinde oluşan renk değişimi spektrofotometre kullanılarak 450nm'de ölçüldü hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Canlılık= (Örnek<sub>450nm</sub>-Blank<sub>450nm</sub>)/(Control<sub>450nm</sub>-Blank<sub>450nm</sub>)

### 5.2.7. Akış Sitometrisinde Apoptoz ve Nekroz Tayini

Akım sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir. Her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayınlanan fluoresan ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur. Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır, ayrıca sıvı içinde hücreler tek tek askıda olmalıdır. Hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, fluoresan ışığı yayarlar.

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, gelişim basamaklarına göre çeşitli evrelerde incelenebilir. Apoptozun erken aşamalarında hücrelerin fosfotidil serin yapılarını hücre zarından dışarı doğru çıkardıkları belirlenmiştir. İlerleyen aşamalarda hücre zar yapısının bozulması ile zar da porlar oluşmaktadır. Hücre DNAsındaki kırıklar, membran ve organellerin bir kısmını içeren tomurcuk oluşumları ile karakteristik olan apoptotik süreç, hücre ölüm yollarından biridir. Apoptoz yolağının aktivasyonu sırasında hücre zarında açığa çıkan fosfotidil serinlerin boyanmasını sağlayan Annexin V, FITC konjüge olduğundan FL1 panelinde görüntülenirken, hücre çekirdeğini boyayan PI, apoptozun geç evresindeki ve nekrotik hücreleri boyayarak FL2 panelinde görüntülenir. Sonuç olarak boyanmayan hücreler canlı, sadece AnnexinV ile boyanan hücreler erken apoptotik, her iki boya ile boyanan hücreler geç apoptotik, sadece PI ile boyanan hücreler ise nekrotik olarak değerlendirilir.

Polifenollerin apoptoz ve nekroza olan etkileri hücrelerin Annexin V/PI ile boyanmaları ile belirlendi. Hücreler 2 ml besi yeri içeren 6 kuyucuklu plaklara,  $17 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve yapışmaları için  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe

edildi. Belirlenen miktarlarda polifenollerin uygulanmasından sonra 6, 12 ve 24. saatteki apoptoz ve nekroz oranları akış sitometrisi cihazı ile analiz edildi. Hücreler FACS tüplerine toplandıktan sonra, 5 dakika 160xg'de santrifüj edildi. Hücre pelletine 1-2ml annexinV bağlama tamponu eklendi ve tekrar santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 2µl AnnexinV, 3µl PI eklendi, tüpler 15 dakika, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 500µl bağlama tamponunu eklen tüpler buza alındı ve akış sitometrisinde analiz gerçekleştirildi.

#### **5.2.8. Akış Sitometrisinde ROS Miktarının Ölçülmesi**

Polifenollerin uygulanması sonrasında, hücre içi ROS miktarındaki değişiklikler akış sitometrisi kullanılarak analiz edildi. Bu metodun prensibi floresans olmayan bir boya olan DCFDA ile boyanan hücrelerin reaktif oksijen türleri ile karşılaşması sonucunda floresans bir madde olan DCF'ye dönüşmesine dayanmaktadır. Akış sitometrisinde FL1 panelinde okunan tüpler kontrol grubunun sonuçları ile karşılaştırılarak ROS miktarında gerçekleşen artma ya da azalma belirlenebilir.

Hücreler 2 ml besi yeri içeren 6 kuyulu plaklara,  $17 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Ertesi gün polifenol ekstireleri uygulandı. Hücre ROS miktarındaki zamana bağlı değişikliklerin gözlenmesi amacıyla ölçüm 6, 12 ve 24. saatlerde gerçekleştirildi. Hücreler FACS tüplerine daha önceden bahsedildiği şekilde toplandı, 400 xg'de 5 dakika santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. 100µM DCFDA ana stoğundan son hacim 10µM olacak şekilde eklendi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 37°C'de 30 dakika, karanlıkta inkübasyona bırakılan tüplere, 500 µl PBS eklenerek akış sitometrinde analiz edildi.

#### **5.2.9. Akış Sitometrisinde Hücre Döngüsü Analizi**

Hücreler 2 ml besi yeri içeren 6 kuyucuklu plaklara,  $17 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Fenolik maddeler uygulandıktan sonra 6, 12 ve 24. saatlerde hücre döngüsü analizi gerçekleştirilerek, polifenollerin döngüyü nasıl etkiledikleri gözlemlendi. Toplanan hücreler %70'lik etanol ile fiske edildikten sonra fosfat-sitrik asit tamponunda (0.2M, pH7.8) DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra ekstrakte edilen DNA'lar PI ile boyanarak 3 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Akış sitometrisinde analiz edildi.

## 5.2.10. Faz I ve Faz II Enzim Deneyleri

### 5.2.10.1. Hücre lizatlarının hazırlanması

Hücreler 10ml besi yeri 100'lük petri kaplarına 1300 000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve yapışmaları için 24 saat beklendi. Yeşil ve siyah çay ekstraktları ertesi gün 75µg/ml olacak şekilde petrilere eklendi. Fenolik maddelerin uygulamasından sonraki 6'ncı, 12'nci ve 24'üncü saatlerde ekstraksiyon tamponu (2mM EDTA, %0.8 Digitonin) kullanılarak liziz yapıldı. Ölçümün yapıldığı tarihe kadar -30<sup>0</sup>C'de saklandı.

### 5.2.10.2. Kinon redüktaz aktivitesi

Faz I detoksifikasyon enzimi NAD(P)H: kinon oksido redüktaz olarak bilinir ve insan vücudunda ve çevresinde doğal olarak bulunan yüksek derecede reaktif kinon moleküllerinden serbest radikal oluşumunu önleyerek organizmayı oksidatif hasara karşı korur.

Örnekler ve körden 96 kucuklu plaklara 10 µl/kuyu olacak şekilde konulduktan sonra, MTT ve menadion içeren kinon redüktaz ölçüm solüsyonundan 100 µl kuyulara eklendi. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda 5 dakika karıştırıldıktan sonra 37<sup>0</sup>C'de yarım saat (mavi renk oluşana kadar beklendi) inkübe edildi. Renk oluşumu gözlemlendikten sonra kuyulara 0.3 mM warfarin 25 µl/kuyu olacak şekilde dağıtıldı. 610 nm'de absorbanslar okundu. Örneklerin kinon redüktaz aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı. (MTT molar ekstinksiyon katsayısı, nmol MTTε=11.3)

QR aktivitesi (U/ml)=[(Δ<sub>610nm</sub>/dak)/0.0113 µM<sup>-1</sup>/cm]X(0.135 ml/0.01 ml)X dilüsyon

### 5.2.10.3. Glutatyon transferaz aktivitesi

Toksik ya da karsinojenik kimyasal varlığında ekspresyonları artan faz II enzimlerinden biri olan glutatyon transferaz, glutatyona elektrofil molekül bağlanmasını katalizleyerek, bu moleküllerin protein, nükleik asit gibi hayati önemi olan molekülleri zarar vermeden ortadan kaldırılmalarını sağlar.

Ölçümde 100 mM glutatyon, 100mM 1-cloro,2,4-dnitrobenzen (CDNB) ve fosfat tamponu (55.6mM, pH;6.5) kullanıldı. Ekstraksiyon sonrasında 15'lik falkon tüplerine her bir örnek için 980 µl fosfat tamponu, 10 µl CDNB, 10 µl glutatyon eklenerek karıştırıldı. Ependorflara örnek ve körden 100 µl konuldu, hazırlanan

ölçüm tamponundan 1 ml eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Hazırlanan karışımlar 200 µl/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plaklara konularak 5 dakika içerisinde, 340 nm’de absorbansları okundu. Glutasyon transferaz aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı. (CDNB molar ekstinksiyon katsayısı= 0.0096 µM<sup>-1</sup>/cm)

GST aktivitesi (U/ml)=[(Δ<sub>340nm</sub>/dak)/0.0096 µM<sup>-1</sup>/cm]X(0.135ml/0.01ml)X dilüsyon

#### **5.2.11. Kullanılan İstatistik Yöntemler**

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri GraphPadPrism yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde ANOVA testi kullanılarak anlamlılık sınırı p<0.05 olarak alınmıştır. Değerler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir.

## **6.BULGULAR**

### **6.1. Yeşil ve Siyah Çay Ekstreleri**

Ekstraksiyon sonrasında 100 ml'lik ekstraktan yaklaşık olarak 5g toz madde elde edildi.

### **6.2. Polifenol Ekstrelerinin LC/MS-MS ile Analizi**

#### **6.2.1. Manual-tuning**

Çay ekstralarında miktar analizleri yapılacak olan standartlardan değişik konsantrasyonlarda hazırlanarak *manuel-tuning* yöntemi ile cihaza verildi. Bu çalışma sırasında çalışılacak olan standartların moleküler ağırlıkları, molekülün enerji ile parçalanacak olan kısmı, m/z oranları belirlendi. Bu parçalanmanın gerçekleşmesi için gerekli olan Q1, Q2, DP, EP, CE ve CXP değerleri belirlendi (Tablo1).

#### **6.2.2. MRM ve sch MRM çalışması**

Triple quadrapole kütle spektrometrelerinde MRM modu iki aşamalı olarak çalışılmaktadır. İlk aşamada ilgilenilen maddenin (precursör iyon) Q1'de m/z oranına göre seçilmesi gerçekleşmektedir. Nötral bir gaz eşliğinde Q1'e geçen iyonlardan kütle/yük oranına göre seçilen prekürsör iyon, Q2'de parçalanarak fragment iyonlar oluşmaktadır. Q2'de parçalanma enerji ile oluşan fragment iyonlar Q3'te analiz edilerek beklenen fragmentlerin oranı standartlardaki miktarlarla karşılaştırılır. Declustering potential (DP) taramanın yapıldığı moda göre prekürsör iyonun parçalanma enerjisini, entring potential (EP) fragment iyonların Q3'e giriş enerjisini göstermektedir. Collision cell entrance (CE), collision cell exit potential (CXP), fragment iyonların çarpışma hücrelerine giriş ve çıkış enerjilerini göstermektedir.

Kolon ve mobil fazlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada ilgili standartların kolonda tutulma süreleri belirlendi. Özellikle m/z oranları birbirine yakın olan maddelerin ayrımı için kullanılan bu yöntemde birbirlerinden türeyen polifenollerin ayrıştırılması ve tanımlanmasında kullanıldı (Tablo 6.1).

**Tablo 6. 1.**Manual-tunnig ve MRM çalışmaları.Manual-tunnig ve MRM çalışmaları. Analizi yapılacak maddelerin enerjileri ve kolondan ayrılma zamanları.

Q1	Q2	DT	Madde adı	DP	EP	CE	CXP	RT
168.738	124.8	150	Gallik Asit	-55	-10	-20	-7	2.7
288.778	108.0	150	Epikateşin	-90	-10	-34	-5	4.1
456.787	168.7	150	Epigallo kateşin galat	-90	-10	-24	-11	4.2
440.791	168.7	150	Epikateşin galat	-95	-10	-26	-13	4.7
304.792	124.6	150	Epigallokateşin	-95	-10	-30	-5	-4.2
195.143	138.1	150	Kafein	76	10	27	12	3.92

**Tablo 6. 2.** Standartların LOD, LOQ ve RT değerleri.

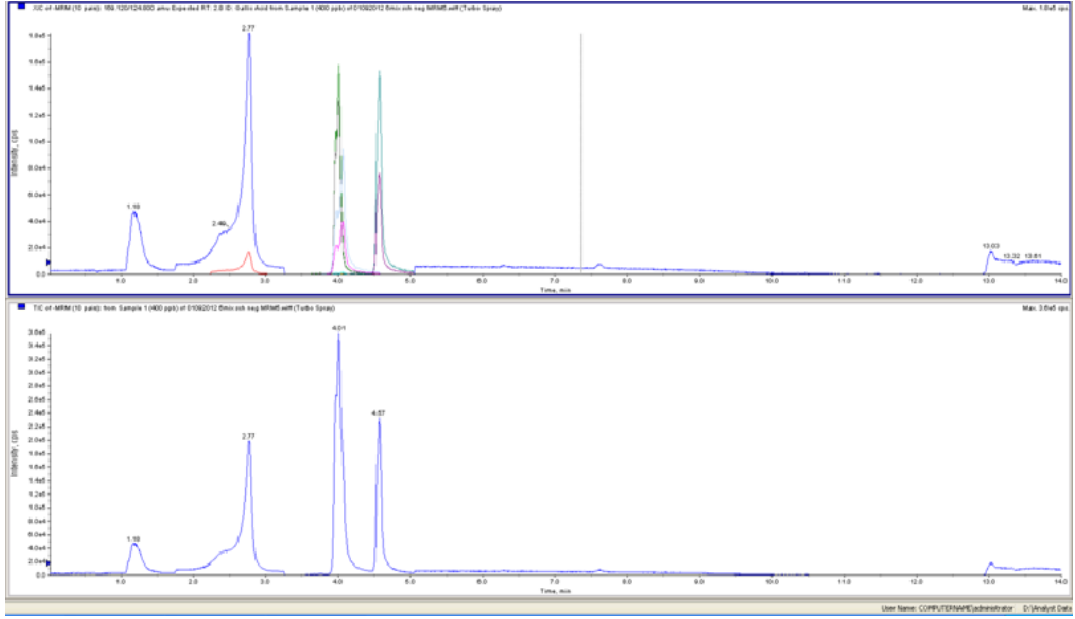
Fenolik Madde	LOD(ppb)	LOQ (ppb)	RT
Kafein	0.07	0.22	3.92
Gallik asit	0.70	2.33	2.7
Epikateşin	0.25	0.82	4.1
Epigallokateşin gallat	0.60	2.01	4.2
Epikateşingallat	0.17	0.56	4.7
Epigallokateşin	5.22	17.40	4.2

**Tablo 6. 3.**Standart grafiklerin R<sup>2</sup> değerleri ve denklemleri.

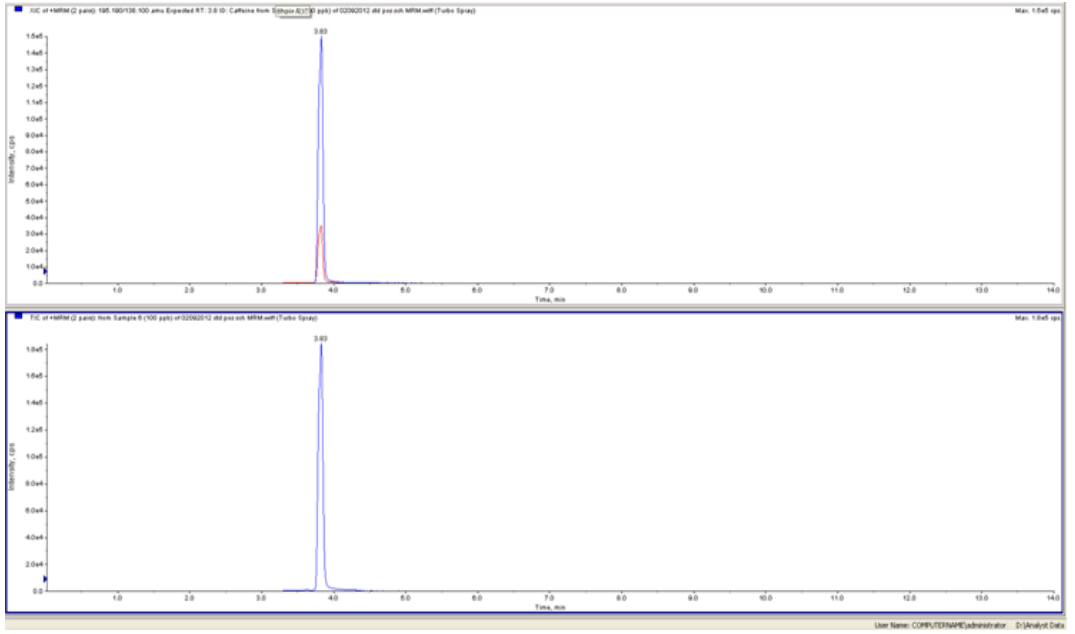
Fenolik Madde	R <sup>2</sup>	Denklemleri
Gallik asit	0.9861	y= 2220x + 40400
Epikateşin	0.9979	y= 867x + 2660
Epikateşingallat	0.9913	y= 1750x + 7850
Epigallokateşin	0.9907	y= 67,5x + 2220
Epigallokateşin gallat	0.9915	y= 591x + 5620
Kafein	0.9990	y= 5350x + 10500

Kantitatif tayin limiti (LOQ), kesinlik, ortalama geri kazanım (gerçeklik veya sapma ölçümü olarak) ve hassasiyet için test edilmesi zorunludur. Metodun doğruluğunun kontrolü için spike edilmiş geri kazanım örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Hem raporlama limitinde (metodun hassasiyetinin kontrol edilmesi için) hem de en az bir başka daha yüksek düzeyde, örneğin MRL“de en az 5 tekrar (kesinliği kontrol etmek için) gerekmektedir, bizim örneklerimizde bu ölçüm 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. LOQ metot performans kabul edilebilirlik kriterlerini karşılayan (her bir temsili ürün için ortalama geri kazanımlar %70-120 aralığında ve  $RSD \leq \%20$  olmak üzere) en düşük doğrulanmış spike düzeyi olarak tanımlanmaktadır. Analiz metodunun performans kriterlerine uygun olduğunu gösteren başka yaklaşımlar da kullanılabilir; ancak, bunların aynı bilgi düzey ve kalitesini sağlamaları gerekmektedir.

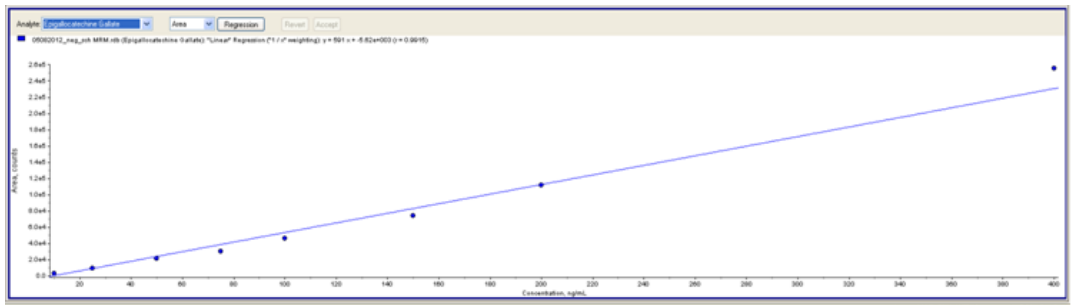
Daha sonra hazırlanan standartlar farklı konsantrasyonlar da cihaza verilerek her bir standart için belirlenen koşullarda parçalanma enerjileri ve RT yardımıyla negatif ve pozitif taramalar gerçekleştirilerek standartlar için grafikler çizildi (Tablo 6.2). Standart grafiklerin  $R^2$  değerleri ve denklemleri Tablo 6.3'te verilmiştir.



**Şekil 6. 1.** Sch Negatif MRM taraması.



**Şekil 6. 2.** Sch Pozitif MRM taraması.



**Şekil 6. 3.** Epigallokateşin galat standart grafiği.

### 6.2.3. Validasyon çalışmaları

Standart grafikler çizildikten sonra metod validasyon çalışmaları ile konsantrasyonları bilinen standartlar verilerek, yüzde tekrarlanabilirlik ve yüzde RSD değerleri hesaplanmıştır. Verilen dozların standart grafik ile ne kadar doğrulukla hesaplandıkları bulunmuştur, tablodaki değerler (Tablo 6.4) aynı günde alınan üç farklı ölçümün ortalamasını ve üç farklı günde yapılan ölçümlerin ortalamalarını içermektedir.

**Tablo 6. 4.** Validasyon çalışmalarının sonuçları. Tablo üç farklı gün ve gün içindeki üç farklı ölçümü içermektedir.

	Doz ppb	ng.ml <sup>-1</sup>	%RSD	Tekrar %	ng.ml <sup>-1</sup>	%RSD	Tekrar %
		Gün içerisindeki üç ölçüm			Üç farklı gün ölçümleri		
<b>Gallik asit</b>	75	76.57	0.62	102.33	79.27	3.58	79.27
	150	152.00	0.66	101.33	145.33	1.58	96.93
<b>Epikateşin</b>	50	43.40	0.35	86.93	44.00	2.34	88.00
	500	500.00	0.64	99.73	491.00	3.77	98.30
<b>Epigallokateşin</b>	75	74.50	2.74	99.10	77.10	9.53	103.00
	200	205.00	1.29	103.00	207.00	5.35	103.00
<b>Epikateşingallat</b>	200	206.00	0.97	105.00	206.00	9.53	103.00
	400	388.00	0.91	103.00	389.00	2.21	97.30
<b>Epigallokateşin galat</b>	75	75.30	2.93	100.00	75.00	0.28	99.90
	100	103.00	6.65	103.00	84.20	1.30	84.20
<b>Kafein</b>	100	114.00	1.52	114.00	108.00	3.70	108.00
	200	208.00	0.48	104.00	198.00	2.39	98.70

LC/MS-MS ile yapılan çalışmaların sonunda yeşil çay ve siyah çaydan elde edilen polifenol ekstraktlarındaki madde miktarları tespit edilmiştir. Yeşil çayda en fazla bulunan fenolik madde epigallokateşingallat olarak tespit edilmiştir. Bu fenolik maddeyi ikinci olarak epigallokateşin takip etmektedir. EGCG miktarı yeşil çayda siyah çayda tespit edilen miktarın yaklaşık 40 katı kadar fazla bulunmuştur. Yeşil çayda tespit edilen epikateşingallat miktarı siyah çayın yaklaşık 40 katı olarak bulunmuştur. Yeşil çaydaki kafein miktarı üçüncü sırada en yüksek olarak tespit edilen maddedir. Yeşil çaydaki kafein miktarı siyah çayın yaklaşık iki kadar fazladır. Siyah çayda en fazla miktarda bulunan madde kafein olarak tespit edilmiştir (Tablo 6.5).

**Tablo 6. 5.** Yeşil ve siyah çayın polifenol içeriği ( $\mu\text{g/mL}$ ).

<b>Fenolik Madde (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Yeşil Çay</b>	<b>Siyah Çay</b>
<b>Kafein</b>	103.83	66.33
<b>Gallik asit</b>	13.62	9.73
<b>Epikateşin</b>	60.50	2.74
<b>Epigallokateşingalat</b>	327.50	8.45
<b>Epikateşingallat</b>	88.33	4.10
<b>Epigallokateşin</b>	332.52	8.85

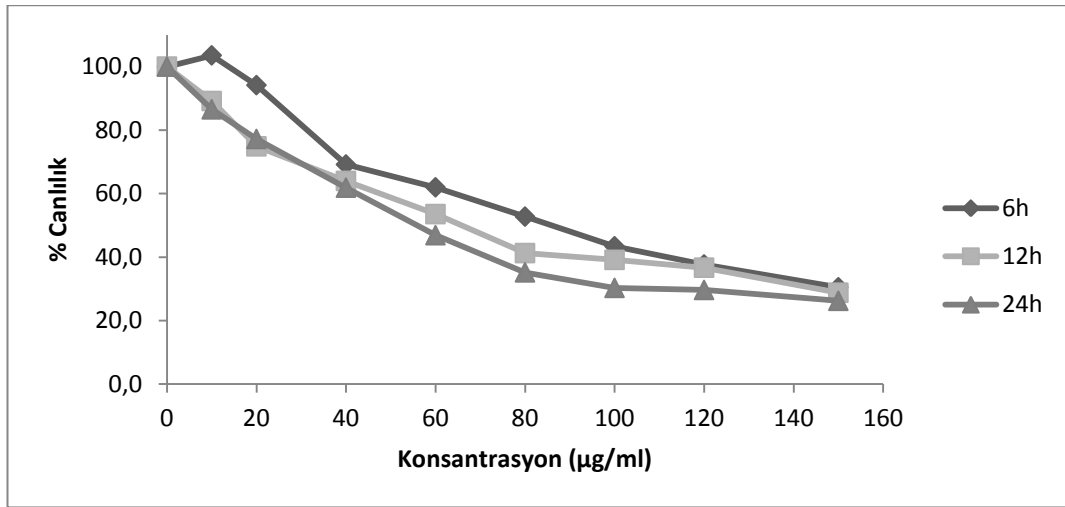
Canlılık çalışmaları sonucunda yeşil ve siyah çay polifenollerinden  $75 \mu\text{g/mL}$  uygulanması planlanan ekstrelerin içerikleri Tablo 6.5 kullanılarak hesaplandı. Hesaplama sonuçlarına göre  $75 \mu\text{g}$  yeşil çayda  $0.15 \mu\text{g}$  kafein,  $0.02 \mu\text{g}$  gallikasit,  $0.09 \mu\text{g}$  epikateşin,  $0.49 \mu\text{g}$  epigallokateşingallat,  $0.13 \mu\text{g}$  epikateşin galat ve  $0.49 \mu\text{g}$  epigallokateşin bulundu. Siyah çay polifenollerini için hesaplama sonuçlarına göre  $0.09 \mu\text{g}$  kafein,  $0.01 \mu\text{g}$  gallik asit,  $0.004 \mu\text{g}$  epikateşin,  $0.01 \mu\text{g}$  epigallokateşingallat,  $0.006 \mu\text{g}$  epikateşingallat,  $0.01 \mu\text{g}$  epigallokateşin belirlendi.

### 6.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

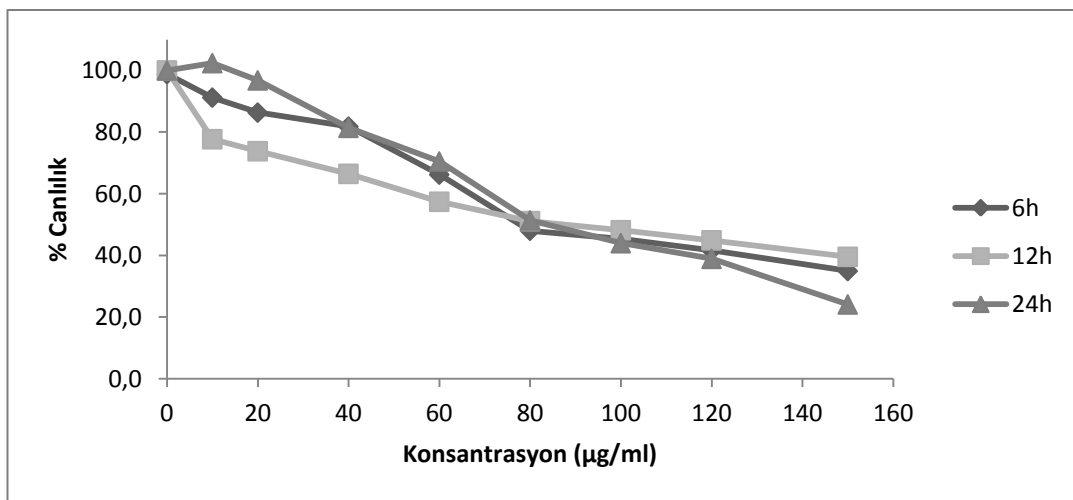
#### 6.3.1. Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması

Tez çalışmasında kullanılan meme kanseri hücre hatları 75cm'lik kültür flasklarına ekilerek %70-80 oranında kabı doldurmaları beklendikten sonra pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Deneyler için gerekli sayılara ulaşıldıktan sonra hücreler sayılarak uygun besi yerlerinde uygun flasklara ekildi. Hücrelerin bu yoğunluğa ulaşmaları için ortalama 3-4 gün beklendi.

#### 6.3.2. Polifenollerin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi

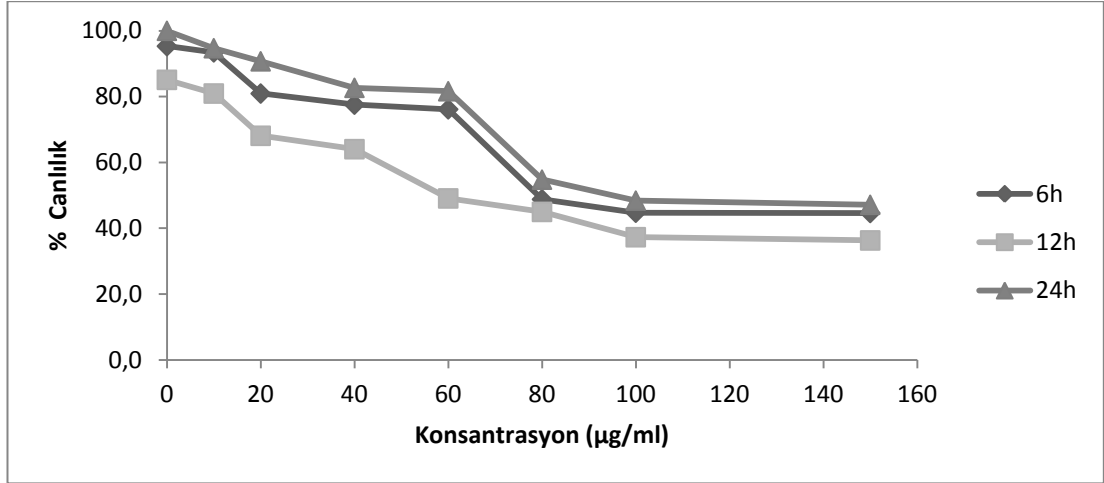


Şekil 6. 4. MCF-7 Hücrelerinde yeşil çayın canlılığa etkileri. Yeşil çay polifenollerinin MCF-7 hücrelerine canlılığına olan etkilerini doz ve zaman bağımlı etkilerinin çizgi grafikleri.

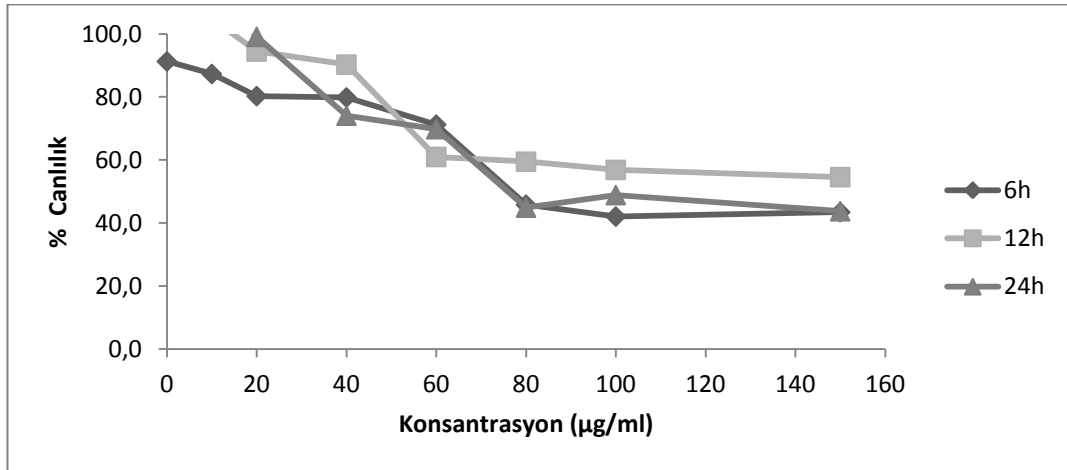


Şekil 6. 5. MCF-7 hücrelerinde siyah çayın canlılığa etkileri. Siyah çay polifenollerinin MCF-7 hücre canlılığı üzerine doz ve zaman bağımlı etkilerini gösteren çizgi grafiği.

Uygulanan polifenollerin MCF-7 hücrelerinde canlılığı zamana ve konsantrasyona bağlı olarak azalttığı tespit edildi. Ekilen hücrelerin %50'sinin öldüğü konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) yaklaşık olarak 60-80 µg/ml arasında olduğu gözlemlendi. Siyah çayda ekilen hücrelerin %50'sinin öldüğü doz yaklaşık olarak 100 µg/ml civarında bulundu. MCF-7 üzerinde yeşil çayın canlılık üzerine etkileri zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde 6, 12, ve 24üncü saatte gerçekleştirilen ölçümlerde farklılıklar görülmemiştir. Aynı durum siyah çay içinde geçerlidir.



**Şekil 6. 6.**MDA MB-231 hücrelerinde yeşil çayın canlılığa etkileri.Yeşil çay polifenollerinin MDA MB-231 hücrelerine canlılığı üzerine doz ve zaman bağımlı etkilerini gösteren çizgi grafiği.



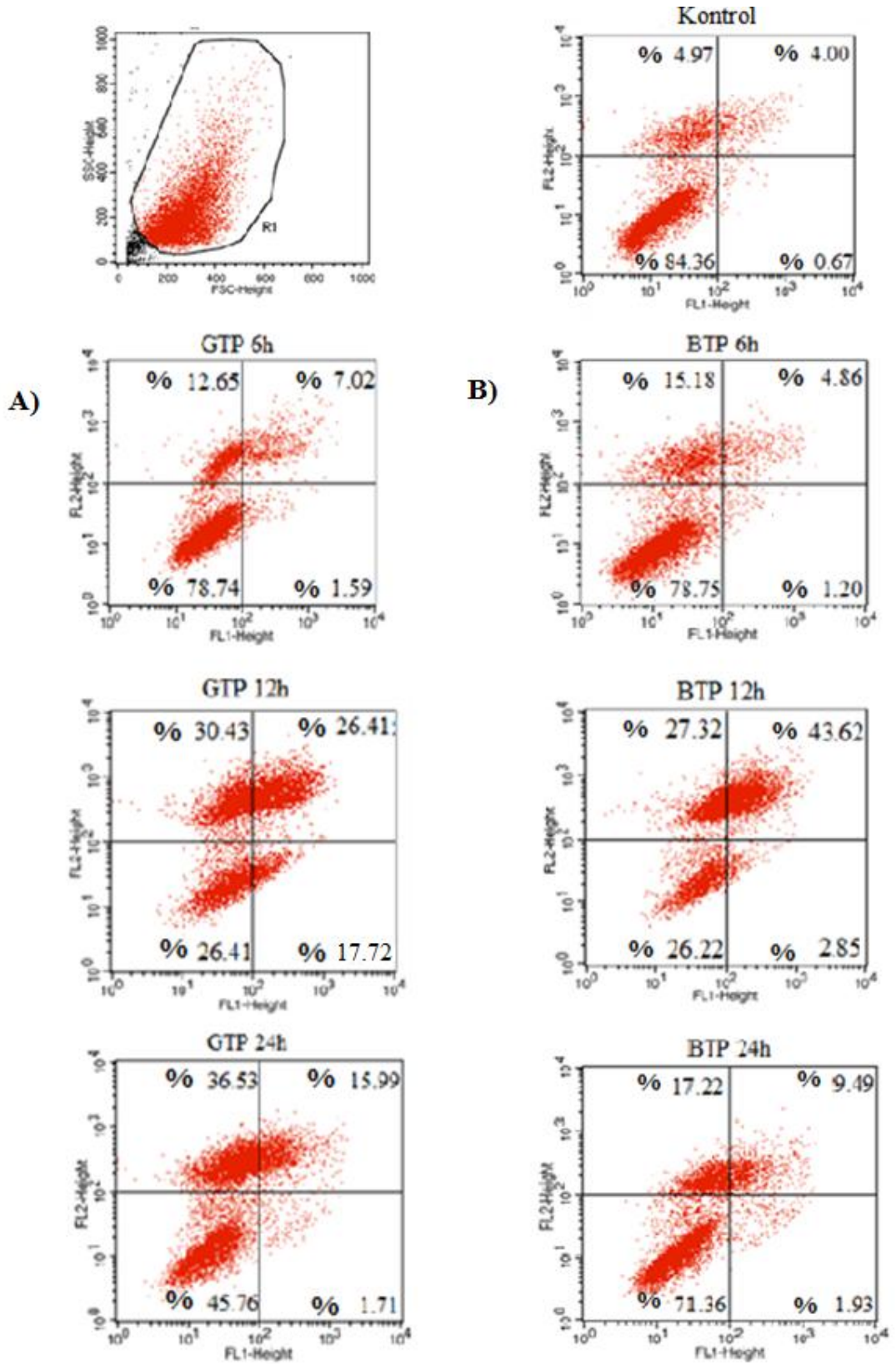
**Şekil 6. 7.** MDA MB-231 hücrelerinde siyah çayın canlılığa etkileri. Siyah çay polifenollerinin MDA MB-231 hücrelerine canlılığı üzerine doz ve zaman bağımlı etkilerini gösteren çizgi grafiği.

MDA MB-231 hücrelerine uygulanan polifenollerin doz ve zaman bağımlı olarak canlılığı azalttığı tespit edildi. Bu hücre hattının polifenol etkisine daha dirençli olduğu gözlemlendi. Her iki polifenol için IC<sub>50</sub> değerinin yaklaşık olarak 80-100 µg/ml olduğu görüldü.

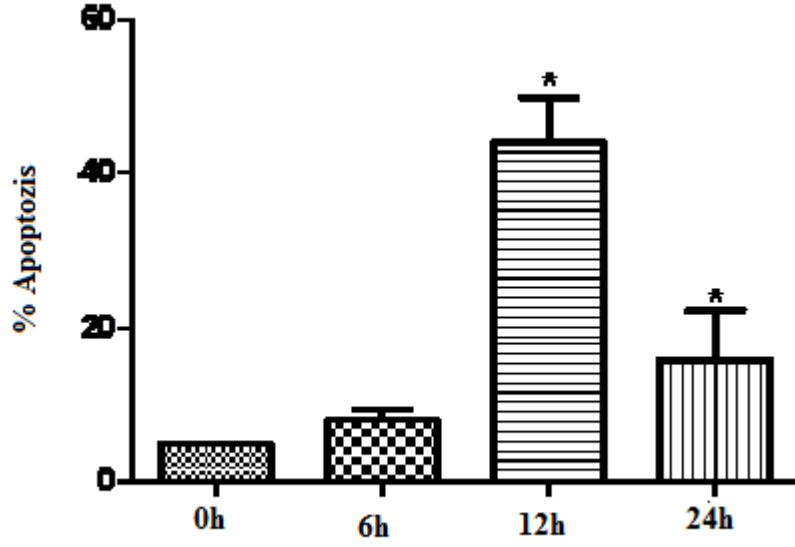
Hücre kültür ortamında 96 kuyulu plaklar kullanılarak gerçekleştirilen canlılık testinde belirlenen aralıkta, hücrelerin konsantrasyona bağılı olarak canlılığını yitirdiği gözlemlendi. Bu etkinin zamana bağılı olarak benzer şekilde azaldığı tespit edildi. Her iki polifenol uygulamasında da hücrelerde doza bağımlı olarak canlılığın azaldığı gözlemlendi. Zaman bağımlı olarak grafikler incelendiğinde 6, 12 ve 24 saatlik uygulamalar arasında herhangi bir fark gözlenmediği tespit edildi. Siyah ve yeşil çay polifenollerinin uygulandığı plaklarda, bu deneyin başında ekilen hücrelerin yarısının öldüğü doz hücre hatlarına ve uygulanan polifenolik maddelerin içeriğine bağılı olarak değiştiği görüldü. Ancak deneylerin bu aşamasından her iki hücre hattında polifenollerden 75µg/ml uygulanarak zamana bağılı etkilerin belirlenmesine karar verildi.

### 6.3.3. Akış Sitometrisinde Annexin-V/PI ile Apoptoz Analizi

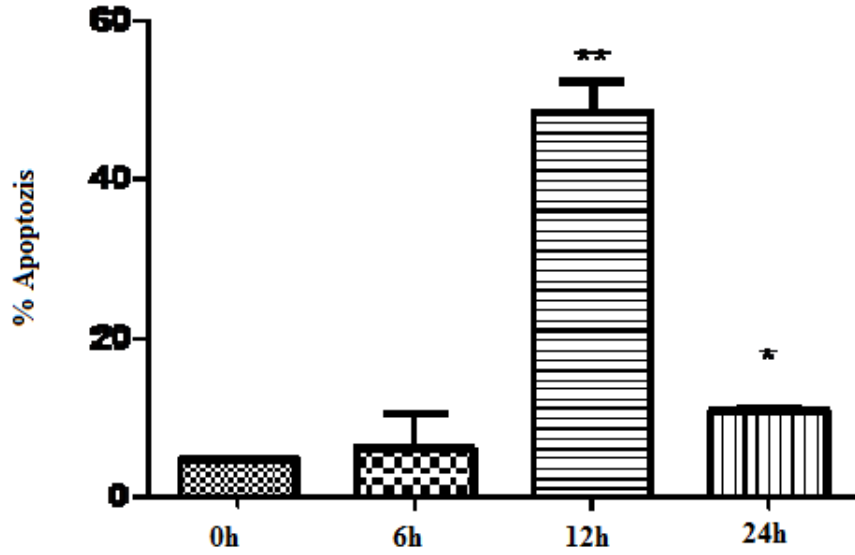
Canlılık testleri sonunda belirlenen, hücrelerin yarısını öldüren dozun hangi yolları kullanarak bunu gerçekleştirdiğinin araştırması amacıyla hücreler 6 plaklı kuyulara ekilerek Annexin-V/PI boyaması gerçekleştirildi. Uygulamanın değişik saatlerinde hücrelerin zamana bağlı ölümleri apoptotik açıdan değerlendirildi. Plaklara kontrol grubu, yeşil çay uygulaması yapılan grup ve siyah çay uygulaması yapılan grup olmak üzere, polifenol etkisinin zamana bağlı olarak araştırılması amacıyla, üç tekrarlı olarak üç grup hücre ekildi. Polifenoller uygulandıktan sonra 6, 12 ve 24 saatlik aralıklarla bu hücrelerde apoptoz analizi gerçekleştirildi. Tüm gruplarda en düşük apoptoz miktarı kontrol grubunda tespit edildi, bu değer %4.67 olarak bulundu. MCF-7 hücrelerine 75µg/ml yeşil çay polifenolü uygulandıktan 6 saat sonra yapılan ölçümlerde, % apoptoz miktarı ortalama 7.99 olarak bulundu. 6 saatlik % apoptoz miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farka rastlanmadı ( $p>0.05$ ). Ancak % apoptoz miktarı 12 saatlik ve 24 saatlik ölçümlerde sırasıyla ortalama 43.98 ve 15.77 olarak bulundu. Her iki değerde 6 saatlik uygulama ile karşılaştırıldığında anlamlı oranda yüksek bulundu ( $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ). Yeşil çay polifenolü uygulanan hücrelerin 12 ve 24 saatteki % apoptoz miktarları karşılaştırıldığında 12.saatte ölçülen değer 24 saatten anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ( $p<0.001$ ). Bu değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulundu. MCF-7 hücrelerine 75 µg/ml siyah çay polifenolü uygulandıktan sonra 6, 12 ve 24 saatlik apoptoz ölçümleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek %apoptoz miktarı 12 saat sonunda yapılan ölçümlerde gözlemlendi (48.63). Kontrol grubu sonuçları 6 saat'lik ölçümlerle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilemedi ( $p>0.05$ ). 12 saat sonunda yapılan ölçümler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, siyah çayın 12. Saatte %apoptozu kontrol grubuna göre anlamlı oranda arttırdığı tespit edildi ( $p<0.001$ ). Kontrol grubu apoptotik hücre miktarı 24 saat'lik değerlerle karşılaştırıldığında siyah çayın kontrol grubuna göre apoptozu anlamlı derecede arttırdığı tespit edildi. Siyah çay uygulanan MCF-7 hücrelerinde 6 ve 12.saat sonuçları karşılaştırıldığında 12.saatte apoptozun anlamlı derecede arttığı görüldü ( $p<0.001$ ). 6. ve 24.saat apoptoz değerleri arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu hücre hattında 12 ve 24. saat değerleri karşılaştırıldığında, 24.saatte apoptoz değerlerinin anlamlı oranda düştüğü tespit edildi ( $p<0.001$ ).



**Şekil 6. 8.** MCF-7 hücrelerinde Annexin-V/PI analizi. A) yeşil çay polifenollerinin zaman karşı etkileri, B) siyah çay polifenollerinin zamana karşı etkileri.



**Şekil 6. 9.** MCF-7 hücrelerinde yeşil çay polifenollerinin apoptotik etkileri. MCF-7 hücrelerinde yeşil çay polifenollerinin apoptotik etkilerinin zamana bağlı olarak değişimi (bar grafiği).

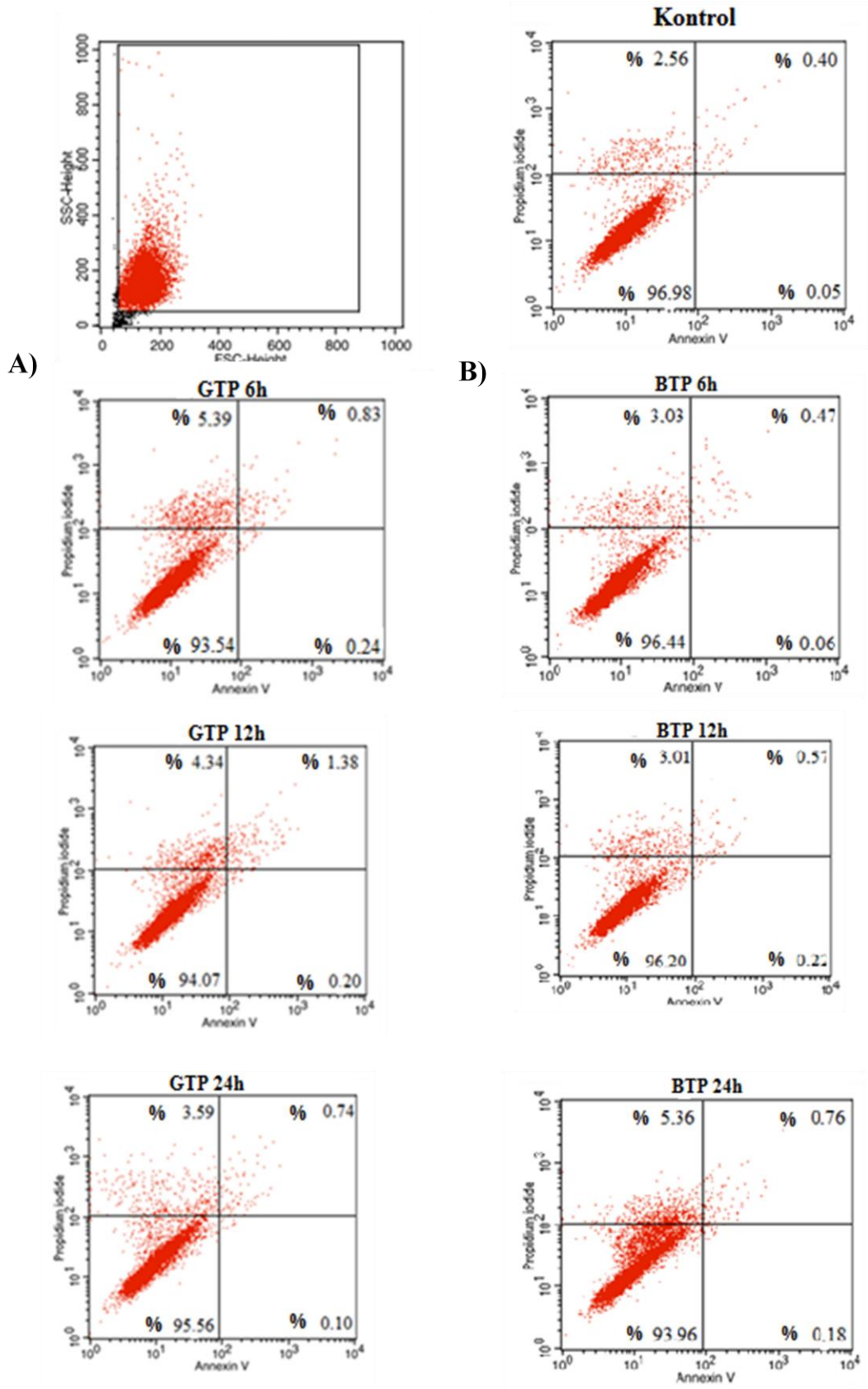


**Şekil 6. 10.** MCF-7 hücrelerinde siyah çay polifenollerinin apoptotik etkileri. MCF-7 hücrelerinde yeşil çay polifenollerinin apoptotik etkilerinin zamana bağlı olarak değişimi (bar grafiği).

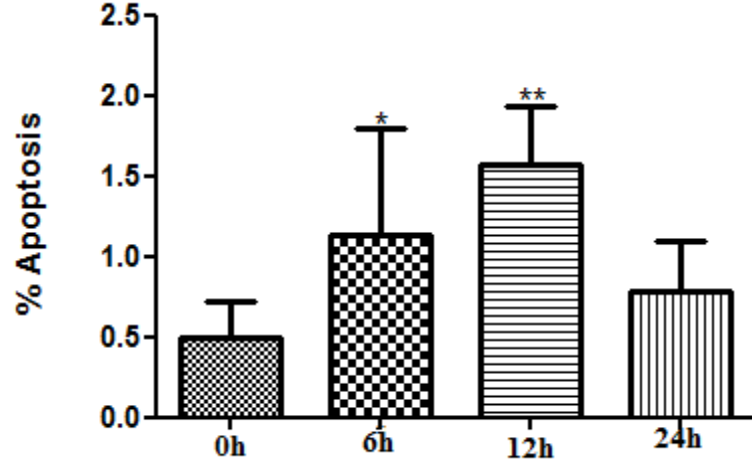
MDA MB -231 hücrelerinde apoptoz miktarı kontrol hücrelerinde % 0.49 olarak belirlendi kontrol grubunda canlılık % 96.98 olarak belirlendi.

Yeşil çay polifenollerinin 75µg/ml olarak uygulandığı grupta apoptoz miktarı 6, 12 ve 24. saatlerde sırasıyla, % 1.14, 1.58, 0.78 olarak belirlendi. Apoptoz miktarı beklenen kadar yüksek bulunmadığı görüldü. Kontrol gurubu ile karşılaştırılan gruplar istatistiksel olarak incelendiğinde; 6 saatlik uygulama sonucunda apoptozisin anlamlı derecede arttığı görülmüştür ( $p<0.05$ ). 12 saatlik uygulamada apoptoz miktarı kontrole göre anlamlı derecede artmıştır ( $p<0.01$ ). 24 saatlik yeşil çay polifenolü uygulaması sonunda % apoptoz miktarında anlamlı değişiklik bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Yeşil çay polifenol ekstraktı uygulaması sonunda % apoptoz miktarında 6 saat ve 12 saatlik uygulama arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ).

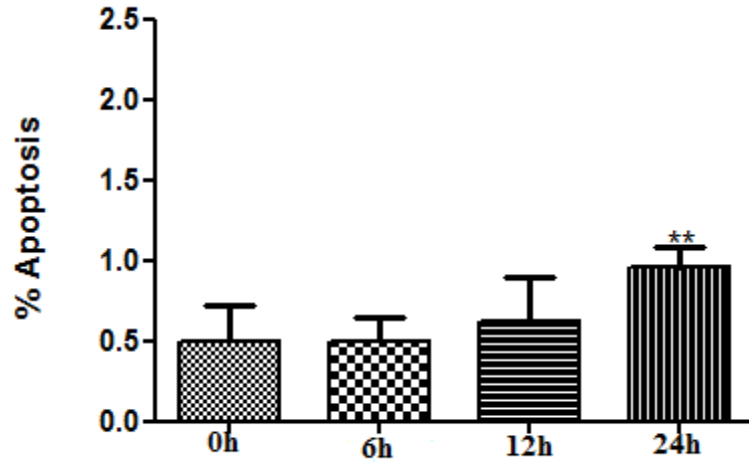
Siyah çay polifenollerinin 75µg/ml olarak uygulandığı siyah çay polifenol grubunda apoptoz miktarı 6, 12 ve 24. saatlerde sırasıyla, % 0.50, 0.63, 0.93 olarak belirlendi. Apoptoz miktarı beklenen kadar yüksek bulunmadığı görüldü. Kontrol gurubu ile karşılaştırılan gruplarda istatistiksel olarak incelendiğinde; 6 saatlik uygulama sonucunda % apoptozis miktarında anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür ( $p>0.05$ ). 12 saatlik uygulamada apoptoz miktarında sayısal olarak bir artış gözlenirse de kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenemedi ( $p>0.05$ ). 24 saatlik uygulamadaki % apoptozis miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir ( $p<0.0001$ ). 6 saatlik apoptozis miktarı ile 12 saatlik apoptozis miktarları arasında anlamlı bir fark yoktur ( $p>0.05$ ). 6 saatlik apoptoz miktarı 24 saatlik apoptoz miktarı ile karşılaştırıldığında % apoptoz miktarında anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). 12 saatlik apoptoz miktarı ile 24 saatlik apoptoz miktarları karşılaştırıldığında anlamlı artış tespit edilmiştir ( $p<0.001$ ).



**Şekil 6. 11.** MDA MB-231 hücrelerinde Annexin-V/PI analizi. A) yeşil çay polifenollerinin zaman karşı etkileri, B) siyah çay polifenollerinin zamana karşı etkileri.



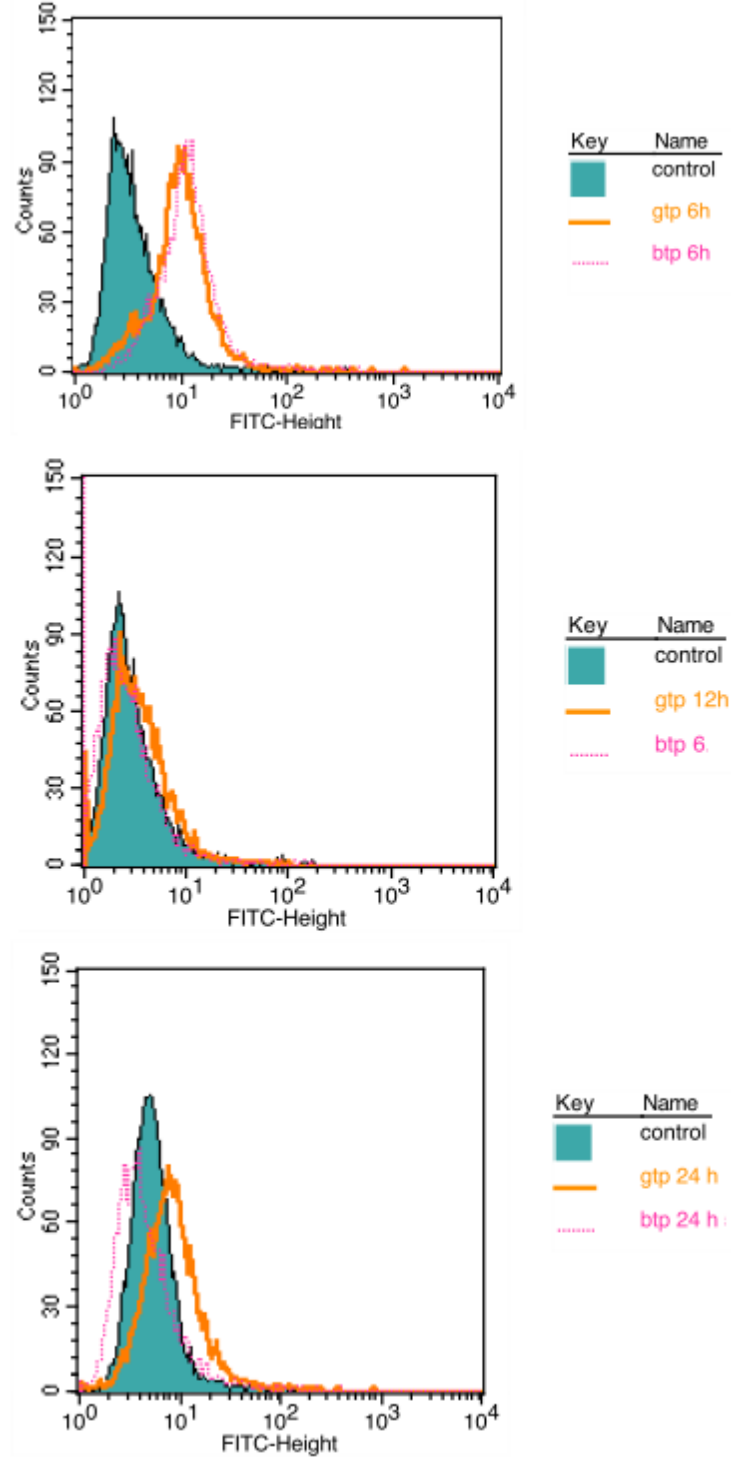
**Şekil 6. 12.** MDA MB-231 hücrelerinde yeşil çay apoptoz sonuçları. Yeşil çay polifenollerinin apoptotik etkilerinin zamana bağlı olarak değişimi (bar grafiği).



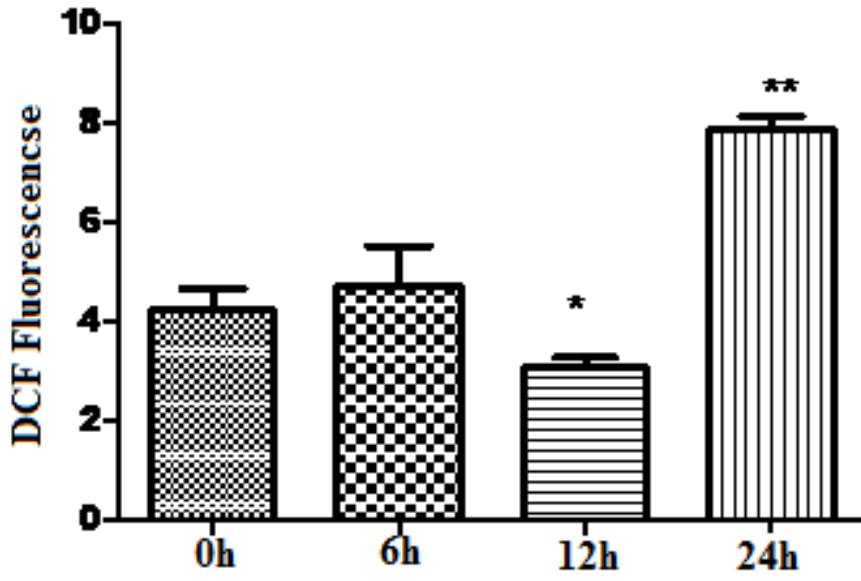
**Şekil 6. 13.** MDA MB-231 hücrelerinde siyah çay apoptoz sonuçları. Hürelere uygulanan siyah çay polifenollerinin apoptotik etkilerinin zamana bağlı olarak değişimi (bar grafiği).

#### **6.3.4. Polifenollerin ROS olan etkisinin incelenmesi**

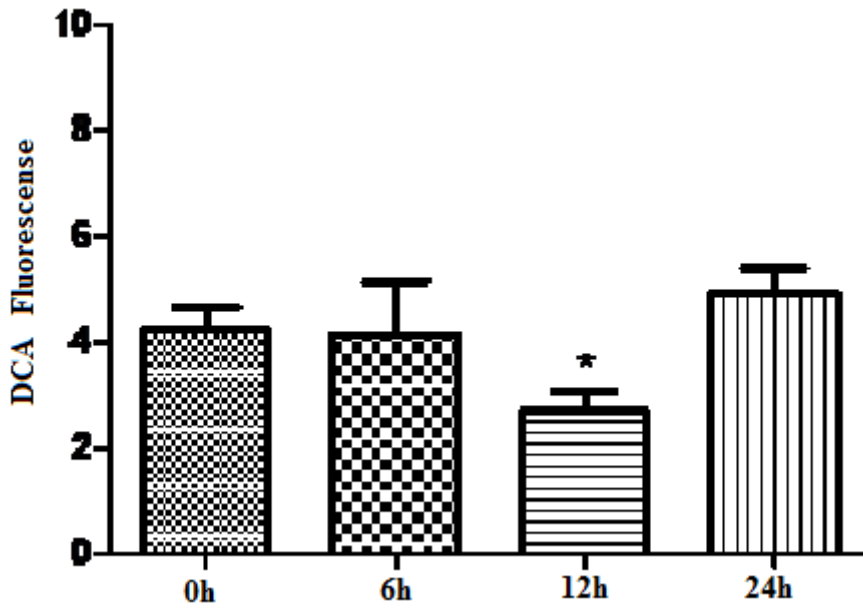
MCF-7 hücrelerine yeşil ve siyah çay polifenollerinin uygulamasının, 6, 12 ve 24 saatlik uygulamasının ardından DCF floresans miktarları karşılaştırılarak oluşan ROS miktarları açısından değerlendirildi. Kontrol grubunda DCF floresans miktarı, 4.21 olarak belirlendi. Kontrol grubu ile diğer gruplarda tespit edilen değerler istatistiksel açıdan karşılaştırıldı. Yeşil çay uygulanan grupta 6 saat sonunda % DCF floresans 4.71 olarak belirlendi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ). 12 saat sonunda bu değer 3.07 olarak tespit edildi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derece düşük olduğu gözlemlendi ( $p<0.01$ ). 24 saatte ROS miktarının anlamlı oranda arttığı gözlemlendi  $p<0.001$  (7.85). MCF-7 hücrelerine siyah çay polifenollerinin uygulandığı BTP grubu ROS miktarlarının zamanla değişimi incelendi. Üç farklı gün yapılan ölçümler sonunda, 6 saatlik uygulama sonunda DCF floresans miktarı 4.16 olarak tespit edildi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her hangi bir istatistik farka rastlanmadı ( $p>0.05$ ). 12 saat sonunda bu değer 2.70 olarak belirlendi, kontrol grubuna göre anlamlı oranda düşüş tespit edildi ( $p<0.001$ ). 24 saat sonunda % DCF floresans miktarı 4.93 olarak bulundu, ancak kontrol grubu ile arasında bir fark tespit edilemedi ( $p>0.05$ ). 6 saat ve 12 saat değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir düşüş görüldü ( $p<0.001$ ). 6 ve 24 saat ROS miktarları arasında istatistiksel açıdan bir farka rastlanmadı ( $p>0.05$ ). 12 ve 24 saat değerleri birbirleri ile karşılaştırıldığında 24 saat sonunda ROS miktarının anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir ( $p<0.001$ ).



**Şekil 6. 14.** MCF-7 hücrelerinde ROS analizi. MCF-7 hücrelerine yeşil çay ve siyah çay polifenollerinin uygulaması sonrasında, ROS miktarlarının kontrol hücreleri ile karşılaştırılması.



**Şekil 6. 15.** MCF-7 hücrelerinde yeşil çay polifenollerinin ROS'a olan etkisi. MCF-7 hücrelerine yeşil çay polifenollerini uygulaması sonrasında, ROS miktarlarının kontrol hücreleri ile karşılaştırılması (bar grafiği).



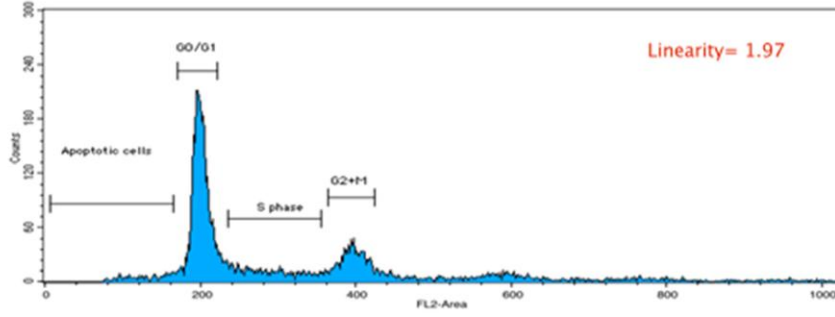
**Şekil 6. 16.** MCF-7 hücrelerinde siyah çay polifenollerinin ROS'a etkisi. MCF-7 hücrelerine siyah çay polifenollerini uygulaması sonrasında, ROS miktarlarının kontrol hücreleri ile karşılaştırılması (bar grafiği).

### **6.3.5.Polifenollerin hücre döngüsüne etkilerinin incelenmesi**

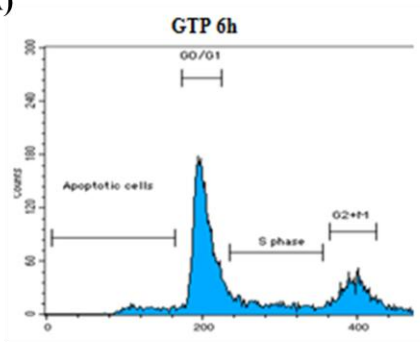
MCF-7 ve MDA MB-231 hücrelerine polifenoller eklendikten sonra, bu hücre hatlarında hücre döngüsündeki hücre miktarları üzerine olan etkiler zamana karşı incelenmiştir. MCF-7 hücrelerinde yeşil çay polifenollerini eklendikten 6 saat sonra hücre döngüsünün fazlarında kontrol grubuna göre her hangi bir değişiklik görülmemiştir. MCF-7 hücrelerinde yeşil çay polifenollerinin hücre döngüsünün G0/G1 fazının zamana bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. G0/G1 fazındaki hücreler 6 saat sonra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ancak 12 ve 24 saat sonundaki ölçümler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Hücre döngüsünün S fazında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. G2+M fazı zamana karşı incelendiğinde kontrol grubuna karşı anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Apoptotik hücreler açısından karşılaştırılan gruplarda sadece 12. saatte bir artış gözlenmiştir.

MCF-7 hücrelerinde siyah çay polifenollerinin hücre döngüsüne olan etkisi kontrol grubu ile zamana bağımlı olarak incelenmiştir. Siyah çay polifenollerinin uygulanmasından sonraki 6. saat ölçümlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Kontrol ve 12. saat değerleri karşılaştırıldığında ise G0/G1 fazında anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. S fazındaki hücre miktarı kontrole göre anlamlı şekilde artmıştır. G2+M fazındaki hücreler kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır. Apoptotik hücre sayısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derece artmıştır. Siyah çay polifenollerinin MCF-7 hücrelerinde 24 saatte G0/G1 fazındaki hücreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. S fazındaki hücreler kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. G2+M ve apoptotik hücre miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

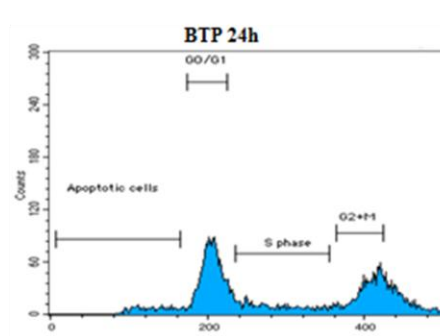
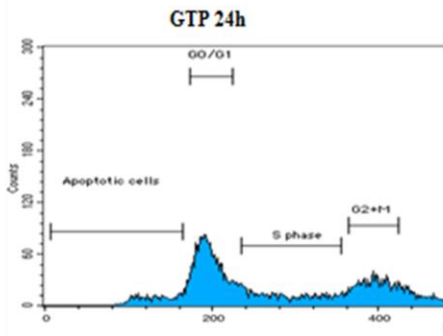
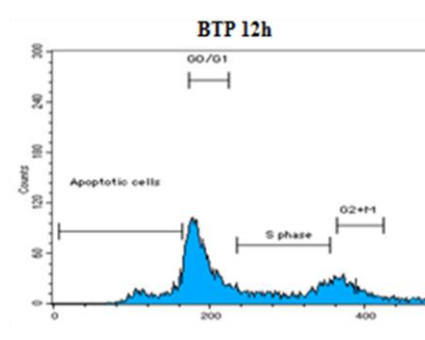
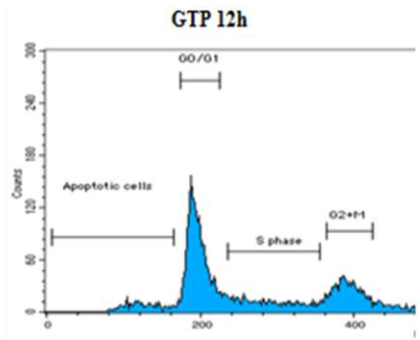
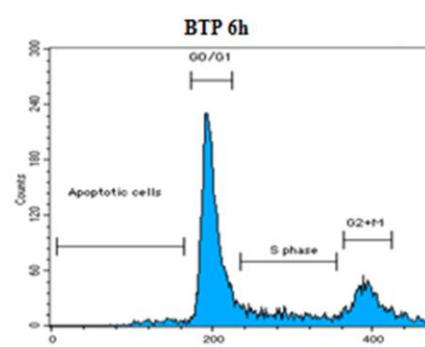
## MCF-7 Kontrol



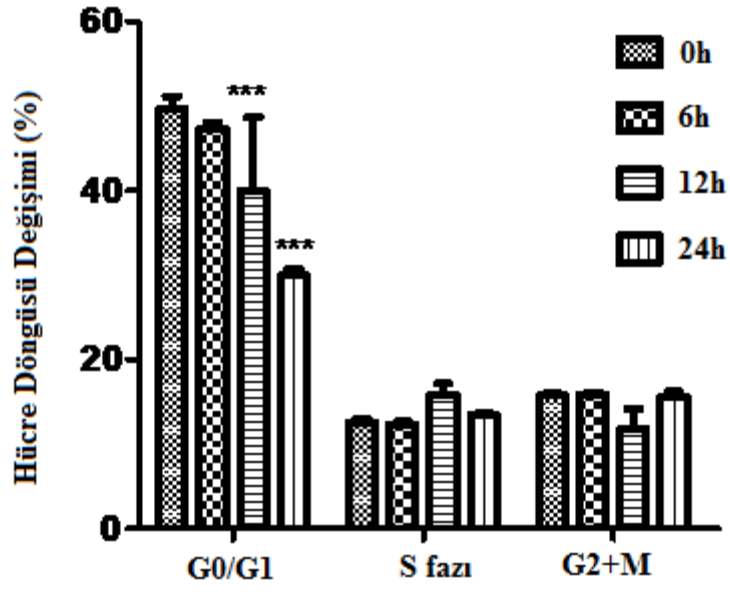
A)



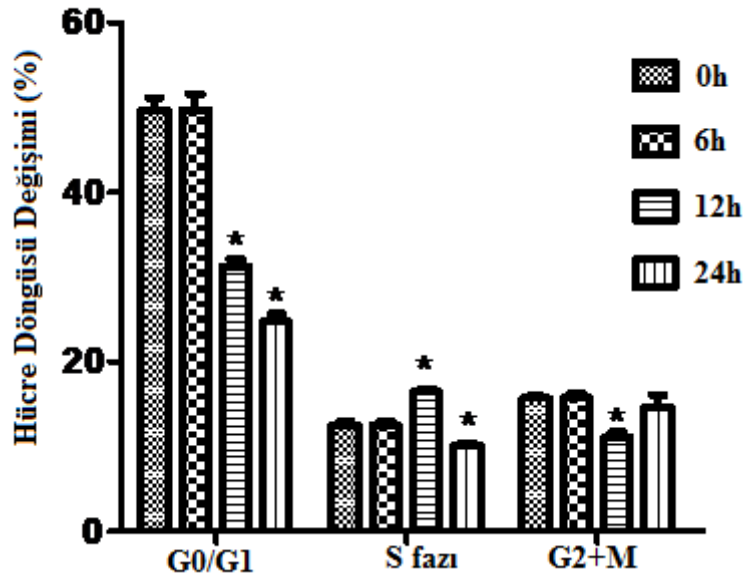
B)



**Şekil 6. 17.** MCF-7 hücre döngüsü analizi. A) MCF-7 hücrelerine yeşil çay polifenolleri eklendikten sonra farklı zamanlarda gerçekleştirilen analizler. B) MCF-7 hücrelerine siyah çay polifenolleri uygulandıktan sonra farklı zamanlarda gerçekleştirilen analizler.



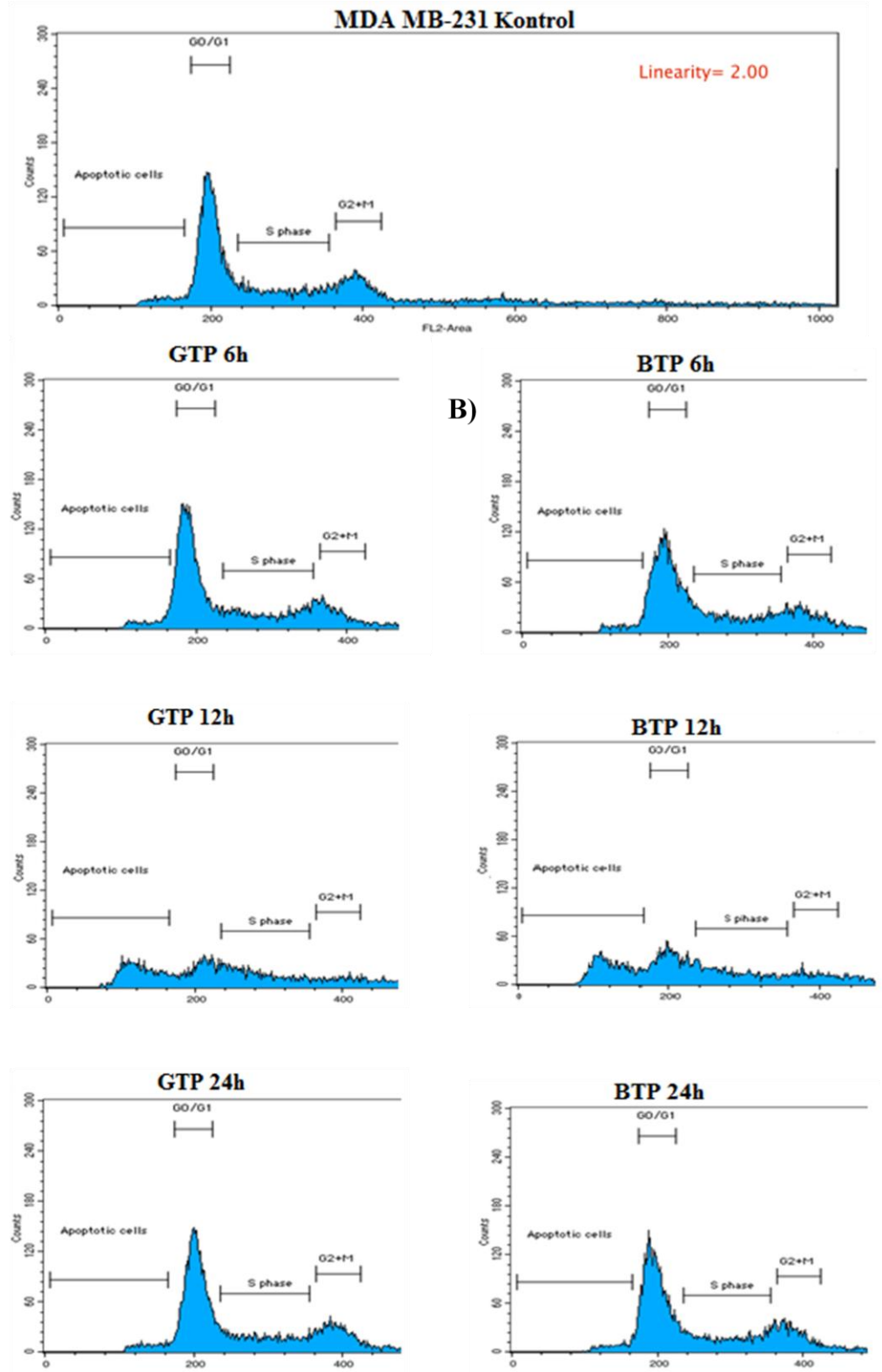
Şekil 6. 18. MCF-7 hücre döngüsüne yeşil çay etkileri. MCF-7 hücrelerine yeşil çay polifenollerini uygulamasının zaman bağımlı olarak hücre döngüsüne olan etkisi.



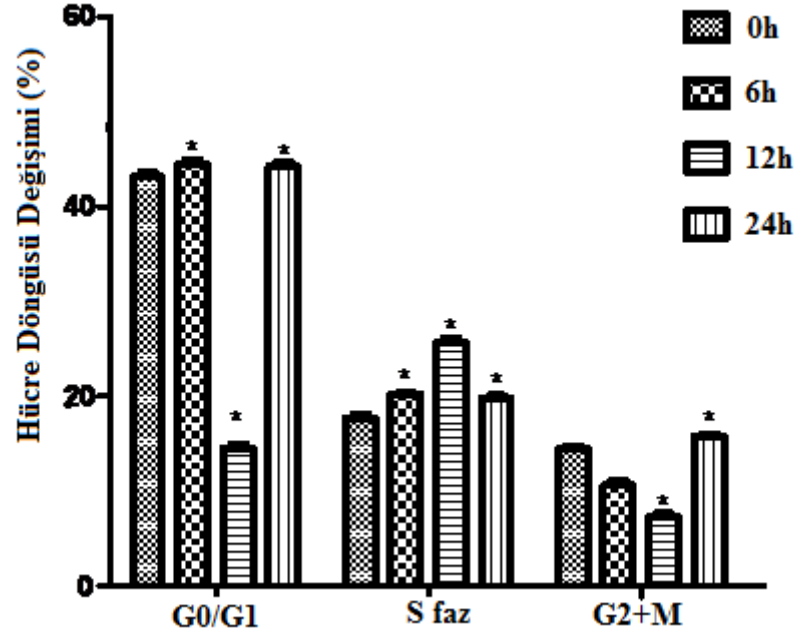
Şekil 6. 19. MCF-7 hücre döngüsüne siyah çay etkileri. MCF-7 hücrelerine siyah çay polifenollerini uygulamasının zaman bağımlı olarak hücre döngüsüne olan etkisi.

MDA MB-231 hücrelerinde polifenollerin hücre döngüsüne olan etkileri zaman bağımlı olarak araştırılmıştır. Yeşil çay polifenollerini uygulanan hücrelerde G0/G1 fazında 6. saat değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış tespit edilmiştir. S fazında kontrol grubuna göre anlamlı artış tespit edilmiştir. G2+M fazında ise kontrole göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Apoptotik hücre miktarı anlamlı derecede artmıştır. Yeşil çay polifenollerini uygulanan hücrelerin 12. Saat değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise G0/G1 fazında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. S fazında anlamlı bir artış tespit edilmiş, G2+M fazındaki hücre miktarı anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. 12. Saat apoptotik hücre miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış tespit edilmiştir. 24 saatlik değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında G0/G1 fazında anlamlı bir artış tespit edilmiştir. S fazında anlamlı bir artış, G2+M fazında artış gözlenmiştir. Kontrol grubu ve yeşil çay polifenollerini uygulanan grup apoptotik hücre miktarı açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

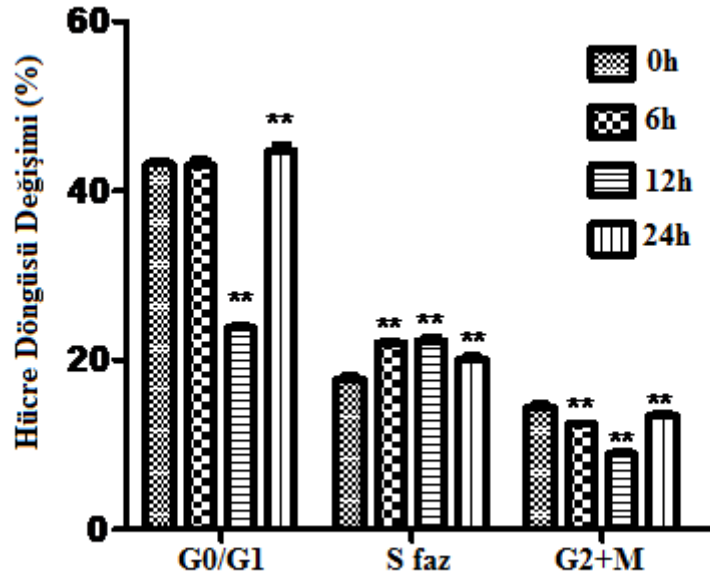
MDA MB-231 hücrelerine siyah çay uygulandıktan sonra hücre döngüsüne olan etkileri zamana karşı incelendiğinde 6 saat G0/G1 değerleri kontrol grubu ile karşılaştırılmış anlamlı bir fark gözlenmemiştir. S fazındaki hücre miktarları kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken, G2+M fazındaki hücre miktarı anlamlı derecede azalmıştır. Apoptotik hücre miktarları karşılaştırılan 6.saat ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Kontrol grubu ile 12.saat değerleri karşılaştırıldığında hücre döngüsü G0/G1 fazındaki hücre sayısı anlamlı derecede azalmış, S fazındaki hücre miktarı ise anlamlı derecede artmıştır. Aynı zaman da yapılan ölçümlerde G2+M fazındaki hücre miktarı kontrole göre anlamlı derecede düşerken, apoptotik hücre miktarı anlamlı derecede artmıştır. MDA MB-231 hücrelerine siyah çay uygulaması gerçekleştirildikten 24 saat sonra yapılan ölçümlerde G0/G1 fazındaki ve S fazındaki hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. G2+M fazındaki hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken, apoptotik hücrelerin miktarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark tespit edilememiştir.



**Şekil 6. 20.** MDA MB-231 hücre döngüsü analizi. A) MDA MB-231 hücrelerine yeşil çay polifenollerini eklendikten sonra farklı zamanlarda gerçekleştirilen analizler. B) MDA MB-231 hücrelerine siyah çay polifenollerini uygulandıktan sonra farklı zamanlarda gerçekleştirilen analizler.



**Şekil 6. 21.** MDA MB-231 hücre döngüsüne yeşil çay etkileri. MDA MB-231 hücrelerine yeşil çay polifenollerini uygulamasının zaman bağımlı olarak hücre döngüsüne olan etkisi.

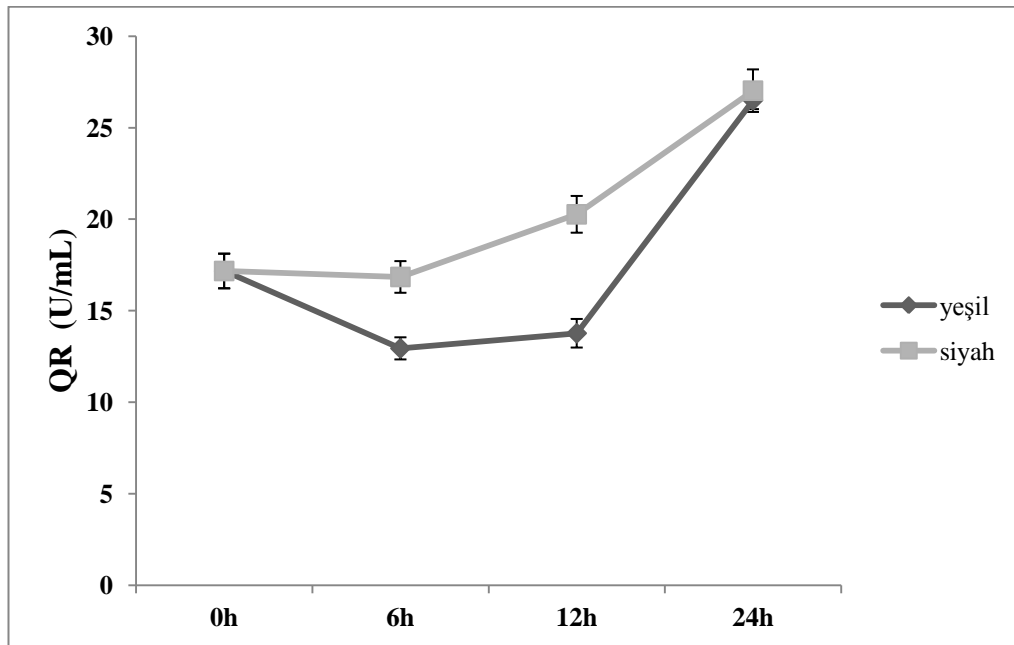


**Şekil 6. 22.** MDA MB-231 hücre döngüsüne siyah çay etkileri. MDA MB-231 hücrelerine siyah çay polifenollerini uygulamasının zaman bağımlı olarak hücre döngüsüne olan etkisi.

### 6.3.7. Polifenollerin kinon redüktaz üzerine etkilerinin incelenmesi

Yeşil çay polifenolleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde kinon redüktaz aktivitesinin 24 saatteki değişimini incelediğimiz bu kısımda, 6'ncı saat kinon redüktaz aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Aynı grubun 12'nci saat verileride kontrol grubuna göre anlamlı oranda azalmıştır ( $p < 0.001$ ). 24'üncü saat kinon redüktaz aktiviteleri kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Bu grupta 6 ve 12'nci saatlerde tespit edilen kinon redüktaz aktiviteleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ).

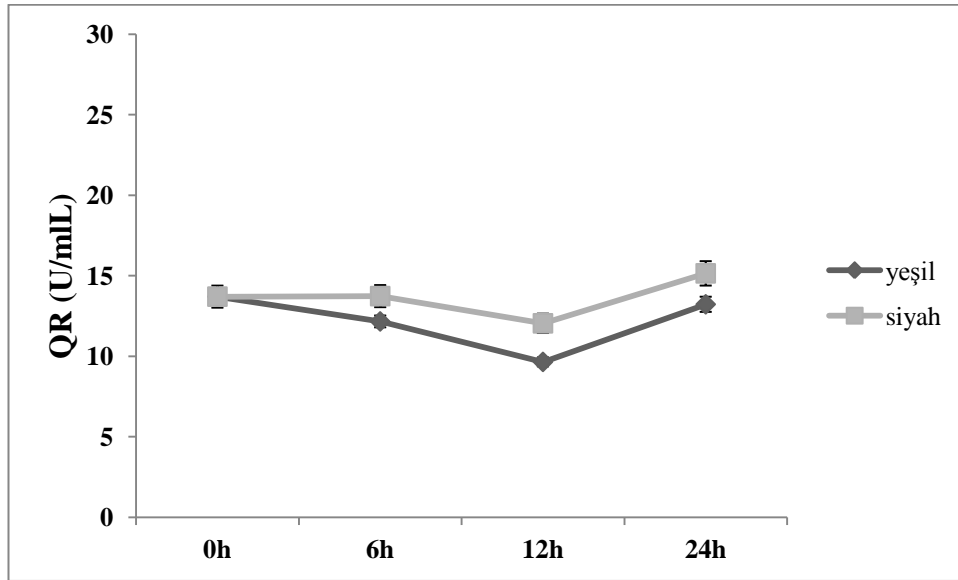
MCF-7 hücrelerine siyah çay uygulaması yapıldığında, 6'ncı saatte kinon redüktaz aktivitesinde azalma görülmüştür ancak bu değer kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $p > 0.05$ ). Aynı grubun 12'nci saat kinon redüktaz aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Bu grupta en yüksek kinon redüktaz aktivitesi 24'üncü saatte tespit edilmiştir ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).



Şekil 6. 23. MCF-7 hücrelerinde QR aktivitesi. MCF-7 hücrelerinde yeşil ve siyah çay polifenollerinin QR aktivitesi üzerine etkisi.

Yeşil çay polifenolleri uygulanan MDA MB-231 hücrelerinde 6'ncı saat sonunda ölçülen kinon redüktaz aktivitesi kontrol grubundaki aktiviteye göre anlamlı derece düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Aynı grubun 12'nci saatindeki değer kontrol grubuna göre anlamlı oranda düşüktür ( $p<0.001$ ), bu gruptaki en düşük değer bu zaman aralığında tespit edilmiştir. Kinon redüktaz aktivitesi 24'ncü saatte artmıştır ancak bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında her hangi bir farka rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu grupta belirlenen kinon redüktaz aktivite değerlerinden 6'ncı saat değerleri ile 12'nci saat değerleri arasında anlamlı bir fark görülürken ( $p<0.001$ ), 6 ile 24'üncü saat değerleri arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ).

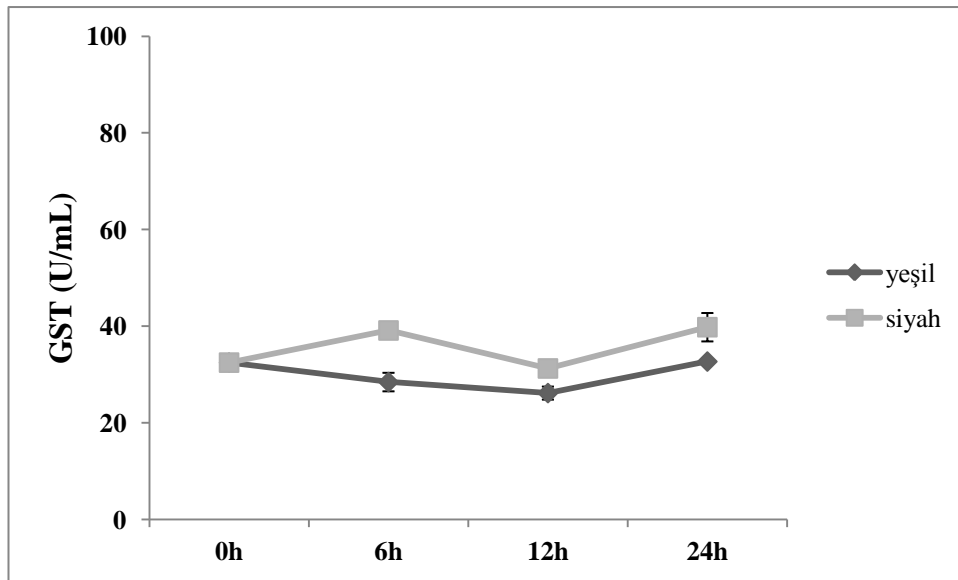
Siyah çay polifenollerinin uygulandığı MDA MB-231 hücrelerinde incelenen kinon redüktaz aktivitesinde 6'ncı saatteki değerler ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu grupta 12'nci saat verileri ile kontrol grubu karşılaştırıldığında kinon redüktaz aktivitesinin anlamlı oranda düştüğü gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). Kontrol grubu ile 24'ncü saat aktivite değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir ( $p<0.01$ ).



**Şekil 6. 24.** MDA MB-231 hücrelerinde QR aktivitesi. MDA MB-231 hücrelerinde yeşil ve siyah çay polifenollerinin QR aktivitesi üzerine etkisi.

### 6.3.6. Polifenollerin glutatyon transferaz üzerine etkilerinin incelenmesi

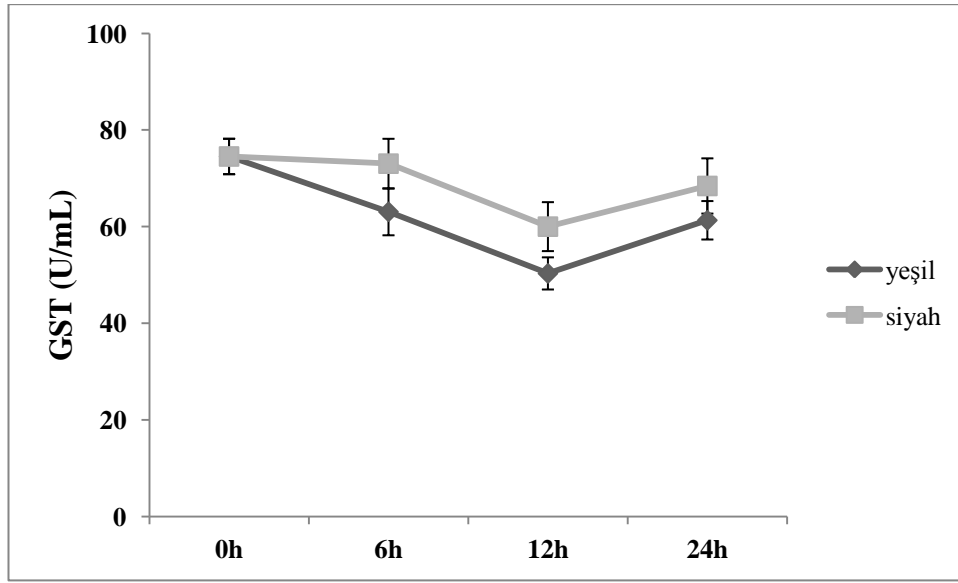
MCF-7 hücrelerine uygulanan yeşil çay polifenollerinin GST aktivitesine olan etkileri spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Glutatyon-S-transferaz aktivitesi 6. saatte kontrole göre anlamlı oranda azalmıştır ( $p<0.05$ ). Yeşil çay ekstraktı uygulanan grubun 12. saat sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p<0.001$ ). MCF-7 hücrelerindeki 24. saatte bu değer diğer iki ölçüme göre yüksektir ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ). Aynı hücre hattında yeşil çay polifenollerini uygulandıktan sonra gerçekleştirilen 6. ve 12. saat verileri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ). Siyah çay polifenollerini uygulamasında ise 6. saatte GST aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ( $p<0.001$ ). Kontrol grubu aktivitesi ile 12. saat GST aktivitesi karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ). Siyah çay uygulanan grubun 24'üncü saat GST aktivite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0.001$ ).



Şekil 6. 25. MCF-7 hücrelerinde GST aktivitesi. MCF-7 hücrelerinde yeşil ve siyah çay polifenollerinin GST aktivitesi üzerine etkisi.

MDA MB-231 hücrelerine yeşil çay polifenollerini uygulandıktan sonra gerçekleştirilen ölçümlerde, 6 ve 12'nci saatlerde GST aktivitesi düşerken, 24'üncü

saatte bu değerin arttığı görülmüştür. Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 6'ncı saat değerleri kontrole göre anlamlı derecede düşük ( $p<0.05$ ), 12'nci saat değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ( $p<0.001$ ) bulunmuştur. Kontrol grubu GST aktivitesi, 24'nc saat ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ). MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan siyah çay polifenolleri etkisiyle 6'ncı saatte belirlenen GST aktivitesi ile kontrol grubunda belirlenen GST aktivitesi arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ). Aynı grubun 12'nci saatindeki GST aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktivitede anlamlı bir d gözlenmiştir ( $p<0.001$ ). Uygulamanın 24'nc saatinde gerçekleştirilen ölçümlerde ise GST aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı oranda düşük bulunurken ( $p<0.01$ ), 12'nci saat ölçümleri ile karşılaştırıldığında anlamlı oranda GST aktivitesinin arttığı görülmektedir ( $p<0.001$ ).



**Şekil 6. 26.** MDA MB-231 hücrelerinde GST aktivitesi. MDA MB-231 hücrelerine polifenol uygulamasının GST aktivitesi üzerine etkisi.

## 7.TARTIŞMA VE SONUÇ

Yeşil çay ve siyah çay örneklerinin içeriklerinin araştırılması ile başlayan çalışmamızda, yeşil çayın siyah çaydan daha fazla kateşin içerdiği görülmüştür. Polifenol grubundanbasit yapılı kateşinlerin miktarlarının araştırıldığı çalışmamızda beklendiği üzere yeşil çayda siyah çaya göre daha yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Gardner ve ark. yaptığı çalışmada yeşil çayda en fazla miktarda EGCG bulunduğunu ve sırasıyla EGC, ECG, EC ve gallokateşin (GA) içerdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada yeşil çayda yüksek oranda kafein bulunduğunda değinilmiştir (Gardner ve ark., 2007). Siyah çayda çalışmamız sonunda tespit ettiğimiz polifenoller ise sırasıyla kafein, GA, EGC, EGCG, ECG, EC olmakla birlikte siyah çay içeriğini oluşturan teaflavin, tearubigin gibi bileşiklerin miktarları karşılaştırmaya dahil edilmemiştir. Literatürle uyumlu bir şekilde EGCG ve EGC miktarları yüksek bulunan yeşil çay ekstralarında üçüncü yüksek polifenol olan kafein siyah çayda ekstralarında en yüksek bulunan polifenol olarak belirlenmiştir. Yeşil çayın ilk hasat yapıldığı dönemler ile sıcaklığın yüksek ve güneş ışınlarının dik olarak alındığı dönemlerdeki hasatlar arasındaki farklılıklar çayın kompozisyonunu etkilemektedir. Ancak genel olarak yeşil çayın toplam polifenol içeriği için kuru ağırlığın %20-35 kadarını oluşturduğu kabul edilmekte, bu içeriğinde yaklaşık %60-80 kadarının kateşinlerden meydana geldiği belirtilmektedir. İşlenme sırasında bu polifenol içeriğinin yaklaşık olarak % 15'ini kaybeden yeşil çay içerikleri arasındaki asıl farklılıklar ise, tarımsal farklılıklar, hasat dönemlerindeki değişiklikler, yaprakların kıvrılma sürelerinde, bitkinin yetiştiği iklime, çevre şartlarına, işlenme paketlenme yöntemlerine göre değişmektedir. Siyah çay ve yeşil çay *Camelia sinensis* adı verilen bitkiden üretilmektedir. Aynı bitki kullanıldığından içeriğinde benzer kateşinleri farklı miktarlarda içerirler. Siyah çayda eser miktarlarda olsada yeşil çay kateşinlerine rastlamak mümkündür (Luczaj ve ark., 2005). Siyah çayın en önemli kateşinleri teaflavin ve tearubigin dir (Hadler ve ark.,2006). Üretim, işlenme sırasındaki farklılıklar dolayısıyla siyah çay içeriği hakkında kesin bilgiler belirtmek oldukça zordur. Ancak siyah çayda teaflavin miktarları %10-12, tearubigin miktarları ise yaklaşık %12-20 olarak açıklayan kaynaklar bulunmaktadır (Henning, 2003).

Yeşil çay polifenolleri toksik olmayan ve geniş organ çeşitliliği üzerine olan etkileri ile dünya çapında kanserden korunmada kullanılan besin maddelerinden biridir (Lee ve ark., 2010). Hücre türüne bağlı olarak EGCG farklı sinyal yollarının aktivasyonunda rol oynamaktadır. JB6 fare epidermal hücre hattında, H-ras geni transfekte edildiğinde yine benzer etkilere sebep olmaktadır, ERK protein seviyeleri EGCG etkisiyle sürekli ve hızlıca azalırken, MAPK1/2-ERK sinyal yolağında inhibe olmaktadır (Chung ve ark., 2001). Yaptığımız çalışmada MCF-7 hücreleri ve MDA MB-231 hücreleri farklı moleküler alt yapıya sahip meme kanser hatları olup, bu hücrelerde yeşil çay ekstraktlarının farklı etkileri gözlenmiştir. Her iki hücre hattında da yeşil çay polifenollerinin hücre canlılığına, doz ve zaman bağımlı etkileri karşılaştırıldığında MCF-7 hücrelerinde canlılığın azalması daha belirgindir. MCF-7 hücrelerinde IC<sub>50</sub> dozu 60-80 µg/ml aralığında iken bu değer MDAMB-231 hücreleri için 80-100 µg/ml aralığında belirlenmiştir. Rizzi ve ark. 2014 yılında prostat kanserinde ticari ismi polifenon E olan yeşil çay ekstraktı kullanarak yaptıkları çalışma sonuçlarına göre; kullandıkları iki farklı prostat hattında iki farklı IC<sub>50</sub> değeri belirlemişlerdir. Kullandıkları ilk hat olan PNT1a hücreleri prostat kanseri hücrelerinin başlangıç aşamasının özelliklerini, PC3 ise metastatik, androjen-bağımsız prostat kanseri özelliklerini taşımaktadır. PNT1a için araştırmacıların belirlediği IC<sub>50</sub> dozu 35 µg/ml iken PC3 hücreleri için bu değer 145 µg/ml'dir. Bizim çalışmamızda seçilen hücre hatları bu çalışmaya görece daha birbirlerine yakın hatlar olmakla birlikte, moleküler düzeyde MCF-7 hücreleri estrogen reseptör ekspresyonu gerçekleştirirken, MDA MB-231 hücreleri yüzeylerinde herhangi bir reseptör bulunmamaktadır. Meme kanser hücreleri üzerine siyah çay etkileri incelendiğinde, her iki hücre hattı içinde yeşil çayda kullanılan konsantrasyon aralıkları yeşil çay için belirlenen zamanlarda çalışıldı. Bu çalışma sonucunda konsantrasyon aralıklarına hücre cevabının daha geç saatlerde ortaya çıktığı görüldü. Ayrıca her iki hücre hattında yeşil çay kateşinlerindeki konsantrasyon değişimlerine daha duyarlı olduğu gözlemlendi. MCF-7 hücrelerine siyah çay uygulandığında IC<sub>50</sub> dozajı 100-120 µg/ml aralığında tespit edilirken, MDA MB-231 hücrelerinin yarısının öldüğü konsantrasyonun 80 µg/ml'nin üzerinde bir değer olduğu tespit edildi.

Canlılık testlerinde ortaya çıkan durumun anlaşılması amacıyla apoptoz deneylerinde 75 µg/ml yeşil ve siyah çay ekstraktları uygulanmasına karar verildi, bu değerde görülen apoptoz oranları canlılık testi sonucunda elde edilen verilerle

karşılaştırıldı. MCF-7 hücrelerine yeşil çay uygulandıktan sonra 6, 12 ve 24 saatlerde gerçekleştirilen apoptoz analizine göre, yeşil çay ekstraktı uygulaması ile apoptozun arttığı tespit edilmiştir. En yüksek miktarda apoptoz 12. Saat ölçümlerinde elde edildi. MCF-7 hücreleri apoptoz değerleri karşılaştırıldığında 6. Saatte apoptozda artış görülsede bu artış kontrol grubuna göre anlamlı değildi. Apoptoz sonuçları 24. saatte beklenildiği gibi 12. saate göre düşük bulunmuştur. Çalışmalarında belirttiği gibi kullanılan ekstraktın yarılanama ömrü ve hücrelerin metabolik hızlarına bağlı olarak uygulanan maddenin bu etkilerin ilerleyen saatlerde ortadan kalktığı görülmüştür (Rizzi ve ark., 2014). Siyah çay polifenollerini aynı hücre hattına uygulandığında yeşil çay ile benzer etkiler görülmüştür. Siyah çay polifenollerini uygulamasında enyüksek apoptoz 12. saatte tespit edilmiştir. Rizzi ve ark. çalışmasında 20µg/ml yeşilçaydan elde edilen polifenon E kullanıldığında 6, 12 ve 24 saatlerde kesilmiş PARP miktarı ve dolayısıyla apoptoz artarken, 48. Saat verilerinde 24. Saate göre kesilmiş PARP miktarında azalış, tam PARP miktarında ise artış gösterilmiştir. Yani uygulanan madde ve hücre tipine özgü olarak apoptozun gerçekleşme zamanı ve uygulanan maddenin etkisinin ortadan kalma süresi değişmektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik etkiler oldukça sınırlı olarak tespit edilmiştir. Her iki polifenole uygulamasında da zamana bağlı olarak kontrol grubuna göre apoptoz miktarında artış tespit edilmiştir, ancak belirlenen miktarlardaki apoptotik ölümün canlılık testlerinde elde edilen ölümü açıklamak için yetersizdir. Yeşil ve siyah çayda apoptoz neredeyse kontrol grubuna yakın bir miktarda tespit edilmiştir. Farklı birçok çalışmada EGCG'nin apoptotik ölüm yolağını farklı sinyal mekanizmaları üzerinden aktive ettiğini göstermektedir. EGCG ile apoptozun düzenlenmesinde sadece intrinsik apoptotik yolak göz önünde bulundurulmamalı, ekstrinsik yolağın etkileride incelenmelidir. İnsan monositik lösemi hücreleri olan U937 üzerine EGCG etkisinin incelendiği bir çalışmada, EGCG'nin Fas sistemine bağlanarak, Fas aracılı apoptozu indüklediği ve kanser hücrelerini bu yolağı kullanarak öldürdüğü belirlenmiştir (Hayakawa ve ark., 2001). Doğal polifenolik bileşiklerin farklı mekanizmalarla (kanonik ve non-kanonik) yollardan otofajiyi aktive ettikleri bilinmektedir. Son çalışmalarda meme kanserinde resvaratrölün non-kanonik otofajik ölümü indüklediğini gösteren yayınlara rastlanmıştır (Hasima ve ark., 2014- Sharma ve ark., 2014). Masuda ve ark., insan kolorektal hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, EGCG'nin EGFR, STAT3 ve Akt fosforilasyonunu, azatlıklarını ve bu bilginin hastalığın tedavisinde önemli

olabileceğini bildirmiştir (Masuda ve ark.,2008). Benzer bir durum EGFR ekspresyonu gerçekleştiren MDA MB-231 hücreleri içinde geçerli olabilir. İn vitro çalışmalarda çay polifenollerini tümör hücreleri üzerinde apoptozu indükleyici ve hücre döngüsünü düzenleyici etkileri gösterirken, normal hücrelerde ise karşıtsinyal yollarını aktive ettiğine değinilmiştir (Beltz ve ark. 2006). Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde yeşil çay etkisiyle hücre döngüsünde zaman bağımlı olarak G0/G1 fazı azalırken, S fazındaki hücre miktarı 12. Saatte artmıştır. G2/M fazındaki hücre miktarı 12. Saatte anlamlı bir şekilde düşerken, aynı saatteki apoptoz miktarında artmıştır. MCF-7 hücrelerine siyah çay polifenollerini uygulandığında ise zaman bağımlı azalma daha uzun sürede gerçekleştiği görülmüştür. Yeşil çayın etkilerine benzer şekilde S fazında 12. Saatte bir artış, G2/M hücre yüzdesinde azalma ve apoptotik hücre miktarında artış söz konusudur. Singh ve ark çalışmasında servikal kanser hatlarında ayrı ayrı uygulanan siyah ve yeşil çay polifenollerinin hücrelerde sınırlı bir apoptozu sebep olduğu ve hücre döngüsünde kondanse olan nükleer içeriğin az olduğu görülmüştür (Singh ve ark., 2011). Ancak çalışmanın devamında birlikte uygulanan polifenollerin aynı hücre hatları üzerinde sinerjik etkiler gösterdiğinden bahsedilmiştir. Bu çalışmada apoptoz ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde Bax ve p53 proteinlerinin up-regülasyonundan bahsedilmiştir (Singh ve ark., 2013). MDA MB-231 hücrelerinde yeşil çay polifenollerini uygulandığında hücre döngüsünde özellikle G0/G1 fazında özellikle 12. Saatte hücre miktarında ciddi düşüş görülmüştür, 6 ve 24 saatte G0/G1 hücre miktarında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. MDA MB-231 hücre döngüsü S fazında en yüksek hücre miktarı yeşil çay polifenollerini uygulandıktan 12. saat sonra yapılan ölçümlerde görülmüş, 6. saat verilerinde zaman bağımlı artışa uyumlu olduğu görülmüştür. Aynı hücre hattında G2+M fazında en düşük hücre miktarı yine 12. saatte tespit edilmiş, en fazla apoptozda aynı zaman diliminde yapılan ölçümlerde bulunmuştur. Siyah çay polifenollerini aynı hücre hattına uygulandığında G0/G1 fazında kontrol grubuyla benzer miktarda hücre olduğu görülmüştür. Siyah çay uygulaması yapıldıktan sonra hücre döngüsünün S fazında ölçüm yapılan tüm zaman aralıklarında kontrol grubuna göre daha fazla hücre olduğu görülmüştür. G2+M fazında uygulama yapıldıktan 6 ve 12 saat sonraki ölçümlerde düzenli bir azalmaya rastlanmaktadır. Apoptotik hücreler ise diğer hücre hattı ve aynı hücre hattının yeşil çay polifenollerindeki etkisi gibi en yüksek değeri uygulamadan sonraki 12. saatte göstermiştir. Yapılan çalışmalarda hücre kültür ortamında, EGCG'nin tümör

gelişimini hücre döngüsü proteinleri üzerine etki ederek dolaylı yoldan döngüyü uzattığı gösterilmiştir. Düşük konsantrasyonlardainsan neonatal dermal fibroblast hücrelerinde S ve G2+M fazlarını azaltarak, hücreleri G0/G1 fazını uzattığı bildirilmiştir. 400µM üzerindeki EGCG uygulamalarında ise hücrelerin S fazına girmediği bildirilmiştir. EGCG'in bu hücrelerde nükleusa transloke olarak hücre döngüsünü –geciktiren protinlerin sentezini aktive ettiği bu sayede EGCG'nin bu hücreleri G1 ve S fazı arasında tuttuğu önerilmiştir (Han ve ark., 2011). Onkogenik Ras mutasyonu ile karakterize kolorektal kanserde ise yeşil çay kateşinlerinin Ras-indüklü transformasyonu siklin D1 ekspresyonunu inhibe ederek durdurduğu bildirilmiştir (Peng ve ark., 2006). Kateşinlerin prostat kanserinde de hücre döngüsünü etkiledikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bu etkileri gösteren maddelerden biri olan EGCG hem siklin D1'e inhibitör proteinlerin bağlanmasını arttırırken, hemde siklin E, CDK2 bağlanmasını önleyerek hücre döngüsünü durdurur (Agarwal ve ark., 2000). Nöron hücrelerinde 50µg/ml den daha büyük konsantrasyonlarda kateşinler uygulandığında siklin D, siklin E, CDK4, CDK1 ekspresyonlarındaki azalma western blot yöntemi ile gösterilmiştir (Levites ve ark., 2002).

Faz I ve faz II genleri/enzimleri tümör gelişiminde düzenleyici etkileri bulunmaktadır. Ancak sitokrom P450 ve GST enzimleri kanserin inhibisyonunda olduğu kadar kanserin başlaması, gelişmesi ve yayılmasındada önemli enzimlerdir. Özellikle yeşil çay polifenollerini hakkında yapılan çalışmalarda sitokrom P450 sistemini inhibe ederken GST enzim aktivitesini arttırması gibi çift etkiler görülmüştür. Yeşil çay polifenollerinin etkilerinin incelendiği çalışmalarda faz I ve faz II enzim aktivitelerinin her ikiside indüklediği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde yeşil çay GST aktiviteleri zamana bağlı olarak azalmakta daha sonra ise 24 saatte aktivite artmaktadır. Siyah çay polifenollerinin GST aktivitesinin inhibisyonu üzerine etkisi daha fazla görülmektedir. MDA MB-231 hücrelerine uygulanan polifenollerin kontrol grubuna göre tüm saatlerde GST aktivitesini inhibe ettiği gösterilmektedir.

Polifenollerin QR aktiviteleri üzerine etkileri incelendi, 6 ve 12. saatte yeşil çay polifenollerinin aktiviteyi inhibe edici etkilergösterirken, 24.saatte bu etki aktivasyona dönüşmüştür. Siyah çay polifenollerinin etkileri 6. saatte inhibisyon, 12 ve 24. saatte aktivasyon yönünde gelişmiştir. Polifenollerin hücre büyümesini

baskılayıcı, apoptozu indükleyici etkileri DU145 hücrelerinde ROS oluşumu ve mitokondrial depolarizasyon eşliğinde gerçekleşmektedir. Ancak bu hücre hattında polifenollerin apoptozisi nasıl indüklediğinin mekanizması net değildir (Zhang ve ark., 2013). Nükleer faktör- E2-ilişkili transkripsiyon faktörü (Nrf-2) antioksidan yanıt ve oksidatif strese öncü rol oynayarak, faz II detoksifikasyon ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırmaktadır (Luo ve ark., 2006). EGCG gibi doğal elektrofilik bileşikler oksidatif hasar altındaki hücrelerde cevabın oluşmasını antioksidan yanıt elemanını aktive ederek gerçekleştirir (Chen ve ark.,2012). Redoks- duyarlı transkripsiyon faktörü olan aktivatör protein-1hücrel stres koşullarında gen ekspresyonunu düzenleyerek pro-survival etkileri destekler. Faz II detoksifikasyon enzim induksiyonu sağlayan EGCG bu etkiyi Nrf-2 etkisiyle gerçekleştirir.

Çeşitli kanser türlerine karşı koruyucu etkisi olduğu bilinen çayın kafeinliveya kafeinsiz olmasının bu etkinliğini arttırabileceği belirtilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda kafein içeren normal siyah çayın kafeinsiz çaya göre daha fazla anti-mutajen etkisi olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada da kafeinin heterosiklik aminlere karşı doza bağımlı antimutajen etkisi olduğu anlatılmıştır. UV ışığına maruz bırakılan farelerde kafein içeren çayın ve kafeinin, kafeinsiz çaya göre bir şekilde daha etkin koruyucu olduğu bulunmuştur. Çayın fare ve insanlarda tümör önleyici etkisini, normal çayda kafeinsiz çaya göre daha etkin olarak göstermesine ve benzer diğer çalışmalara bakıldığında kafeinin koruyucu etkisi olduğu gözlenebilir. Kafeinin özellikle sitokrom P450 1A2 gibi belirli sitokromları uyarıcı etkisi vardır. Chung ve ark.,Welsch ve ark. yaptıkları iki farklı çalışmada kafeinin mide ve meme kanseri gelişimini düşürdüğünü bulmuşlardır (Chung ve ark. 2001). 2009 yılında Cavaliere ve ark., insan lösemi hücrelerinin tedavisinde kullanılan siyah ve yeşil çay özlerinin ve onların polifenolleri EGCG ve TF'nin doza bağımlı olarak kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini ve kanser hücrelerinin çoğalmasını baskıladığını bulmuşlardır. Buna ek olarak aynı çalışmada siyah çay TF'lerinin programlı hücreölümünde, apoptosise etkileri önceden bilinen EGCGkadar etkili olduğunu da göstermiştir (Cavaliere ve ark., 2009). Oksidatif stresin tetiklediği karsinogenezin başlamasında ve ilerlemesinde reaktif oksijen türlerinin önemli miktarda rol aldıkları bilinmektedir. Prostat kanserinin önemli bir nedeninin reaktif oksijen türleri olduğu epidemiyolojik çalışmalar ve laboratuvar bulguları ile gösterilmiştir. Bu bilgiye ek

olarak kültür sistemlerinde yapılan çalışmalarda siyah çay özünün ve TF'lerin, aralarında prostat kanser hücresi LNCaP'nin de bulunduğu çok sayıda kanser hücresinin büyümesini engelleyebileceği gösterilmiştir. Çay türlerinin dünyada en sık görülen kanser türlerinden olan meme kanserine karşı koruyucu olabileceği son yıllarda bulunan bir bilgidir. Özellikle Japonya'da yapılan çalışmalarda yeşil çay tüketim miktarına bağlı olarak I. ve II. derece meme kanserlerinin tekrarlanma sıklığının azaldığı ortaya çıkarılmıştır. Siyah çay ve meme kanseri arasındaki ilişki hakkındaki bilgiler ise çok sınırlıdır. 2008 yılında Lahiry ve ark. tarafından yayınlanan çalışmada yeşil çay kateşinlerince olarak siyah çay TF'lerinin de meme kanseri gelişimini geciktirebileceğini gösterilmiştir. Yapılan çalışmada TF kullanılan grupta hayatta kalma süresinin arttığı ve tümör hücresinin hacminin istatistiksel olarak azaldığı belirtilmiştir. Grupta, %0.01 konsantrasyonunda yeşil çay kateşinleri ve % 0.05 konsantrasyonunda siyah çay teafavinin kullanımı sonucunda, apoptosis etkisini arttıran kaspaz-3 düzeylerinin tümör dokusunda % 67 ve % 38 oranında arttığı saptanmıştır. Çalışma sonunda hazırlanışı kolay, maliyeti ve toksite riski düşük olan çayın tüketiminin artırılmasının meme kanserinden korunmada önemli bir strateji olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca fenolik bileşikler bakımından zengin olan, çay gibi belirli yiyecek ve içeceklerin, tüketimlerinden sonra akciğer veya meme kanserinin tekrar görülmesi veya değişik kanser türlerinin oluşumu risklerini azalttıkları rapor edilmiştir (Ma ve ark., 2008). Flavonoidlerin, sebze ve meyvelerde bulunan diğer polifenollerle birlikte kanser tedavisinde programlı hücre ölümünü uyarmak için kullanılan sentetik ilaçlar sinerjik olarak etkileşime girebilecekleri düşünülmüştür. EGCG'nin, sulindac (ailesel adenomatous polyposis'i olan hastaların kolon adenoma yapısını baskılayan, ama yan etkileri çok kuvvetli olduğu için yasaklanan bir ajan) ve tamoxifen gibi kemoterapi ajanlarına etkisi araştırılmıştır. Dört değişik dozdaki (10, 50, 100 ve 200 µmol/ L) epikateşin ile 75 ve 100 µmol/ L EGCG'nin kemoterapi ajanları ile insan akciğer kanseri, PC-9 hücresi üzerindeki etkileri denenmiştir. İki koruyucu ajan, tamoxifen ve sulindac EGCG tarafından uyarılan PC-9 hücrelerindeki programlı hücre ölümünü anlamlı ve sinerjik olarak arttırmıştır. Bu çalışmada 100 µmol/L sulindac'a kadar PC-9 hücresinin planlı hücre ölümü etkilenmezken, 10 µmol/L sulindac ve 75 µmol/L EGCG birlikte kullanılmasının planlı hücre ölümünü yaklaşık 8 kat arttırdığı tespit edilmiştir (Lin ve ark., 2012). Siyah çay dünya üzerindeki çay tüketiminin %80'ini oluştursa da çay tüketimi ve kanser riskleri konulu araştırmalardan elde edilen

bilgilerin çoğu, tüketimi % 18 olarak tahmin edilen yeşil çaydan gelmektedir. Buna ek olarak, özellikle kadınlarda günde 10 fincan ve üzerinde yeşil çay tüketiminin kanser insidansı ile negatif ilişkisi rapor edilmiştir. Yeşil çayın benzer özelliklerini yemek borusu ve mide kanserlerine karşı da önermişlerdir. Japonya’da yapılan bir epidemiyolojik çalışmada hastalara ilk kanser tanısı konduktan sonra günde 10 fincan yeşil çay içen bireylerindeki 3 fincan ve daha az yeşil çay içenlere göre kadınlarda 8.7, erkeklerde 3 yıl daha fazla yaşadığı tespit edilmiştir. Yeşil çay tüketiminin fazla olduğu Asya ülkelerinde prostat ve meme kanseri insidanslarının düşük olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Fakat çalışmalarda yaşam koşullarındaki farklılıklardan dolayı kanser ve yeşil çay arasında kesin bir ilişki olduğu sonucuna varılamamıştır. Yine yukarıdaki çalışmaların sonucu olarak bilim adamları günde 10 fincan yeşil çay ve 5 fincan siyah çayı önermektedir. Yeşil çayın antikanserojen etkisi olduğu da bilinmektedir. Yeşil çayın bu etkiyi kanser oluşumunun belirli aşamalarını bloke ederek yaptığı ve EGCG’nin hücre zarı reseptörlerini bloke ederek kanser hücrelerinin büyümesini engellediği daha önceden gösterilmiştir. Yeşil çay aynı zamanda kanser oluşumunu ile ilgili olan sitokrom P-450A ve 2B1’inde bulunduğu çeşitli sitokrom P-450 enzimlerinin katalitik aktivitesini baskı altına almaktadır. Bununla birlikte yeşil çay nitrozaminleri bloke etmekte ve meme kanser hücrelerinde östrojen reseptör ilişkisini engellemektedir. Yeşil çayın kanser oluşumunu durdurma etkisi laboratuvar çalışmalarında EGCG veya yeşil çay özleri kullanılarak çalışılmıştır. Bununla birlikte EGCG’nin kanser hücrelerinin büyümesini, akciğer metastazını ve ürokinaz aktiviteyi engellediği hayvan araştırmalarında rapor edilmiştir (Youn ve ark., 2013). Araştırmacılar artmış yeşil çay tüketiminin post-menopozlu kadınlarda lenf nod metastazı önlediğini de raporlamışlardır.

Yeşil çaydaki polifenollerin anti-kanserojen etki mekanizmaları aşağıdaki başlıklar altında toplanmaktadır (Nihal ve ark., 2005).

- Kimyasal olarak uyarılmış olan lipit peroksidasyonunu engellemek
- Artmış antioksidan (glutasyon peroksidaz, katalaz ve kinon redüktaz) ve faz II (glutasyon S transferaz) enzim aktiviteleri
- Anti-inflamasyon aktivite
- Protein kinaz C ve hücresel çoğalmaların engellenmesi

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre yeşil çay polifenolleri her iki hücre hattında apoptotik etkiler göstermesi açısından ön plana çıkmaktadır. Ancak, hücre döngüsü üzerine olan etkileri açısından karşılaştırıldıklarında her iki polifenol ekstreside hücre döngüsünü farklı aşamalarda durdurmuştur. MCF-7 üzerindeki apoptoz indükleyici etkiler ROS düzeylerinin artırılması ile gerçekleşiyor olabilir. MCF-7 hücreleri üzerindeki etki yeşil ve siyah çay uygulamalarının ikisinde birden görülmüştür. İleride yapılacak çalışmalarda istenilen etkiye ve uygulanacak hücreye göre siyah ya da yeşil çay polifenollerinden biri tercih edilebilir. Polifenol ekstresilerinin faz I ve faz II enzimlerinin üzerindeki etkileri ise hücre hatlarına göre farklılıklar içermektedir.

Çalışmamızın sonuçları bir araya getirildiğinde siyah çayında yeşil çay gibi uygulanan hücrenin moleküler alt yapısına bağlı olarak farklı etkileri olduğu görülmüştür. Bu moleküler mekanizmaların aracılarının neler olduğunun ve hedef moleküllerinin aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca her iki polifenol ekstresinin farklı ilaçlarla kombinasyonları ileriki çalışmaların konusudur.

## 8.KAYNAKLAR

1. Abib, R.T., Peres, K.C., Barbosa, A.M., Peres, T.V., Bernardes, A., Zimmermann, L.M., Quincozes-Santos, A., Fiedler, H.D., Leal, R.B., Farina, M., Gottfried, C., 2011. Epigallocatechin-3-gallate protects rat brain mitochondria against cadmium-induced damage. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2618–2623.
2. Adhami, V.M., Malik, A., Zaman, N., Sarfaraz, S., Siddiqui, I.A., Syed, D.N., Afaq, F., Pasha, F.S., Saleem, M., Mukhtar, H., 2007. Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 13,1611–1619.
3. Agarwal R (2000) Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol* 60:1051–1059.
4. Ahn, C.H., Choi, W.C., Kong, J.Y., 1997. Chemosensitizing activity of caffeic acid in multidrug-resistant MCF-7/Dox human breast carcinoma cells. *Anticancer Res.* 17, 1913–1917.
5. Almeida, A.A., Farah, A., Silva, D.A., Nunan, E.A., Gloria, M.B., 2006. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8738–8743.
6. Atlante, A., Bobba, A., Paventi, G., Pizzuto, R., Passarella, S., 2010. Genistein and daidzein prevent low potassium-dependent apoptosis of cerebellar granule cells. *Biochem. Pharmacol.* 79, 758–767.
7. Ban, J.Y., Jeon, S.Y., Bae, K., Song, K.S., Seong, Y.H., 2006. Catechin and epicatechin from *Smilacis chinae* rhizome protect cultured rat cortical

- neurons against amyloid beta protein (25–35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevation. *Life Sci.* 79, 2251–2259.
8. Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z., Sarkar, F.H., 2008. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett.* 269, 226–242.
  9. Banerjee, S., Zhang, Y., Wang, Z., Che, M., Chiao, P.J., Abbruzzese, J.L., Sarkar, F.H., 2007. In vitro and in vivo molecular evidence of genistein action in augmenting the efficacy of cisplatin in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 120, 906–917.
  10. Bhattacharya, U., Halder, B., Mukhopadhyay, S., Giri, A.K., 2009. Role of oxidation-triggered activation of JNK and p38 MAPK in black tea polyphenols induced apoptotic death of A375 cells. *Cancer Sci.* 100, 1971–1978.
  11. Bishayee, K., Ghosh, S., Mukherjee, A., Sadhukhan, R., Mondal, J., Khuda-Bukhsh, A.R., 2013. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug–DNA interaction. *Cell Prolif.* 46, 153–163.
  12. Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186, 343–355.
  13. Bouktaib, M., Atmani, A., Rolando, C., 2002. Regio- and stereoselective synthesis of the major metabolite of quercetin, quercetin-3-O- $\beta$ -d-glucuronide. *Tetrahedron Lett.* 43, 6263–6266.
  14. Casella, M.L., Parody, J.P., Ceballos, M.P., Quiroga, A.D., Ronco, M.T., Francés, D.E., Monti, J.A., Pisani, G.B., Carnovale, C.E., Carrillo, M.C., de Luján Alvarez, M., 2014. Quercetin prevents liver carcinogenesis by inducing

cell cycle arrest, decreasing cell proliferation and enhancing apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 289–300.

15. Cavaliere, V., Papademetrio, D.L., Lorenzetti, M., Valva, P., Preciado, M.V., Gargallo, P., Larripa, I., Monreal, M.B., Pardo, M.L., Hajos, S.E., Blanco, G.A., Alvarez, E.M., 2009. Caffeic acid phenylethyl ester and MG-132 have apoptotic and antiproliferative effects on leukemic cells but not on normal mononuclear cells. *Transl. Oncol.* 2, 46–58.
16. Chang, W.C., Hsieh, C.H., Hsiao, M.W., Lin, W.C., Hung, Y.C., Ye, J.C., 2010. Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 49, 419–424.
17. Chen D, Pamu S, Cui Q, Chan TH, Dou QP (2012) Novelepigallocatechin gallate (EGCG) analogs activate AMP-activated protein kinase pathway and target cancer stem cells. *Bioorgan Med Chem* 20:3031–3037.
18. Chen, C., Yu, R., Owuor, E.D., Kong, A.N., 2000. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch. Pharm. Res.* 23, 605–612.
19. Chen, W., Zhou, Z., Li, L., Zhong, C. Q., Zheng, X., Wu, X., Zhang, Y., Ma, H., Huang, D., Li, W. et al. (2013). Diverse sequence determinants control human and mouse receptor interacting protein 3 (RIP3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) interaction in necroptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 288, 16247-16261.
20. Chirumbolo, S., 2010. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 9, 263–285.
21. Chung, J.Y., Park, J.O., Phyu, H., Dong, Z., Yang, C.S., 2001. Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells

- by tea polyphenols (-)epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3,3'-digallate. *FASEB J.* 15, 2022–2024.
22. D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 43, 348–361.
  23. Devika, P.T., Stanely Mainzen Prince, P., 2008. (-)Epigallocatechingallate protects the mitochondria against the deleterious effects of lipids, calcium and adenosine triphosphate in isoproterenol induced myocardial infarcted male Wistar rats. *J. Appl. Toxicol.* 28, 938–944.
  24. Ding, B., Yuan, L., Yu, H., Li, L., Ma, W., Bi, Y., Feng, J., Xiao, R., 2011. Genistein and folic acid prevent oxidative injury induced by  $\beta$ -amyloid peptide. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 108, 333–340.
  25. Dixon, R.A., Ferreira, D., 2002. Genistein. *Phytochemistry* 60, 205–211.
  26. Dorta, D.J., Pigoso, A.A., Mingatto, F.E., Rodrigues, T., Prado, I.M., Helena, A.F., Uyemura, S.A., Santos, A.C., Curti, C., 2005. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chem. Biol. Interact.* 152, 67–78.
  27. Du, Y., Lou, H., 2008. Catechin and proanthocyanidin B4 from grape seeds prevent doxorubicin-induced toxicity in cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 591, 96–101.
  28. Feng, Y., Lu, Y., Xu, P., Long, Y., Wu, W., Li, W., Wang, R., 2008. Caffeic acid phenethyl ester and its related compounds limit the functional alterations of the isolated mouse brain and liver mitochondria submitted to in vitro anoxia–reoxygenation: relationship to their antioxidant activities. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 659–672.
  29. Fine, A.M., 2000. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern. Med. Rev.* 5, 144–151.

30. Fitzpatrick, L.R., Wang, J., Le, T., 2001. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 915–920.
31. Fontanilla, C.V., Ma, Z., Wei, X., Klotsche, J., Zhao, L., Wisniewski, P., Dodel, R.C., Farlow, M.R., Oertel, W.H., Du, Y., 2011. Caffeic acid phenethyl ester prevents 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration. *Neuroscience* 188, 135–141.
32. Gardner, E.J., Ruxton, C.H.S., Leeds, A.R. (2007). Black tea—helpful or harmful? a review of the evidence. *European Journal of Clinical Nutrition.* 61, 3-18.
33. Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E.M., Efros, L., Caldwell, M., 1998. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44 (3), 230–232.
34. Hadler, B., Pramanick, S., Mukhopadhyay, S., Giri, A.K. (2006). Anticlastrogenic effects of black tea polyphenols theaflavins and thearubigins in human lymphocytes in vitro. *Toxicology in Vitro.* 20, 608- 613.
35. Halder, B., Bhattacharya, U., Mukhopadhyay, S., Giri, K.A., 2008. Molecular mechanism of black tea polyphenols induced apoptosis in human skin cancer cells: involvement of Bax translocation and mitochondria mediated death cascade. *Carcinogenesis* 29, 129–138.
36. Han DW, Lee MH, Kim HH, Hyon SH, Park JC (2011) Epigallocatechin-3-gallate regulates cell growth, cell cycle and phosphorylated nuclear factor- $\kappa$ B in human dermal fibroblasts. *Acta Pharmacol Sin* 32:637–646.
37. Hasima N, Ozpolat B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Dis* 2014;5:e1509.

38. Hayakawa, S., Saeki, K., Sazuka, M., Suzuki, Y., Shoji, Y., Ohta, T., Kaji, K., You, A., Isemura, M., 2001. Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1102–1106.
39. Henning, S.M., Fajardo- Lira, C., Lee, H., Youssefian, A.A., Go, V.L.W., Heber, D. (2003). Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with antioxidant capacity. *Nutrition and Cancer.* 45(2), 226- 235.
40. Hsu, F.L., Chen, Y.C., Cheng, J.T., 2000. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Med.* 66, 228–230.
41. Huang, X., Chen, S., Xu, L., Liu, Y., Deb, D.K., Platanius, L.C., Bergan, R.C., 2005. Genistein inhibits p38 map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 65, 3470–3478.
42. Hwang, J.T., Ha, J., Park, I.J., Lee, S.K., Baik, H.W., Kim, Y.M., Park, O.J., 2007. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett.* 247, 115–121.
43. Hwang, J.T., Ha, J., Park, O.J., 2005a. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 433–40.
44. Ishizawa, K., Yoshizumi, M., Kawai, Y., Terao, J., Kihira, Y., Ikeda, Y., Tomita, S., Minakuchi, K., Tsuchiya, K., Tamaki, T., 2011. Pharmacology in health food: metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis. *J. Pharmacol. Sci.* 115, 466–470.
45. Iwasaki, R., Ito, K., Ishida, T., Hamanoue, M., Adachi, S., Watanabe, T., Sato, Y., 2009. Catechin, green tea component, causes caspase-independent

- necrosis-like cell death in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Sci.* 100, 349–356.
46. Jain, P., Kumar, N., Josyula, V.R., Jagani, H.V., Udupa, N., Mallikarjuna-Rao, C., Vasanth-Raj, P., 2013. A study on the role of (+)-catechin in suppression of HepG2 proliferation via caspase dependent pathway and enhancement of its in vitro and in vivo cytotoxic potential through liposomal formulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 353–365.
47. Jimenez-Lopez, J.M., Cederbaum, A.I., 2004. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate protects HepG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 359–370.
48. Kalonia, H., Kumar, P., Kumar, A., Nehru, B., 2009. Effect of caffeic acid and rofecoxib and their combination against intrastriatal quinolinic acid induced oxidative damage, mitochondrial and histological alterations in rats. *Inflammopharmacology* 17, 211–219.
49. Kalra, N., Prasad, S., Shukla, Y., 2005. Antioxidant potential of black tea against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced oxidative stress in Swiss albino mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 24 (2), 105–114.
50. Karuppagounder, S.S., Madathil, S.K., Pandey, M., Haobam, R., Rajamma, U., Mohanakumar, K.P., 2013. Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. *Neuroscience* 236, 136–148.
51. Kelly, G.S., 2011. Quercetin. *Monograph. Altern. Med. Rev.* 16, 172–194.
52. Kelsey, N.A., Wilkins, H.M., Linseman, D.A., 2010. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules* 15, 7792–7814.
53. Khan, M., Elango, C., Ansari, M.A., Singh, I., Singh, A.K., 2007. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 102, 365–377.

54. Kim, S.J., Jeong, H.J., Lee, K.M., Myung, N.Y., An, N.H., Yang, W.M., Park, S.K., Lee, H.J., Hong, S.H., Kim, H.M., Um, J.Y., 2007. Epigallocatechin-3-gallate suppresses NF- $\kappa$ B activation and phosphorylation of p38 MAPK and JNK in human astrocytoma U373MG cells. *J. Nutr. Biochem.* 18, 587–596.
55. Kibrooba, A., Chattipakornb, N., Wongmekiata, O., 2012. Caffeic acid phenethyl ester ameliorates cadmium-induced kidney mitochondrial injury. *Chem. Biol. Interact.* 200, 21–27.
56. Kumar, A., Prakash, A., Pahwa, D., 2011. Galantamine potentiates the protective effect of rofecoxib and caffeic acid against intrahippocampal Kainic acid-induced cognitive dysfunction in rat. *Brain Res. Bull.* 85, 158–168.
57. Kumaran, K.S., Prince, P.S., 2010. Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage. *Cell Stress Chaperones* 15, 791–806.
58. Lahiry, L., Saha, B., Chakraborty, J., Adhikary, A., Mohanty, S., Hossain, D.M., Banerjee, S., Das, K., Sa, G., Das, T., 2010. Theaflavins target Fas/caspase-8 and Akt/pBad pathways to induce apoptosis in p53-mutated human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 31, 259–268.
59. Lahiry, L., Saha, B., Chakraborty, J., Bhattacharyya, S., Chattopadhyay, S., Banerjee, S., Choudhuri, T., Mandal, D., Bhattacharyya, A., Sa, G., Das, T., 2008. Contribution of p53-mediated Bax transactivation in theaflavin-induced mammary epithelial carcinoma cell apoptosis. *Apoptosis* 13, 771–781.
60. Lee, J.H., Jeong, Y.J., Lee, S.W., Kim, D., Oh, S.J., Lim, H.S., Oh, H.K., Kim, S.H., Kim, W.J., Jung, J.Y., 2010. EGCG induces apoptosis in human laryngeal epidermoid carcinoma Hep2 cells via mitochondria with the release of apoptosis-inducing factor and endonuclease G. *Cancer Lett.* 290, 68–75.

61. Lee, S.M., Ko, I.G., Kim, S.E., Kim, D.H., Kang, B.N., 2010b. Protective effect of catechin on apoptosis of the lens epithelium in rats with N-methyl-N-nitrosourea- induced cataracts. *Korean J. Ophthalmol.* 24, 101–107.
62. Lee, Y.M., Choi, J.S., Kim, M.H., Jung, M.H., Lee, Y.S., Song, J., 2006b. Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. *Nutrition* 22, 956–964.
63. Levites Y, Amit T, Youdim MBH, Mandel S (2002) Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem* 277:30574–30580.
64. Li, B., Vik, S.B., Tu, Y., 2012. Theaflavins inhibit the ATP synthase and the respiratory chain without increasing superoxide production. *J. Nutr. Biochem.* 23, 953–960.
65. Lin, C.L., Chen, R.F., Chen, J.Y., Chu, Y.C., Wang, H.M., Chou, H.L., Chang, W.C., Fong, Y., Chang, W.T., Wu, C.Y., Chiu, C.C., 2012c. Protective effect of caffeic acid on paclitaxel induced anti-proliferation and apoptosis of lung cancer cells involves NF-jB pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 6236–6245.
66. Lin, Y.P., Chen, T.Y., Tseng, H.W., Lee, M.H., Chen, S.T., 2009. Neural cell protective compounds isolated from *Phoenix hanceana* var. *formosana*. *Phytochemistry* 70, 1173–1181.
67. Luczaj, W., Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine.* 40, 910– 918.
68. Luo H, Tang L, Tang M, Billam M, Huang T, Yu J et al (2006) Phase IIa chemoprevention trial of green tea polyphenols in high-risk individuals of liver cancer: modulation of urinary excretion of green tea polyphenols and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Carcinogenesis* 27:262–268.

69. M. Masuda, M. Suzui, J. T. E. Lim, A. Deguchi, J.-W. Soh, B. Weinstein, “Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction,” *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 2002; 2(6):350–359.
70. Ma, D.F., Qin, L.Q., Wang, P.Y., Katoh, R., 2008. Soy isoflavone intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin. Nutr.* 27, 57–64.
71. Ma, H., Huang, X., Li, Q., Guan, Y., Yuan, F., Zhang, Y., 2011. ATP-dependent potassium channels and mitochondrial permeability transition pores play roles in the cardioprotection of theaflavin in young rat. *J. Physiol. Sci.* 61, 337–342.
72. Masuda, T., Yamada, K., Akiyama, J., 2008. Antioxidation mechanism studies of caffeic acid: identification of antioxidation products of methyl caffeate from lipid oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5947–5952.
73. Mazumdar, M., Adhikary, A., Chakraborty, S., Mukherjee, S., Manna, A., Saha, S., Mohanty, S., Dutta, A., Bhattacharjee, P., Ray, P., Chattopadhyay, S., Banerjee, S., Chakraborty, J., Ray, A.K., Sa, G., Das, T., 2013. Targeting RET to induce medullary thyroid cancer cell apoptosis: an antagonistic interplay between PI3K/Akt and p38MAPK/caspase-8 pathways. *Apoptosis* 18, 589–604.
74. McEleny, K., Coffey, R., Morrissey, C., Fitzpatrick, J.M., Watson, R.W., 2004. Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int.* 94, 402–406.
75. McIlwain, D. R., Berger, T. and Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008656.

76. Meeran, S.M., Katiyar, S.K., 2007. Grape seed proanthocyanidins promote apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells through alterations in Cdk1-Cdk-cyclin cascade, and caspase-3 activation via loss of mitochondrial membrane potential. *Exp. Dermatol.* 16, 405–415.
77. Meng, Q., Velalar, C.N., Ruan, R., 2008. Effects of epigallocatechin-3-gallate on mitochondrial integrity and antioxidative enzyme activity in the aging process of human fibroblast. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1032–1041.
78. Messina, M.J., Wood, C.E., 2008. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. *Nutr. J.*, 7–17.
79. Murase, T., Misawa, K., Haramizu, S., Hase, T., 2009. Catechin-induced activation of the LKB1/AMP-activated protein kinase pathway. *Biochem. Pharmacol.* 78, 78–84.
80. Nakazato, T., Ito, K., Ikeda, Y., Kizaki, M., 2005. Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin. Cancer Res.* 11, 6040–6049.
81. Nihal, M., Ahmad, N., Mukhtar, H., Wood, G.S., 2005. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int. J. Cancer* 11, 513–521.
82. Nomura, M., Kaji, A., He, Z., Ma, W.Y., Miyamoto, K., Yang, C.S., Dong, Z., 2001. Inhibitory mechanisms of tea polyphenols on the ultraviolet B-activated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 46624–46631.
83. Onori, P., DeMorrow, S., Gaudio, E., Franchitto, A., Mancinelli, R., Venter, J., Kopriva, S., Ueno, Y., Alvaro, D., Savage, J., Alpini, G., Francis, H., 2009. Caffeic acid phenethyl ester decreases cholangiocarcinoma growth by inhibition of NF-kappaB and induction of apoptosis. *Int. J. Cancer* 125, 565–576.

84. Orgaard, A., Jensen, L., 2008. The effects of soy isoflavones on obesity. *Exp. Biol. Med.* 233, 1066–1080.
85. Pajuelo, D., Díaz, S., Quesada, H., Fernández-Iglesias, A., Mulero, M., Arola-Arnal, A., Salvadó, M.J., Bladé, C., Arola, L., 2011a. Acute administration of grape seed proanthocyanidin extract modulates energetic metabolism in skeletal muscle and BAT mitochondria. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4279–4287.
86. Pajuelo, D., Quesada, H., Díaz, S., Fernández-Iglesias, A., Arola-Arnal, A., Bladé, C., Salvadó, J., Arola, L., 2012. Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of brown adipose tissue caused by diet-induced obesity in Wistar rats. *Brit. J. Nutr.* 107, 170–178.
87. Park, S.G., Lee, D.G., Seo, S.K., 2008. Evaluation of anti-allergic properties of caffeic acid phenethyl ester in a murine model of systemic anaphylaxis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 226, 22–29.
88. Peng G, Wargovich MJ, Dixon DA (2006) Anti-proliferative effects of green tea polyphenol EGCG on Ha-Ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. *Cancer Lett* 238:260–270.
89. Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., Osuna, A., 2009. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol. Rep.* 61, 67–75.
90. Prasad, S., Kaur, J., Roy, P., Kalra, N., Shukla, Y., 2007. Theaflavins induce G2/M arrest by modulating expression of p21waf1/cip1, cdc25C and cyclin B in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Life Sci.* 81, 1323–1331.
91. Punithavathi, V.R., Stanely Mainzen Prince, P., 2010. Protective effects of combination of quercetin and  $\alpha$ -tocopherol on mitochondrial dysfunction and myocardial infarct size in isoproterenol-treated myocardial infarcted rats:

- biochemical, transmission electron microscopic, and macroscopic enzyme mapping evidences. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24, 303–312.
92. Qanungo, S., Das, M., Haldar, S., Basu, A., 2005. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 26, 958–967.
93. Qian, Y., Guan, T., Huang, M., Cao, L., Li, Y., Cheng, H., Jin, H., Yu, D., 2012. Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria- dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF- $\kappa$ B activation in a cerebral ischemia mouse model. *Neurochem. Int.* 60, 759–767.
94. Rasbach, K.A., Schnellmann, R.G., 2008. Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. *JPET* 325, 536–543.
95. Renaud, S., de Lorgeril, M., 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523–1526.
96. Sandoval-Acuña, C., Lopez-Alarcón, C., Aliaga, M.E., Speisky, H., 2012. Inhibition of mitochondrial complex I by various non-steroidal anti-inflammatory drugs and its protection by quercetin via a coenzyme Q-like action. *Chem. Biol. Interact.* 199, 18–28.
97. Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073–2085.
98. Schreihöfer, D.A., Redmond, L., 2009. Soy phytoestrogens are neuroprotective against stroke-like injury in vitro. *Neuroscience* 158, 602–609.
99. Sharma K, Le N, Alotaibi M, Gewirtz D. Cytotoxic Autophagy in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2014;15:10034–51. doi:10.3390/ijms150610034.

100. Shi, C., Xu, J., 2008. Increased vulnerability of brain to estrogen withdrawal-induced mitochondrial dysfunction with aging. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 625–630.
101. Siddiqui, I.A., Malik, A., Adhami, V.M., Asim, M., Hafeez, B.B., Sarfaraz, S., Mukhtar, H., 2008. Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 27, 2055–2063.
102. Singh M., Bhui K., Singh R., Shukla Y. Tea polyphenols enhance cisplatin chemosensitivity in cervical cancer cells via induction of apoptosis. *Life Sci.* 2013; 93: 7-16.
103. Singh, M., Bhui, K., Singh, R., Shukla, Y., 2013. Tea polyphenols enhance cisplatin chemosensitivity in cervical cancer cells via induction of apoptosis. *Life Sci.* 93, 7–16.
104. Singh, T., Sharma, S.D., Katiyar, S.K., 2011. Grape proanthocyanidins induce apoptosis by loss of mitochondrial membrane potential of human non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 6, e27444.
105. Srividhya, R., Zarkovic, K., Stroser, M., Waeg, G., Zarkovic, N., Kalaiselvi, P., 2009. Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (-)-epigallo catechin gallate. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 223–231.
106. Sugantha Priya, E., Selvakumar, K., Bavithra, S., Elumalai, P., Arunkumar, R., Raja Singh, P., Brindha Mercy, A., Arunakaran, J., 2014. Anti-cancer activity of quercetin in neuroblastoma: an in vitro approach. *Neurol. Sci.* 35, 163–170.
107. Tabassum, H., Parvez, S., Rehman, H., Banerjee, B.D., Raisuddin, S., 2007. Catechin as an antioxidant in liver mitochondrial toxicity: inhibition of tamoxifen-induced protein oxidation and lipid peroxidation. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21, 110–117.

108. Tang, Y., Gao, C., Xing, M., Li, Y., Zhu, L., Wang, D., Yang, X., Liu, L., Yao, P., 2012. Quercetin prevents ethanol-induced dyslipidemia and mitochondrial oxidative damage. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1194–1200.
109. Tayman, C., Tonbul, A., Kosus, A., Hirfanoglu, I.M., Haltas, H., Uysal, S., Tatli, M.M., Andiran, F., 2011. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *Pediatr. Surg. Int.* 27, 1179–1189.
110. Tophkhane, C., Yang, S., Bales, W., Archer, L., Osunkoya, A., Thor, A.D., Yang, X., 2007. Bcl-2 overexpression sensitizes MCF-7 cells to genistein by multiple mechanisms. *Int. J. Oncol.* 31, 867–874.
111. Vidya Priyadarsini, R., Senthil Murugan, R., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunakaran, D., Nagini, S., 2010. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- $\kappa$ B inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 649, 84–91.
112. Watabe, M., Hishikawa, K., Takayanagi, A., Shimizu, N., Nakaki, T., 2004. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF $\kappa$ B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* 279, 6017–6026.
113. Wenzel, U., Fuchs, D., Daniel, H., 2008. Protective effects of soy-isoflavones in cardiovascular disease. Identification of molecular targets. *Hamostaseologie* 28, 85–88.
114. Wu, J., Omene, C., Karkoszka, J., Bosland, M., Eckard, J., Klein, C.B., Frenkel, K., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Lett.* 308, 43–53.
115. Yang, W.H., Fong, Y.C., Lee, C.Y., Jin, T.R., Tzen, J.T., Li, T.M., Tang, C.H., 2011. Epigallocatechin-3-gallate induces cell apoptosis of human

chondrosarcoma cells through apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway. *J. Cell. Biochem.* 112, 1601–1611.

116. Yao, K., Ye, P.P., Zhang, L., Tan, J., Tang, X.J., Zhang, Y.D., 2008. Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis in human lens epithelial cells. *Mol. Vis.* 14, 217–223.
117. Youn, H., Jeong, J.C., Jeong, Y.S., Kim, E.J., Um, S.J., 2013. Quercetin potentiates apoptosis by inhibiting nuclear factor-kappaB signaling in H460 lung cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 944–951.
118. Zhang T, Zhang J, Derreumaux P, Mu Y (2013) Molecular mechanism of the inhibition of EGCG on the Alzheimer's Ab1-42 dimer. *J Phys Chem B* 117:3993–4002.
119. Zhang, H., Zhang, J., Ungvari, Z., Zhang, C., 2009b. Resveratrol improves endothelial function: role of TNF{alpha} and vascular oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1164–1171.
120. Zheng, J., Ramirez, V.D., 2000. Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Brit. J. Pharmacol.* 130, 1115–1123.

## 9. EKLER

### EK -I-Deney hayvanları etik kurulu proje onay formu



T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Etik Kurulu

**PROJENİN ADI:** Meme Kanseri Hücre Hatlarında Çay Kaynaklı Polifenollerin Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri ile Hücre Ölümlü Mekanizmaları Üzerine Etkisi  
**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Prof.Dr. A. Suha YALÇIN  
**PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR:** Ayşe Mine YILMAZ  
**ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI:** 02.05.2014-10

Sayın Prof.Dr. A. Suha YALÇIN

52. protokol nolu "Meme Kanseri Hücre Hatlarında Çay Kaynaklı Polifenollerin Faz I ve Faz II Enzim Aktiviteleri ile Hücre Ölümlü Mekanizmaları Üzerine Etkisi" isimli projeniz Enstitümüzün Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

  
Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU  
Komisyon Başkanı

  
Prof. Dr. İnci ALİCAN

  
Prof. Dr. Semp AKYÜZ

  
Yrd. Doç. Dr. Betül OKUYAN

  
Prof. Dr. Aysel PEHLİVAN

  
Doç. Dr. Nefise BAHÇECİK

Doç. Dr. Hakkı ARIKAN

  
Yrd. Doç. Dr. Emrit UĞURLU

Doç. Dr. Dilşad SAVE

Yrd. Doç. Dr. Zübeyir SARI

Yrd. Doç. Dr. Tolga GÜVEN



Marmara Üniversitesi Çeşitli  
Kuruluş Sağlık Bilimleri  
Enstitüsü 30085 Kocaeli /  
İSTANBUL

0 (216) 414 44 2312 (dışarı)  
0 (216) 414 44 23  
Ayrıntılı bilgi için:

mailto:aricio@mmu.edu.tr  
http://etik.kurumu.mmu.edu.tr

## EK-II-Özgeçmiş

<b>Adı</b>	Ayşe Mine	<b>Soyadı</b>	YILMAZ
<b>Doğum Yeri</b>	Malkara/Tekirdağ	<b>Doğum Tarihi</b>	06.06.1981
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>Tel</b>	0 505 641 3705
<b>E-mail</b>	<a href="mailto:aysemine.yilmaz@gmail.com">aysemine.yilmaz@gmail.com</a>		

## Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>	Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı	2016
<b>Yüksek Lisans</b>	Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı	2010
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2005
<b>Lise</b>	Tekirdağ Tuğlacılar Lisesi	1999

## Yabancı Dil

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İngilizce	İyi	Orta	İyi

## Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
Microsoft Office	İyi

## ÇALIŞTIĞI PROJELER

1. Histon Modifikasyonlarının Dentritik Hücrelerdeki İmmünmodülatör Etkilerinin Belirlenmesi-2011/2012-BAPKOYürütücü: Prof. Dr. Yavuz TAGA (Araştırmacı; Ayşe Mine YILMAZ).
2. Proteazom İnhibisyonu ve Şaperon Aracılı Otofaji İnhibisyonu Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptoz ve Otofaji Açısından Değerlendirilmesi- 2014/2015-TUBITAK-3501 Yürütücü: Doç.Dr. Betül KARADEMİR. (Araştırmacı-Ayşe Mine YILMAZ).
3. Hepatit B Enfeksiyonunun Tanısında Serolojik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanı Kitlerinin Geliştirilmesi-2006/2010-TUBITAK-1007-Projesi-105G056. Yürütücü: Doç.Dr. Aynur BAŞALP. (Araştırmacı-Ayşe Mine YILMAZ)
4. Süt serumu proteinlerinin ve hidrolizatlarının antioksidan, antiviral ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi ve yapısal özelliklerinin aydınlatılması-2005/2008-TUBITAK-(104S507).Yürütücü: Prof.Dr. A. Süha YALÇIN. (Araştırmacı: Ayşe Mine YILMAZ)

## YAYINLAR

1. Murat Türkoğlu, Timuçin Uğurlu, Gülşah Gedik, **Ayşe Mine Yılmaz**, A. Süha Yalçın. In vivo evaluation of black and green tea dermal products against UV radiation. Drug Discoveries & Therapeutics. 2010; 4(5): 362-367.
2. **Ayşe Mine Yılmaz**, Wafi Attaallah, Gökhan Biçim, Evren Öney Uçar, Nazlı Arda, A. Özdemir Aktan, A. Suha Yalçın. Deneysel meme kanseri modelinde süt proteinlerinin koruyucu etkisi.MÜSBED 2011; 1(1): 26-34.
3. Wafi Attaallah, **Ayşe Mine Yılmaz**, Nusret Erdoğan, A. Suha Yalçın, A. Özdemir Aktan. Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats. Pathol. Oncol. Res. 2012; 18: 817-822.
4. A. Suha Yalçın, Wafi Attaallah, **Ayşe Mine Yılmaz**, A. Özdemir Aktan. Free radicals, whey proteins and colorectal cancer. Marmara Medical Journal. 2013; 27 (1); 6.

5. Evren Önay-Uçar, Nazlı Arda, Murat Pekmez, **Ayşe Mine Yılmaz**, Nazlı Böke-Sarıkahya, Süheyla Kırmızıgül, A. Süha Yalçın. Comparison of antioxidant capacity, protein profile and carbohydrate content of whey protein fractions. Food Chemistry 2014: 150; 34-40.
6. Ulus A, Çelik Ö, Arslanhan A, Çilingir ÖT, Özkan M, **Yılmaz Ayşe M**, Bozkurt SU, Ziyal Mİ. Effects of intraperitoneal zoledronic acid administration on cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. JNS 2015: 32 (3); 450-460.
7. Ergul M. Altundag, **Ayşe M. Yılmaz**, Ceyda Corek A, Suha Yalcin, Yavuz Taga, Semra Koçturk. Synergistic Effects of Methotrexate and Suberoylanilide Hydroxamic Acid in Triggering Apoptosis of Chronic Myeloid Leukemia Cells. International Journal of Hematology and Oncology. 2015: 1; 1-11.
8. **Ayşe Mine Yılmaz**, Ergül Mutlu Altundağ, Gülşah Gedik, A. Suha Yalçın, Semra Koçtürk and Yavuz Taga. Effect of different culture media on isolation and differentiation of dendritic cells. Türk Biyokimya Dergisi/ Turkish Journal of Biochemistry 2015;40(6):440-447.
9. Ergül Mutlu Altundağ, Tolga Kasacı, **Ayşe Mine Yılmaz**, Betül Karademir, Semra Koçtürk, Yavuz Taga, and A. Süha Yalçın. Quercetin-induced cell death in human papillary thyroid cancer (B-CPAP) cells. Journal of Thyroid Research. 2015 (Article in press).

## ÜYELİKLER

1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği (SRAD)
2. Hücre Ölümü Araştırma Derneği (HOAD)
3. Türk Biyokimya Derneği (TBD)
4. Society for Free Radical Research (SFRR)